UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JÉSSICA BARBOSA DE OLIVEIRA GONÇALVES

**Reparo ósseo de enxerto autógeno estabilizado com adesivo de
fibrina. Análise histológica e histomorfométrica**

BAURU
2014

JÉSSICA BARBOSA DE OLIVEIRA GONÇALVES

Reparo ósseo de enxerto autógeno estabilizado com adesivo de fibrina. Análise histológica e histomorfométrica

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

BAURU
2014

G586r Gonçalves, Jéssica Barbosa de Oliveira
Reparo ósseo de enxerto autógeno estabilizado
com adesivo de fibrina. Análise histológica e
histomorfométrica/ Jéssica Barbosa de Oliveira
Gonçalves. – Bauru, 2014.
97 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 012/2012
Data: 25 de julho de 2012

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Rosemary Barbosa de Oliveira** e **Valdir Ferreira Gonçalves**, pelo apoio e confiança que sempre depositaram em mim. Pelo exemplo de persistência, força e dignidade. Minha eterna gratidão.

Ao meu segundo pai, **Maurício de Oliveira Camargo**, e minha segunda mãe, **Nádia Rodrigues Gonçalves**, pelo esforço em fazer por mim tudo o que há de melhor. São dádivas divinas, não me imagino sem vocês.

Às minhas irmãs **Marieva Rodrigues Gonçalves** e **Ana Flávia Inocêncio Camargo** pela presença tão carinhosa em minha vida. É pensando em vocês que encontro forças para realizar meus sonhos.

Ao meu namorado **Henrique Celestino Lima e Silva**, pela amizade, paciência, pelo incentivo, companheirismo, carinho e por todos os momentos que passamos juntos. Obrigada pela pessoa maravilhosa que você é.

Ao meu eterno amigo **Renan Lombardi Cazo** (*in memoriam*), por tudo que foi, é e sempre será na minha vida. Sinto saudades.

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

*“Concedei-nos, Senhor, a serenidade necessária
para aceitar as coisas que não podemos modificar,
coragem para modificar aquelas que podemos
e sabedoria para distinguir umas das outras.”*

Reinhold Niebuhr

Primeiramente agradeço à **Deus e Nossa Senhora Aparecida**, por me concederem coragem para acreditar, sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, proteção para me amparar e força para não desistir.

Agradeço a minha mãe **Rosemary Barbosa de Oliveira**, por toda dedicação e por nunca ter desistido de mim. Por acreditar nas minhas escolhas e me apoiar em todos os momentos da minha vida. Você é o meu maior exemplo de honestidade, caráter, força e bondade. Mãe, você é o meu porto seguro e se eu cheguei onde estou hoje, sem dúvida devo isso a você.

Ao meu pai, **Valdir Ferreira Gonçalves**, por todo esforço em sempre estar presente na minha vida, mesmo com tantos quilômetros nos separando. Por ser compreensivo, amigo, companheiro. Você é o homem da minha vida!! Obrigada por tudo.

Ao meu segundo pai, **Maurício de Oliveira Camargo** por sempre zelar por mim, me incentivando e passando segurança, principalmente quando o motivo é estudo. Obrigada por acreditar em mim, tenho sorte de ter uma pessoa como você na minha vida.

A minha segunda mãe, **Nádia Rodrigues Gonçalves** pelas conversas noite adentro, pela amizade, carinho e confiança. Por toda ajuda que sempre me prestou quando precisei.

A minha irmã de coração, **Ana Flávia Inocêncio Camargo**, por toda a cumplicidade, amizade e incentivo que me dá! Pela ajuda na minha mudança para Bauru e eventuais visitas!

A minha irmãzinha, **Marieva Rodrigues Gonçalves**, que mesmo tão pequena tem uma importância gigantesca na minha vida e na realização deste trabalho, tudo o que faço direta ou indiretamente é por você, minha “porpeta”. Agradeço pelos beijos, risadas e abraços mais sinceros do mundo.

Aos meus avós **Maria Odelita Barbosa de Oliveira** e **Edgard Pinheiro de Oliveira**, por servirem de exemplo nas mais diversas situações. Vô, foi do senhor que herdei a paixão pela docência, obrigada pelos incentivos. Vó, obrigada por me mostrar a humildade é a maior das faculdades que alguém pode ter, pelas orações que me protegeram e ajudaram a manter a fé durante essa jornada.

Aos meus avós **Laudemiro Gonçalves** e **Aníbal Ferreira Gonçalves** por serem a base da família, sempre dispostos a ajudar. Por torcerem por mim apesar de toda a distância.

A minha tia, **Selma Regina Barbosa de Oliveira** que sempre contribuiu para a realização dos meus sonhos, por apoiar e confiar no meu potencial.

Aos meus avós, **Ana Nogueira Camargo** e **José de Oliveira Camargo** (*in memoriam*), a minha tia **Ana Maria Nogueira Camargo**, ao meu primo-irmão **Fábio Augusto Camargo Abrantes** e **Rubia**, ao meu primo **Pedro Henrique** e **Mariana**, por ser a minha segunda família, apoiarem, incentivarem e estarem sempre presentes.

Aos de mais familiares que sempre me deram apoio e incentivo.

Ao meu namorado **Henrique Celestino Lima e Silva**, pela força transmitida, pela paciência, amizade, dedicação, lealdade, respeito e a cima de tudo pelo amor demonstrado em todo o caminho que já percorremos juntos. Agradecer-te não é um

gesto que se põe em papel, mas algo que se partilha ao longo da vida. No entanto.. Obrigada!

Ao **Gilberto Celestino Silva** e **Margarida Silva** por me acolher como filha e por todo carinho.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é por que cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

Tenho muito a agradecer a todos que cruzaram o meu caminho no decorrer do período de realização do mestrado, deixando um pouco de si e levando um pouco de mim. Os momentos de alegria me fizeram acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento contribuíram para um crescimento pessoal único.

Aos professores da banca examinadora: **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo** e **Prof. Dr. Domingos Donizeti Roque**, por aceitarem o convite de participar desta banca. Obrigada pelo apoio e consideração.

Ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues** pelo convívio no departamento de Anatomia, e por ser sempre tão educado e atencioso.

Agradeço a todos os demais professores da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, que por meio de suas disciplinas transmitiram conhecimentos, atenção e apoio durante esses dois anos. Em especial a **Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães** e **Profa. Dra. Silvia Helena de Carvalho Sales Peres**, duas mulheres dignas de admiração e gratidão.

A **Karina Torres Pomini Puzipe** pela ajuda no período do tratamento dos animais e aos demais pós-graduandos do departamento de Anatomia: **Íris German**, **Dayane Nogueira** e **Marcelie Rosso**.

Aos funcionários do departamento da Anatomia: **Daniela, Ovídio e Romário**, obrigado pelo esforço de ajudar sempre que requisitados.

À secretária do departamento, **Vera Lúcia Rufino Rosa** por sempre estar disposta a ajudar.

Aos funcionários do laboratório da disciplina de Histologia, **Daniele Santi Ceolin, Tânia Mary Cestari e Patrícia de Sá Mortágua Germino**, por sempre me receberem tão bem e me ensinarem tudo o que foi necessário desde a confecção das lâminas até a análise histomorfológica.

À **Profa. Dra. Daniela Vieira Buchaim**, que me aceitou na monitoria de Anatomia durante a Graduação, obrigada por sempre ser tão prestativa e atenciosa comigo.

Aos amigos conquistados durante esses dois anos:

*“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre,
jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só”*

Amir Klink

Cleuber Rodrigo de Souza Bueno, pelos ensinamentos durante os meus primeiros passos na vida acadêmica, um exemplo de pessoa, amigo e pesquisador.

Letícia Rossi Daré, pelo ouvido que escutou tantas reclamações e pelas risadas que amenizavam o stress diário. Admiro seu caráter, seu esforço e dedicação.

Geraldo Marco Rosa Júnior, muito obrigada pela ajuda, ensinamentos, orientações e contribuições. Por sempre estar à disposição e me fazer acreditar que tudo daria certo.

Mizael Pereira, não tenho palavras pra agradecer tudo o que fez por mim! Obrigada pelo apoio de sempre, pelas palavras, risadas, ajudas e companheirismo! Torço muito por você!!

Idvaldo Favareto Júnior e Daniel Ventura Dias, pela companhia nos dias de trabalho e pela ajuda nas pesquisas. Obrigada pela oportunidade de ter convivido com vocês.

Aos novos amigos, no entanto muito especiais:

Patrícia Carla Ribeiro, Letícia Mesquita Silva e Vinícius Cavassini, conhecer vocês foi sem dúvida a melhor coisa que aconteceu esse ano. Sinto como se sempre tivessem existido, e não consigo imaginar minha vida sem vocês. Obrigada meus amores, por todos os momentos, pelas risadas, pelas noites de estudo, pelo companheirismo diário, vocês são parte de mim e fazem parte dessa conquista.

Ellen Cristina Gaetti Jardim, “cunhada” me falta palavras pra agradecer tudo o que fez por mim, tanto profissionalmente quanto pessoalmente falando. Obrigada pela amizade, apoio, incentivo e ajuda direta na elaboração da dissertação.

A amiga de longa data:

Bruna Silva Oliveira, agradeço todos os momentos em que dividimos alegrias e tristezas. Apesar dos desencontros, saiba que eu nunca vou esquecer cada dia, cada conversa, cada choro, cada risada, cada festa, cada fofoca ou mesmo cada silêncio. Você estará para sempre guardada num lugar especial do meu coração.

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos dirigentes (diretoria, vice-diretores, colegiados, comissões assessoras) da Faculdade de Odontologia de Bauru, nominando a atual diretora, **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização e formatação desta pesquisa, em especial aos funcionários do Biotério, da Biblioteca e da secretaria de Pós-graduação.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que por meio do projeto 2010/16.883-0, coordenado pelo Prof. Dr. Rogério Leone

Buchaim, possibilitou a aquisição de material de consumo e permanente utilizado em nosso trabalho.

À **CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo de Mestrado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao **Prof. Orientador Rogério Leone Buchaim**, pela orientação e por sempre acreditar que eu era capaz.

Foi no ano de 2008, quando entrei no curso de Odontologia da UNIMAR, que tive a minha primeira aula sobre Anatomia Humana. Lembro claramente como fiquei encantada com toda a história por trás dessa Ciência, foi neste instante que meu interesse por ela começou e quem ministrou essa aula foi você.

Os dias foram passando e o que salvava minha rotina quase que totalmente teórica, eram as aulas de Anatomia Humana de segunda-feira de manhã. Nos anos que seguiram, fui monitora ao seu lado e ao lado de professores os quais também sou eternamente grata, Prof. Domingos e Profa. Daniela.

E hoje, depois de quase 7 anos de trabalho juntos, é sob sua orientação que obterei o título de Mestre, o que significa muito pra mim, já que foi você que me apresentou essa paixão chamada Anatomia!

Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, puxões de orelha, palavras de incentivo, paciência e dedicação.

Você é uma pessoa incrível, na qual busco inspiração para me tornar melhor em tudo que faço e farei daqui para frente. Tenho muito orgulho em dizer que um dia fui sua orientada.

MUITO OBRIGADA!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo da Vinci

RESUMO

O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente é um selante biológico, constituído por componentes provenientes do plasma sanguíneo cujo mecanismo de ação se assemelha à última fase da coagulação fisiológica (formação do fibrinogênio). Ele tem sido utilizado no tratamento de lesões como colagem de tecidos moles, no entanto não existem evidências suficientes sobre a sua aplicação na estabilização de enxertos ósseos. Os enxertos, para serem efetivos no seu propósito, de reconstruir perdas ósseas, necessitam de vascularização e estabilização. Visto isso, este trabalho teve por objetivo avaliar, por meio de análise histológica e histomorfométrica, se o adesivo de fibrina promove fixação de enxerto do tipo onlay em calvária de ratos, e observar se o uso da laserterapia de baixa potência auxilia nesse processo. Foram utilizados 40 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), separados aleatoriamente em dois grupos (EI e EII), nos quais foi realizada uma secção circular com uma broca trefina de 5 milímetros no osso parietal direito e a descorticalização do osso parietal esquerdo com uma broca esférica número 6. No grupo EI foi realizada a colagem do fragmento retirado do lado direito sobre o osso parietal esquerdo com adesivo de fibrina, e no Grupo EII os mesmos procedimentos do Grupo EI, associando-se a terapia por laser de baixa potência. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados nos períodos de 10, 20, 30 e 40 dias após a cirurgia. Após inclusão histológica de rotina, as peças foram submetidas à análise histológica e histomorfométrica. Observou-se, em ambos os grupos, a presença de tecido conjuntivo entre o enxerto autógeno e o leito receptor, que foi gradualmente transformando-se em tecido osteóide. No período final de análise o tecido conjuntivo encontrava-se quase ausente, sem evidência de reação inflamatória e tecido ósseo neoformado unindo o enxerto ao leito receptor em grande área da interface, ocorrendo uma regeneração óssea parcial. Na análise histomorfométrica, observou-se um melhor desempenho do laser no processo de formação de novo osso quando se comparou o Grupo EII com Grupo EI, nos mesmos períodos, demonstrando diferenças significativas em todos os períodos analisados. Conclui-se que o adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente promoveu regeneração óssea parcial em enxerto do tipo onlay fixado em calvária, e

que a laserterapia de baixa potência promoveu uma melhora nos resultados desse processo de regeneração.

Palavras-chave: Adesivo tecidual de fibrina. Regeneração óssea. Terapia a laser de baixa intensidade. Transplante ósseo.

ABSTRACT

Repair of autogenous bone graft stabilized with fibrin adhesive. Histologic and histomorphometric analysis

The fibrin tissue adhesive derived from snake venom is a biological sealant constituted of components from blood plasma whose mechanism of action is similar to the last phase of physiological coagulation (formation of the fibrinogen). It has been used to treat injuries such as collagen soft tissue; however there is insufficient evidence on its application in the stabilization of bone grafts. A graft, to be effective to this purpose, to rebuild bone loss requires vascularization and stabilization. Seen it, this study aimed to evaluate, by means of histological and histomorphometric analysis, if the fibrin glue promotes fixation of the onlay graft type in rat calvaria, and observe whether the use of low level laser therapy assists in this process. 40 Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were randomly separated into two groups (EI and EII), in which was performed a circular perforation with a trephine drill of 5 mm in the right parietal bone section and nine small perforations the left parietal bone using a spherical drill number 6. In EI group the fragment removed of the right side was glued over the left parietal bone with fibrin tissue adhesive, and the same procedures of group EI was made in the EII group, associating with low-level laser therapy. Five animals from each group were euthanized on days 10, 20, 30 and 40 days after surgery. After histological routine inclusion, the pieces were subjected to histological and histomorphometric analysis. It was observed in both groups, the presence of the connective tissue between the allograft and the recipient bed, which was gradually transformed into osteoid tissue. In the final period of analysis, the connective tissue was almost absent, with no evidence of inflammatory reaction and neoformed bone uniting the graft to the recipient bed in great area of the interface, occurring a partial bone regeneration. In histomorphometric analysis, we observed a better laser performance in the training process of new bone when compared Group EII with EI Group, in the same periods, demonstrating significant differences in all periods analyzed. The conclusion of this study is that the fibrin adhesive derived from snake venom promoted partial bone regeneration in onlay graft type fixed in calvaria, and that low-level laser therapy promoted an improvement in the results of the regeneration process.

Key words: Fibrin tissue adhesive. Bone regeneration. Low-level laser therapy. Bone transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Imagens da sala do biotério utilizado para manutenção dos animais. A e B: Sistema de manutenção da temperatura; C: Sistema de manutenção dos ciclos de 12 horas de luz.....	50
Figura 2 -	A: Caixas utilizadas na pesquisa, com etiquetas especificando o grupo e o período.....	50
Figura 3 -	Laserpulse e caneta (Ibramed).....	51
Figura 4 -	A: Couro cabeludo do animal após a tricotomia; B: Incisão realizada com lâmina de bisturi nº 15; C: Afastamento dos tecidos até o periósteo com cureta Molt nº 2-4; D: Visualização dos ossos parietais.....	52
Figura 5 -	A e B: Broca trefina 5 mm (Neodent® - Curitiba/PR).....	53
Figura 6 -	A: Osteotomia circular feita no osso parietal direito e descorticalização no osso parietal esquerdo; B: Remoção do enxerto ósseo tipo onlay; C: Inserção da cola feita com micropipeta; D: Enxerto em posição.....	54
Figura 7 -	A: Reposicionamento dos tecidos para sutura por planos; B: Sutura do plano profundo com nylon 4-0; C: Sutura do plano superficial com nylon; D: Aplicação da solução de PVPI tópico sobre a sutura.....	55
Figura 8 -	A e B: Micrótomo Leica® RM2245.....	56
Figura 9 -	A e B: Computador com microscópio óptico (OLYMPUS BX 50) e câmera fotográfica acoplada (OLYMPUS DP-71).....	57
Figura 10 -	Demonstrativo da análise histomorfométrica. A espessura de cada corte foi medida a 0,5 mm de intervalo e a média da espessura vertical foi calculada.....	57
Figura 11 -	Fotomicrografia do Grupo Experimental EI corados em HE. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embricamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (✕).....	62

Figura 12 - Fotomicrografia do Grupo Experimental EI corados em Tricômico de Masson. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embricamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (✖).....	63
Figura 13 - Fotomicrografia do Grupo Experimental EII corados em HE. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (✖).....	65
Figura 14 - Fotomicrografia do Grupo Experimental EII corados em Tricômico de Masson. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embricamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (✖).....	66
Figura 15 - Representação gráfica das variáveis mensuradas: Espessura total (A) e Interface (B), no Grupo Experimental EI.....	67
Figura 16 - Representação gráfica das variáveis mensuradas: Espessura total (A) e Interface (B), no Grupo Experimental EII.....	68
Figura 17 - Representação gráfica da comparação da Interface entre os grupos experimentais EI e EII nos períodos de 10 dias (A), 20 dias (B), 30 dias (C) e 40 dias (D).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades de cada tipo de enxerto em relação aos mecanismos de neoformação.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CEVAP	Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
RNA-m	Messenger Ribonucleic Acid – Ácido ribonucleico mensageiro
CO ₂	Dióxido de Carbono
mm	Milímetro
LLLT	Low-Level Laser Therapy – Terapia por laser de baixa intensidade
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
USP	Universidade de São Paulo
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
GC	Grupo Controle
GEI	Grupo Experimental I
GEII	Grupo Experimental II
µl	Microlitro
J/cm ²	Joules/centímetro quadrado
cm	Centímetro
PVPI	Iodopovidona
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ANOVA	Análise de Variância
GaAlAs	Gallium-Aluminum-Arsenide – Arseneto de gálio e alumínio

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ENXERTOS ÓSSEOS	33
2.1.1	HISTOLOGIA ÓSSEA	33
2.1.2	REGENERAÇÃO ÓSSEA	33
2.1.3	ENXERTOS ÓSSEOS	35
2.2	ADESIVO TECIDUAL	36
2.2.1	ADESIVO TECIDUAL DE FIBRINA	36
	ADESIVO TECIDUAL DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE	
2.2.2	SERPENTE	38
2.3	TERAPIA POR LASER	39
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
4.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	51
4.3	EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES	55
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA	56
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS	59
5.1.	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS	61
5.1.1	GRUPO EI	61
5.1.2	GRUPO EII	64
5.2	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS	67
5.2.1	GRUPO EI	67
5.2.2	GRUPO EII	68
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXOS	95

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os enxertos são uma maneira de tratar defeitos ósseos, que podem resultar dos processos de uma doença, por um defeito pós-trauma, pós-operatório ou ainda, ser de origem congênita (HÄMMERLE et al., 1997).

O osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro para enxertia, pois se torna vascularizado e osseointegrado com osso circundante, minimizando assim o risco de fratura, infecção ou deslocamento (ROGERS; GREENE, 2012).

A fixação de enxerto é um procedimento fundamental para o processo normal de regeneração óssea, para isso, maneiras físicas e/ou químicas vêm sendo utilizadas (LIN et al., 1990).

Atualmente o método de fixação de enxertos ósseos, do tipo onlay, mais utilizado são os parafusos de titânio. Porém, tem se associado inúmeras desvantagens a essa técnica. Inicialmente devemos considerar o fato de que os sistemas de fixação são complexos, o que requer experiência profissional para sua correta utilização, e a alta tecnologia empregada para o desenvolvimento e fabricação desses sistemas, que tornam o custo desses materiais relativamente elevado, trazendo desvantagens com a sua aplicação.

Quando já instalado, outros fatores podem ser observados tais como: corrosão no sítio implantado, afrouxamento dos parafusos, infecção, produção de artefatos em exames de ressonância magnética e tomografia, reabsorção do osso alveolar e sensibilidade ao frio. Em áreas onde a pele ou mucosa sobrejacente é mais delgada, os parafusos podem se tornar visíveis e/ou palpáveis. Uma vez expostos trazem um desconforto para os pacientes, aumentam o risco de infecção e perda total do enxerto fixado. Além disso, enxertos pequenos e mais frágeis muitas vezes são inadequados para suportar a inserção de um parafuso para sua fixação. (AMARANTE et al., 1995, AHN et al., 1997; GOSAIN et al., 1998; SHERMAK et al., 1998; CHACON et al., 2004; RAGHOEBAR et al., 2006).

Em decorrência desses inconvenientes aumentou o interesse por técnicas alternativas de fixação de enxertos. Alguns adesivos cirúrgicos que surgiram com o intuito de permitir a síntese segura, rápida e sem cicatrizes resultantes da sutura, hoje são utilizados também para a colagem de enxertos ósseos. Os cianoacrilatos foram os primeiros a serem descritos. (ESTEVES et al., 2014).

Quando utilizados em pele ou mucosa, são eficazes mesmo em superfícies úmidas para substituir a sutura convencional. Possuem uma adesão tecidual rápida (em torno de trinta segundos), sendo sua utilização muito prática. (ODOBASIC et al., 2014).

Outros tipos de adesivos vêm sendo utilizados, como por exemplo, o Tissucol[®], adesivo fibrínico de origem humana e liofilizado. Por ser derivado do sangue, apresenta riscos inerentes a sua utilização, como: risco de embolização, infecções causadas por transfusões sanguíneas, parvovirose B19, sensibilização, com deficiência de fator V e anticorpos antitrombina (KAWAMURA et al., 2002).

Um novo adesivo de fibrina derivada do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*) foi desenvolvido em 1989 por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP, UNESP, Botucatu, SP) visando uma fixação, não somente óssea. O principal objetivo era produzir um adesivo de fibrina, sem usar sangue humano, para evitar a transmissão de doenças infecciosas. O novo adesivo de fibrina pode ser uma ferramenta útil clinicamente, devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações. É um selante biológico e biodegradável, produto que: (1) não produz reações adversas, (2) não contém sangue humano, (3) apresenta uma boa capacidade adesiva, (4) não transmite doenças infecciosas, e (5) pode ser utilizado como coadjuvante em procedimentos de sutura convencional (BARROS et al., 2009).

A otimização da regeneração óssea é um assunto de grande interesse, pois está intimamente relacionada a vários tratamentos como as cirurgias ortopédicas, movimentação ortodôntica, e osseointegração de implantes dentários. Uma das formas que vem sendo utilizada com sucesso neste âmbito é a terapia a laser de baixa potência. A terapia a laser de baixa potência tem sido amplamente utilizada em inúmeras áreas biomédicas, principalmente com objetivo de modular a resposta inflamatória e acelerar o processo de reparo tecidual. (ROCHA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2007).

Adicionalmente, a terapia a laser de baixa potência é eficiente quando utilizada nos estágios iniciais, ou seja, sua eficácia é maior na fase de proliferação celular, em relação às fases de maturação da matriz óssea e de mineralização (FUKUHARA, et al., 2006).

Baseado no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise histológica e histomorfométrica, o processo de reparo de enxerto ósseo

autógeno fixado em calvária de ratos com adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e se a terapia a laser de baixa potência interfere nesse processo.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENXERTOS ÓSSEOS

2.1.1 HISTOLOGIA ÓSSEA

O osso cortical é constituído histologicamente por séries paralelas de ósteons (Sistemas de Havers). Cada ósteon consiste em um Canal de Havers central, rodeado por lamelas concêntricas de osso intercaladas com osteócitos. Ósteons estão ligados uns aos outros e ao perióstio por meio de canais oblíquos chamados canais de Volkmann. O osso trabecular também faz lamelas, mas não possui os sistemas organizados como em osso compacto. Osso trabecular é responsável pela hematopoiese, remodelação óssea e regeneração (OLSEN et al., 2000; MISCH; SILC, 2008; DYM et al., 2012).

Existem 4 grandes tipos diferentes de células competentes para a geração de osso: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteoclastos, e osteócitos. As células osteoprogenitoras são as precursoras dos osteoblastos. Essas células são encontradas no interior do perióstio, endóstio e osso compacto e osso trabecular. Os osteoblastos são encontrados dentro do perióstio e osso trabecular, e são responsáveis pela formação óssea e produzem matriz de colágeno osteóide. Uma vez que os osteoblastos são englobados por osteóides, eles se diferenciam em osteócitos, que atuam na manutenção do osso. Os osteoclastos são derivados dos monócitos e são responsáveis pela reabsorção óssea (OLSEN et al., 2000; MISCH; SILC, 2008; DYM et al., 2012).

2.1.2 REGENERAÇÃO ÓSSEA

O mecanismo de regeneração óssea pode ser primário ou secundário. O mecanismo primário envolve a fixação rígida, onde há a aproximação entre os fragmentos ósseos. Na interface das extremidades, os osteoclastos atravessam a abertura e reabsorvem osso existente. Atrás deles, o tecido fibrovascular e osteoblastos começam a secretar matriz óssea.

O mecanismo secundário envolve a formação de um calo, dentro do qual é secretado osteóide e depois mineralizado. Este processo ocorre em três fases:

inflamatória, reparo e remodelação. Na fase inflamatória, um hematoma se desenvolve no interior do sítio da fratura, enquanto fibroblastos, macrófagos e outras células inflamatórias migrarem para o local. Os resultados da fase de reparo é a formação de tecido de granulação, o crescimento interno do tecido vascular, e migração das células mesenquimais. A matriz osteóide é secretada e subsequentemente mineralizada, o que leva à formação de um calo mole em torno do local de reparo. O calo então ossifica, formando uma ponte de tecido ósseo. A fase de remodelação estende desde meses a anos, com a resistência funcional completa obtida de 4 a 6 meses (OLSEN; REGINATO; WANG, 2000; MISCH; SILC, 2008; DYM; HUANG; STERN, 2012).

A origem, estrutura e tamanho do enxerto irá definir qual o tipo de cicatrização. São três os processos envolvidos na regeneração bem sucedida de um defeito ósseo: osteogênese, osteocondução e osteoindução. Osteogênese é a formação de novo osso por células derivadas a partir de precursores tais como células estaminais mesenquimatosas ou pré-osteoblastos que estão na enxertia material. Osteoindução é a fase que induz a formação de osso a partir da diferenciação de células mesenquimais pelas proteínas osteoindutoras. A osteocondução é caracterizada pelo crescimento ósseo por aposição do osso existente ou sobre o mesmo. Isto facilita o desenvolvimento do osso novo, bem como a integração com o leito receptor (FAYAZ et al., 2011).

A estrutura do osso afeta o modo como o enxerto irá se incorporar no local do leito receptor. Enxertos em bloco vão regenerar através de substituição. Uma vez que o enxerto é fixado ao local, osteoclastos começam a reabsorver o material de enxerto por meio de Sistemas de Havers existentes. Este processo permite o crescimento de tecido fibrovascular e a secreção de matriz osteóide pelos osteoblastos, semelhante à regeneração óssea primária. Ocorre então a mineralização da matriz osteóide. Os enxertos de bloco não são totalmente reabsorvidos e se caracterizam como uma mistura de osso recém-formado em torno de centros necróticos (OLSEN; REGINATO; WANG, 2000; MISCH; SILC, 2008; SITTITAVORNWONG; GUTTA, 2010; DYM; HUANG; STERN, 2012).

2.1.3 ENXERTOS ÓSSEOS

Defeitos ósseos podem decorrer de cirurgias oncológicas, infecções agudas ou crônicas, traumas ou malformações congênitas. O método utilizado para tratar esses defeitos são os enxertos (FRIEDLANDER 1987; GOLDBERG; STEVERSON, 1987).

Os materiais utilizados nas técnicas de enxertia podem ser classificados de acordo com sua origem em Autógenos - quando transplantados de um local para outro do mesmo indivíduo - em Alógenos - quando transplantados entre indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes - em Xenógenos - quando obtidos de um doador de outra espécie e - em Aloplásticos - quando são sintetizados ou processados a partir de materiais presentes na natureza e utilizados como substitutos aos enxertos ósseos (LINDHE; LANG; KARRING, 2010; NAZIRKAR et al., 2014).

São três os mecanismos que podem gerar novo osso: osteogênese, osteocondução e osteoindução. A eventualidade desses mecanismos depende, basicamente, das condições do hospedeiro e do tipo de enxerto escolhido (BLOONQUIST; TURKEY, 1992; MISCH, 2000).

Tabela 01. Propriedades de cada tipo de enxerto em relação aos mecanismos de neoformação (adaptada de MISCH, 2000).

TIPO DE ENXERTO	OSTEOCONDUÇÃO	OSTEOINDUÇÃO	OSTEOGÊNESE
AUTÓGENO	SIM	SIM	SIM
HOMÓGENO	SIM	NÃO	NÃO
HETERÓGENO	SIM	NÃO	NÃO
ALOPLÁSTICO	SIM	NÃO	NÃO

Na década de 1960 os conceitos cirúrgicos e fisiológicos dos enxertos ósseos autógenos foram formados, e desde então têm sido usados em um princípio regular (BOYNE, 1974; GOUIN et al., 1996).

Do ponto de vista biológico, o enxerto ósseo autógeno é o único que possui todas as propriedades citadas anteriormente. Segundo Axhausen, em 1956, a osteogênese se dá em duas fases:

FASE I – Células transferidas do enxerto formam osso, principalmente na porção esponjosa do enxerto, sobrevivem nos primeiros três a quatro dias por suprimento sanguíneo da área receptora, sendo que esse processo se inicia na primeira semana e atinge o pico máximo em quatro semanas. A quantidade de osso que será formada é determinada pela quantidade de células transplantadas.

FASE II – O enxerto induz a área receptora a formar osso. O processo se inicia duas semanas após a cirurgia. É estimulado pela osteoindução e osteocondução, sendo responsável pela incorporação tardia do enxerto, remodelagem e substituição do novo osso. Determina além da quantidade, a qualidade do enxerto.

Cinco anos é o tempo que leva para a incorporação do enxerto autógeno, desde a inflamação até sua remodelagem (SMILER; SOLTAN; LEE, 2007; DONOS; MARDAS; CHADHA, 2008; SOLTAN; SMILER, 2005; MARDAS et al., 2014).

2.2 ADESIVO TECIDUAL

2.2.1 ADESIVO TECIDUAL DE FIBRINA

A fibrina contribui para a mobilidade celular na ferida. O papel da fibrina, a qual é uma proteína de ligação cruzada derivada do fibrinogênio no plasma, não é apenas para servir como um arcabouço ou superfície para a migração de células, mas para reter de plaquetas (PORCELLINI, 2009).

Bergell, em 1909, publicou o primeiro relatório clínico da utilização de compostos de fibrina, com o intuito de proporcionar a hemostasia local com a utilização de compostos de plasma humano.

Grey (1915) relatou a sua aplicação em hemorragia cerebral por meio da confecção de tampões e pequenas placas de fibrina. Brennan, em 1991, relatou o uso de ataduras de fibrina para controlar o sangramento em órgãos parenquimatosos na Primeira Guerra Mundial.

No entanto, a combinação de fibrinogênio autólogo com uma solução de trombina foi relatada pela primeira vez apenas em 1940, quando Young e Medawar descreveram a utilização de produtos plasmáticos em anastomose do nervo

periférico em animais, no qual o resultado foi insatisfatório, devido provavelmente a pouca estabilização, baixa adesão destes produtos e técnicas cirúrgicas subdesenvolvidas.

A utilização de adesivos de fibrina despertou o interesse dos pesquisadores e, nos anos de 1960, desenvolveram-se métodos para a obtenção de um crioprecipitado com grandes quantidades de fibrinogênio o que levou ao seu crescente uso (ALVING et al., 1995).

Em 1980 foi lançado na Europa o primeiro selante de fibrina. No entanto devido ao risco de transmissão de doenças infecciosas, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration proibiu a sua utilização até 1990, uma vez que este adesivo foi sintetizado a partir do sangue humano e animal.

Comercialmente disponíveis, os adesivos teciduais de fibrina são sintetizados a partir de trombina bovina e fibrinogênio humano, que podem transmitir doenças infecciosas e podendo haver também o desenvolvimento de anticorpos contra a trombina bovina.

Resultados desfavoráveis da aplicação do selante de fibrina podem ser divididos entre aqueles relacionados com o produto em si ou aquelas relacionadas aos efeitos adversos após uso clínico (WILSON; PELL; DONEGAN, 1991), além do risco a doenças transmissíveis como hepatite e HIV (DAVIS; SÁNDOR, 1998).

Hino et al. (2000) relataram três casos de transmissão iatrogênica de parvovirose B19 associado ao selante de fibrina. Isto foi atribuído à utilização de inativação viral com calor seco, o que parece ser ineficaz contra o parvovírus. A trombina bovina foi utilizada para reduzir os custos, mas alguns pacientes desenvolveram anticorpos contra a trombina bovina (RAPAPORT et al., 1992; BÄNNINGER et al., 1993; ISRAELS; ISRAELS, 1994).

A atividade dos adesivos de fibrina é baseada na cascata de coagulação natural, na qual a etapa final envolve a conversão do fibrinogênio em fibrina pela trombina, e a ligação cruzada de monômeros de fibrina em um complexo insolúvel. Assim, estas substâncias mediadoras da cascata da coagulação, conduzem à formação de coágulo (LERNER; BINUR, 1990).

2.2.2 ADESIVO TECIDUAL DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE

Tendo as desvantagens dos adesivos teciduais derivados de origem humana em mente, um novo selante de fibrina foi desenvolvido em 1989 por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. O principal objetivo foi produzir um adesivo de fibrina sem o uso de sangue humano, para evitar a transmissão de doenças infecciosas.

Os componentes deste novo selante foram extraídos a partir de animais de grande porte e uma proteinase serina extraída do veneno de serpente (*Crotalus durissus terrificus*). A aplicabilidade deste selante foi testada em animais e seres humanos com resultados benéficos. O novo selante de fibrina pode ser um instrumento útil clinicamente devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações.

Como já dito anteriormente, este adesivo fibrínico (1) não produz reações adversas, (2) não contém o sangue humano, (3) tem uma boa capacidade adesiva (4), não transmite doenças infecciosas, e (5) pode ser utilizado como um adjuvante em procedimentos de sutura convencionais (BARROS et al., 2009).

A eficácia deste novo selante de fibrina é relatada na literatura, havendo de resultados satisfatórios quando utilizado em animais visando reparos nervosos (IUAN et al., 1995; VITERBO; FRANCIOSI; PALHARES, 1995; CHALHOUB et al. 2000; SILVA et al., 2012; VITERBO et al., 2012) e reparos teciduais (RAHAL et al., 2004; FERRARO et al., 2005; SAMPAIO et al., 2007).

Em humanos, Stolf realizou em 1999 um estudo pioneiro para avaliar a eficácia do selante de fibrina em vinte e um pacientes com carcinoma celular basal na região e os resultados comparados com as suturas convencionais. Após a remoção do tumor, nas áreas excisadas foi feito enxerto de pele, sendo que do lado esquerdo usou-se o adesivo e o direito sutura. O lado do adesivo apresentou menor reação inflamatória, maior resultado estético e não houve efeitos adversos locais ou sistêmicos, tornando-o uma alternativa valiosa em cirurgia da pele. Essa eficácia em reparo tecidual foi descrita também por Chiquito (2007), Barbosa, Gregghi e Passanezi (2007), Barbosa et al. (2008) e Gatti (2009).

Barbizan et al. (2013) descreveram a utilização da cola de fibrina extraída do veneno de cascavel para tratamento cirúrgico de avulsão de nervos conectando os cotos rompidos. Os seus resultados sugerem a manutenção do microambiente neuronal com aumento dos níveis de RNA-m e citocinas pró-inflamatórias o que segundo os mesmos levaria a recuperação neurogênica em menor intervalo de tempo retornando a função.

Lendeckel et al. (2004) demonstraram o uso da cola de fibrina associada a células adiposas de origem autógena no tratamento de defeito traumático extenso em calvária em criança, demonstrando formação de osso completa três meses após o procedimento cirúrgico o que segundo os autores deva ser reproduzido, *in vivo* e experimentalmente, afim de constatar a eficácia da associação.

Nota-se, no entanto, a falta de relato bibliográfico quanto ao uso do adesivo de fibrina na fixação de enxertos ósseos.

2.3 TERAPIA POR LASER

O termo laser originou-se da abreviação de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, cuja teoria é creditada ao físico Albert Einstein (Apud VEÇOSO, 1993). Define-se laser como sendo uma luz amplificada, produzida por radiação eletromagnética, que se manifesta como luz monocromática (ROCHA, 2004).

Desde sua concepção o laser passou a ser utilizado na medicina, principalmente no pós-cirúrgico. Atualmente o laser chama atenção por auxiliar no processo de cicatrização de tecidos devido a seus efeitos atérmicos, aumentando a resistência mecânica da interface biomaterial e o leito receptor em aproximadamente 8 semanas (FAEDA et al., 2009; SISTI et al., 2012).

A espessura da camada tecidual a ser atingida dependerá do tempo de aplicação, do tipo de laser e da potência usada. A diferença entre os vários tipos de lasers é dada pelo comprimento de onda. Quanto menor o comprimento de onda, maior seu poder de penetração e ação (ROCHA, 2004).

Segundo Colls (1984), o laser pode ser classificado em três diferentes potências:

1. laser de alta potência, exemplo: CO₂, argônio;
2. laser de média potência, exemplo: arseneto de gálio;
3. laser de baixa potência, exemplo: hélio-neônio.

Os lasers de baixa e média potência possuem efeitos terapêuticos que podem ser divididos em primários, secundários e terapêuticos. Os efeitos primários do laser são: bioquímico, bioelétrico e bioenergético (ROCHA, 2004). Segundo Veçoso (1993), os efeitos secundários estimulam o trofismo celular e a microcirculação. Os efeitos terapêuticos alcançados são a analgesia, o efeito cicatrizante, antiinflamatório e antiedematoso (COLLS, 1984).

Dentre os efeitos do laser de baixa potência, a cicatrização é um dos que mais se destaca. Estudos vêm comprovando que a cicatrização óssea pode ser melhorada por meio da aplicação da terapia a laser de baixa potência. (GARAVELLO-FREITAS et al., 2003; ROCHA, 2004; GARAVELLO; BARANAUSKAS; da CRUZ-HOFLING et al., 2004; KAZEM SHAKOURI et al., 2010).

O efeito produzido pelo uso do laser terapêutico se caracteriza pelo princípio da biomodulação, isto é, a utilização da própria matéria prima produzida por nosso organismo para produzir alterações a nível tecidual, que, por sua vez, contribuem para a recuperação de diversas condições patológicas (GUPTA; LYONS; ABRAMOVITS, 2014).

A absorção da radiação laser pelos citocromos das mitocôndrias desencadeia uma cascata de eventos que resulta em uma maior produção de ATP e assim, estimulando o processo de renovação tecidual (TIPHLOVA; KARU, 1989) e fornecendo melhores condições para a multiplicação celular (KARU, 1989). Frequentemente se cita na literatura os efeitos antiinflamatórios, antiedematosos e normalizadores circulatórios produzidos pela terapia a laser de baixa potência (GUPTA; LYONS; ABRAMOVITS, 2014).

Um estudo do efeito da terapia a laser de baixa potência na regeneração óssea foi realizado por Marino et al. (2003), através da experimentação animal, onde se verificou uma aceleração no processo de cicatrização de defeitos criados na tíbia de ratos. Os autores relacionaram os resultados satisfatórios ao possível aumento

na vascularização, à reabsorção mais rápida de exsudatos e ao aumento da atividade fagocitária dos macrófagos, como fatores que possam ter contribuído para uma regeneração óssea mais ativa.

Conforme os experimentos de Ninomiya et al. (2007) a irradiação laser promove a atividade de um maior número de osteoblastos e faz decrescer o número de osteoclastos, sugerindo que a terapia a laser ativa a regeneração óssea devido ao decréscimo do número e da atividade dos osteoclastos.

Estes resultados foram reforçados por Kim et al., (2007) e Kimura et al., (2001) que estudaram os efeitos da terapia a laser nos processos de osteoclastogênese na movimentação dentária induzida, relacionando o estímulo ao aumento da velocidade de movimentação por aumento do metabolismo de proteínas essenciais na proliferação osteoblástica. Um aumento quantitativo dessas proteínas induzida pelo laser seria responsável pela inibição dos osteoclastos produzindo assim maior volume de osso e menos reabsorção do mesmo.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO**OBJETIVO GERAL**

Avaliar se o adesivo de fibrina promove fixação de enxerto do tipo onlay em calvária de ratos, e observar se o uso da laserterapia de baixa potência auxilia nesse processo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se ocorre regeneração óssea em enxerto do tipo onlay fixado em calvária por meio de adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente;
- Verificar a influência da laserterapia na regeneração óssea do enxerto ósseo tipo onlay;

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, de acordo com o protocolo nº 012/2012, em 25 de julho de 2012.

Os procedimentos cirúrgicos e as análises histomorfométricas foram realizadas no Laboratório da Disciplina de Anatomia, no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa esteve composta por 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (3 meses de idade), machos, com média de peso de 312 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) – Campus de Bauru – SP.

A sala do Biotério possuía iluminação artificial comandada por “timer” respeitando ciclos de 12 horas de luz, em temperatura média de 21°C. Os animais foram mantidos sem restrições na movimentação, em caixas apropriadas com cinco animais em cada, com um comedouro e um bebedouro por caixa, para o consumo de água e ração “ad libitum” (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – Imagens da sala do biotério utilizado para manutenção dos animais. A e B: Sistema de manutenção da temperatura; C: Sistema de manutenção dos ciclos de 12 horas de luz.

Figura 2 – A: Caixas utilizadas na pesquisa, com etiquetas especificando o grupo e o período.

Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos experimentais, assim constituídos:

1. **Grupo Experimental I - EI:** Constituído de vinte animais, nos quais foi feita uma osteotomia circular no osso parietal direito. No osso parietal esquerdo fez-se a descorticalização com broca esférica nº 6. O fragmento obtido do lado direito foi colado no lado esquerdo, com o adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente.

3. **Grupo Experimental II - EII:** Constituído de vinte animais, nos quais foi realizada uma osteotomia circular no osso parietal direito e no osso parietal esquerdo efetuou-se a descorticalização com broca esférica nº 6. O fragmento obtido do lado direito foi colado com o adesivo de fibrina, derivado de veneno de serpente, no lado esquerdo e submetido à aplicação de laser com comprimento de onda de 830 nm – GaAlAs (gallium-aluminum-arsenide) de pulso contínuo (Figura 3).

Figura 3 - Laserpulse e caneta (Ibramed).

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram submetidos à anestesia geral pela injeção intramuscular na parte posterior da coxa esquerda, com o uso de Cloridrato de Xilazina (10mg/kg - Anasedan[®], Vetbrands, São Paulo, Brasil) associada à Cloridrato de Ketamina (50mg/kg - Dopalen[®], Vetbrands, São Paulo, Brasil).

Realizou-se a tricotomia na parte superior da cabeça com aparelho de barbear, e desinfecção da área cirúrgica (região frontoparietal) com Clorexidina 2%.

Em seguida, com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão longitudinal mediana no couro cabeludo, sobre a sutura sagital da calvária, com aproximadamente 20 mm de comprimento. Após a incisão, afastaram-se os tecidos até o periósteo, para visualização dos ossos parietais (Figura 4).

Figura 4 – A: Couro cabeludo do animal após a tricotomia; B: Incisão realizada com lâmina de bisturi nº 15; C: Afastamento dos tecidos até o periósteo com cureta Molt nº 2-4; D: Visualização dos ossos parietais.

No Grupo Experimental I (EI), realizou-se uma osteotomia circular no osso parietal direito, com broca trefina 5 mm (Figura 5, Neodent® - Curitiba/PR), em baixa rotação, sob irrigação constante de Cloreto de Sódio a 0,9%, para se obter um fragmento de osso arredondado, preservando a integridade da dura-máter e cérebro. No lado esquerdo, no local que recebeu o enxerto, o osso parietal foi previamente descorticalizado realizando-se 9 perfurações com broca esférica nº 6. Os fragmentos de osso, coletados do lado direito foram colados com adesivo de fibrina.

Figura 5 – A e B: Broca trefina 5 mm (Neodent® - Curitiba/PR).

O adesivo de fibrina, fornecido pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, UNESP/BOTUCATU-SP), utilizado neste estudo, é composto por três soluções separadas e homogeneizadas antes de sua aplicação, totalizando 80µl. O primeiro frasco possui fibrinogênio obtido a partir de sangue de búfalo (50µl), o segundo contém cloreto de cálcio (20µl) e, o último frasco possui uma fração de trombina-like (10µl).

Para aplicação em cada animal os componentes do adesivo foram depositados de forma perpendicular na interface entre enxerto e leito receptor. Para cada solução aplicada foi realizada a troca da ponteira da micropipeta. Ao final da aplicação dos três componentes, o enxerto ósseo onlay foi colado em posição e esperou-se 10 segundos para secagem da cola, para posterior realização da sutura por planos (Figura 6).

Os animais do Grupo Experimental II (EII) foram submetidos aos mesmos procedimentos do Grupo EI, sendo associado ao tratamento de laser GaAlAs (gallium-aluminum-arsenide) de pulso contínuo, com comprimento de onda de 830 nm, $6\text{J}/\text{cm}^2$, por 24 segundos/local aplicado, em quatro pontos do local operado. O laser foi mantido em contato com a pele do animal, perfazendo 96 segundos o tempo total de aplicação. O laser foi aplicado no pós-cirúrgico imediato e três vezes por semana, até o período correspondente ao da eutanásia (GIGO-BENATO et al., 2005). Em todas as aplicações, as emissões do feixe de laser foram calibradas no próprio aparelho (Laserpulse IBRAMED).

Figura 6 – A: Osteotomia circular feita no osso parietal direito e descorticalização no osso parietal esquerdo; B: Remoção do enxerto ósseo tipo onlay; C: Inserção da cola feita com micropipeta; D: Enxerto em posição.

Para finalizar o procedimento cirúrgico, os tecidos foram reposicionados individualmente. O periósteo e a pele foram suturados com pontos simples, utilizando-se fio monofilamento de nylon Shalon 4.0. Após a realização da sutura, aplicou-se PVPI tópico sobre o local operado (Figura 7).

Figura 7 – A: Reposicionamento dos tecidos para sutura por planos; B: Sutura do plano profundo com nylon 4-0; C: Sutura do plano superficial com nylon; D: Aplicação da solução de PVPI tópico sobre a sutura.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único operador e seguindo o mesmo padrão da sequência da técnica em cada animal.

4.3 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Decorridos os períodos de 10, 20, 30 e 40 dias pós-cirúrgico, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados por injeção de uma *overdose* do anestésico citado anteriormente.

A calvária foi removida e os ossos parietais foram separados, preservando os tecidos moles supraparietais. As peças foram fixadas em formol a 10% tamponado, por um período de 48 horas. Após esse período, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em EDTA a 10%, trocado a cada 7 dias, para o processo de desmineralização.

As peças desmineralizadas foram submetidas a procedimentos histológicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec - Merck® (parafina + resina sintética).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

As secções histológicas foram realizadas a 5 µm, usando um micrótomo Leica RM2245 (Figura 8), levando em consideração a região central do defeito (de maior diâmetro), e os cortes corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson. Foram padronizados 20 cortes por enxerto (04 a 05 cortes por lâmina), sendo 02 lâminas para avaliação histológica, 03 lâminas que ficaram de reserva.

Figura 8 – A e B: Micrótomo Leica® RM2245.

A análise histológica teve como objetivo avaliar a incorporação dos enxertos ao leito receptor, mais especificamente na interface entre o osso enxertado e a calvária, fazendo uma análise comparativa entre os dois grupos (grupo EI e EII) das diferentes características teciduais encontradas nessa interface. Para a análise histomorfométrica os cortes corados com Tricrômico de Masson foram mensurados quanto a espessura óssea total da área cirúrgica (leito receptor + enxerto autógeno) em 20 diferentes pontos ao longo do corte.

As medidas foram realizadas em imagens capturadas em um microscópio óptico (OLYMPUS BX 50) com câmera fotográfica acoplada (OLYMPUS DP-71), como visualizada na Figura 9. As espessuras verticais do leito receptor mais enxerto ósseo foram determinadas no sistema de análise Image-Pro Plus® 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA), usando uma objetiva de 4X. Para tanto, imagens

de 2 cortes frontais semi-seriados da região do enxerto foram obtidos de cada animal. A espessura de cada corte foi medida a 0,5 mm de intervalo e a média da espessura vertical foi calculada (Figura 10).

Figura 9 – A e B: Computador com microscópio óptico (OLYMPUS BX 50) e câmera fotográfica acoplada (OLYMPUS DP-71).

Figura 10 – Demonstrativo da análise histomorfométrica. A espessura de cada corte foi medida a 0,5 mm de intervalo e a média da espessura vertical foi calculada.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise quantitativa foi realizada no computador, utilizando-se o programa ImagePro-Plus® 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA).

Para a compreensão estatística, para análise de espessura total e interface, no mesmo grupo, nos diferentes períodos, foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey. O nível de significância para as considerações foi determinado em $p < 0.05$.

Na análise de espessura total e interface, no mesmo período, nos grupos estudados (EI e EII), foi utilizado o *test t* não pareado, com nível de significância $p < 0,05$.

O programa utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

5 Resultados

5 RESULTADOS**5.1 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS**

Em todos os animais dos grupos experimentais EI e EII foi observado, nos cortes transversais, a presença de tecido conjuntivo entre o enxerto autógeno e o leito receptor, que foi gradualmente transformando-se em tecido osteóide. Os resultados serão descritos a seguir de acordo com os grupos EI e EII.

5.1.1 GRUPO EI

No grupo EI, os cortes microscópicos tanto em Hematoxilina e Eosina quanto com a coloração de Tricrômico de Masson, em objetiva de 40x, se evidenciou a presença de um tecido conjuntivo bem organizado nos períodos iniciais do processo de reparo (10 e 20 dias) e que foi gradativamente dando lugar a uma matriz osteóide nos períodos finais analisados (30 e 40 dias) com áreas de reabsorção e neoformação óssea, sobretudo nas áreas contíguas ao defeito criado (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Fotomicrografia do Grupo Experimental EI corados em HE. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embridamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (✕).

Figura 12 – Fotomicrografia do Grupo Experimental EI corados em Tricômico de Masson. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embricamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (*).

No período de 10 dias, notou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso por toda a interface, sem evidência de reação inflamatória.

No período de 20 dias, o tecido conjuntivo apresentava-se com presença de células gigantes, indicando intensa proliferação celular, sem evidência de reação inflamatória. Notou-se a presença de uma quantidade discreta de tecido ósseo neoformado, especialmente próximo às áreas de embricamento.

No período de 30 dias, o tecido conjuntivo encontrava-se em menor quantidade e mais desorganizado, sem evidência de reação inflamatória. Notou-se a

presença de uma quantidade considerável de tecido ósseo neoformado, próximo as áreas de embricamento e também no restante da interface.

No período de 40 dias, o tecido conjuntivo encontrava-se quase ausente, sem evidência de reação inflamatória e tecido ósseo neoformado unindo o enxerto ao leito receptor em grande área da interface, ocorrendo uma regeneração óssea parcial.

5.1.2 GRUPO EII

No grupo EII, observou-se um atraso significativo até o período de 20 dias com a presença acentuada de células gigantes multinucleadas evidenciando uma fase de reabsorção intensa. Posteriormente a esse período foi constatada pontos de neoformação óssea muito mais evidente do que no grupo EI com áreas de formação óssea (Figuras 13 e 14).

Figura 13 – Fotomicrografia do Grupo Experimental EII corados em HE. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (*).

Figura 14 – Fotomicrografia do Grupo Experimental EII corados em Tricômico de Masson. Objetiva de 40x. A - 10 dias; B - 20 dias; C - 30 dias; D - 40 dias. Enxerto ósseo (★) Leito receptor (●), área de embricamento (▲), tecido conjuntivo (↓), tecido ósseo neoformado (*).

No período de 10 dias, notou-se a presença de tecido conjuntivo fibroso por toda a interface sem evidência de reação inflamatória, semelhante ao encontrado no Grupo Experimental EI.

No período de 20 dias, o tecido conjuntivo apresentava-se desorganizado com presença de células gigantes, indicando intensa proliferação celular, sem evidência de reação inflamatória, e presença de quantidade moderada de tecido ósseo neoformado, especialmente próximo às áreas de embricamento.

No período de 30 dias, o tecido conjuntivo apresentava-se em menor quantidade, sem evidência de reação inflamatória, e presença de boa quantidade de

tecido ósseo neoformado, próximo as áreas de embricamento e também no restante da interface.

No período de 40 dias, observou-se uma camada delgada de tecido conjuntivo, sem evidência de reação inflamatória, e tecido ósseo neoformado unindo o enxerto ao leito receptor em grande área da interface, ocorrendo uma regeneração óssea parcial.

5.2 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS

5.2.1 GRUPO EXPERIMENTAL EI

Na mensuração da espessura total, observou-se diferença significativa entre o período de 20 dias quando comparado ao período de 30 dias (Figura 15).

Na mensuração da interface, observou-se diferença significativa entre os períodos de 10 e 20 dias quando comparados aos períodos de 30 e 40 dias (Figura 15).

Figura 15 – Representação gráfica das variáveis mensuradas: Espessura total (A) e Interface (B), no Grupo Experimental EI.

a,b,c- Letras diferentes indicam diferença significativa.

5.2.2 GRUPO EXPERIMENTAL EII

Na mensuração da espessura total, não se observou diferença significativa entre os períodos analisados (Figura 16).

Na mensuração da interface, observou-se diferença significativa entre os períodos de 10 e 20 dias quando comparados aos períodos de 30 e 40 dias (Figura 16).

Figura 16– Representação gráfica das variáveis mensuradas: Espessura total (A) e Interface (B), no Grupo Experimental EII.

a,b- Letras diferentes indicam diferença significativa.

5.2.3 GRUPO EXPERIMENTAL EI X GRUPO EXPERIMENTAL EII

Na análise histomorfométrica, observou-se um melhor desempenho do laser no processo de neoformação óssea quando se comparou o Grupo Experimental EII com Grupo Experimental EI, nos mesmos períodos, demonstrando diferenças significativas em todos os períodos analisados (Figura 17).

Figura 17 – Representação gráfica da comparação da Interface entre os grupos experimentais EI e EII nos períodos de 10 dias (A), 20 dias (B), 30 dias (C) e 40 dias (D).

a,b- Letras diferentes indicam diferença significativa.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste estudo objetivou-se avaliar se o adesivo de fibrina promove fixação de enxerto do tipo onlay em calvária de ratos, e observar se o uso da laserterapia de baixa potência auxilia nesse processo. Após as análises, conclui-se que o adesivo de fibrina promoveu integração óssea parcial em enxerto do tipo onlay fixado em calvária, e que a laserterapia de baixa potência auxiliou nesse processo de regeneração.

Não existe o material para enxertia dito ideal, mas o osso autógeno é consagrado na literatura mundial como o que consegue reunir características próximas ao ideal quando comparado aos demais tipos de substitutos ósseos. Possui como principal vantagem seu potencial de integração ao sítio receptor capaz de fornecer células viáveis à formação óssea por meio da osteogênese, osteoindução e osteocondução (KONTIO, 2004; JENSEN et al., 2006).

O processo de formação óssea tem atraído calorosas discussões no meio científico. É sabido que a reconstrução óssea pode ser obtida, basicamente, com a aplicação de diversos estímulos sejam eles químicos ou físicos, como o uso dos biomateriais, o ultrassom e o uso do laser de baixa potência (ALBERIUS et al., 1996; ALBERIUS; GORDH, 1998).

Neste sentido, o uso dos biomateriais vem ganhando grande apelo na área da saúde, sobretudo na cirurgia bucomaxilofacial. Uma grande variedade de adesivos teciduais sintéticos como os cianoacrilatos, polisiloxanes, poliuretanes, cola de silicone, cola de gelatina e própolis têm sido utilizados nos mais diversos tratamentos (PAPATHEOFANIS; BARMADA, 1993; AKAGAWA et al., 2009).

A fim de constatar a aplicabilidade clínica dos biomateriais, a calvária de ratos adultos como modelo experimental possui vantagens para o reparo ósseo, em virtude da sua semelhante composição óssea com a mandíbula, o que a levou a ser amplamente utilizada para avaliação da osseointegração como evidenciado pela literatura (KHADRA et al., 2005; IATECOLA et al., 2013) e utilizado neste trabalho.

A utilização desses adesivos sintéticos como os cianoacrilatos, polisiloxanes e polímeros do acetato, embora levem a uma imediata e consistente adesão, mimetizando as fases finais do processo de formação de coagulação (HERMETO et al., 2012), são tóxicos e deste modo não apropriados (SHETA; HIDA; McCUEN, 1990; PAPATHEOFANIS; BARMADA, 1993).

Os adesivos de fibrina comerciais (Tisseel[®] e Tissucol[®], Immuno AG, Viena, Áustria) são apresentados de forma liofilizada, produzidos a partir do sangue de doadores e não são licenciados para uso clínico na Grã-Bretanha e nos Estados Unidos, devido ao risco de doenças transmissíveis (EPSTEIN et al., 1986; DAVIS; SÁNDOR, 1998). Como mencionado anteriormente, a utilização destes adesivos convencionais ainda há, embora pequeno, o risco de hepatite B e vírus da imunodeficiência humana (HIV), fato que aumenta a relevância do uso do adesivo apresentado.

As inúmeras vantagens do adesivo de fibrina vêm de encontro com o presente trabalho que demonstrou não apenas as aplicações da mesma, mas também a utilização de um biomaterial extraído de veneno de serpente sem a necessidade de uso de sangue humano o que diminui em muito o risco de infecção bem como transmissão de doenças (BARROS et al., 2009).

O princípio da adesividade da fibrina é o mesmo da formação do coágulo hemostático em vasos lesados. A exposição do colágeno do tecido conectivo, após lesão vascular, faz com que se inicie o processo de adesão plaquetária e comecem a aparecer os primeiros traços da formação de trombina no próprio local da lesão e a própria rede de fibrina reforça o tampão em direção ao plasma circundante e ao fluido extracelular (PANIS; HAID; SCHEELE, 1979; SCHEELE; GENTSCH; MATTESON, 1984).

Com o avanço das pesquisas novas associações são testadas a fim de otimizar as características benéficas da cola de fibrina. A associação da cola ao plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento tecidual pode sim levar a neoformação tecidual em local de enxerto ósseo (HUH et al., 2006; LEE et al., 2008). Neste sentido, Lendeckel et al. (2004) demonstraram o uso da cola de fibrina associada a células adiposas de origem autóloga no tratamento de defeito traumático extenso em calvária em criança, demonstrando neoformação óssea completa três meses após o procedimento cirúrgico.

Deste modo, ficou evidente nos resultados encontrados neste trabalho que a cola utilizada forneceu estabilidade do enxerto ao leito receptor mesmo que ainda parcial em virtude de ser um material não rígido como placas e parafusos. Desta feita, a ancoragem primária diminuída ou deficiência do processo de osseointegração podem ocorrer em virtude da ausência de fixação rígida dos enxertos ósseos. Saska, Gaspar e Hochuli-Vieira (2009) relataram que as colas,

como o cianoacrilato, podem ser utilizadas para fixação de tecidos moles. Nesta pesquisa, em tecido ósseo, conseguiu-se uma fixação suficiente com estabilidade necessária para a formação óssea no interior da interface enxerto/leito receptor. No entanto, uma avaliação adicional em longo prazo seria necessária para verificar a completa degradação deste biomaterial e a possibilidade de integração total do enxerto.

A fim de otimizar esse processo de cicatrização, vários estudos têm demonstrado que a terapia com laser de baixa potência promove a regeneração óssea (BRIGHTON; MCCLUSKEY 1988; RENNO et al., 2007). Em virtude de seus efeitos positivos no metabolismo ósseo e na consolidação de fraturas. Renno et al. (2007) e Stein et al. (2005) evidenciaram uma importante proliferação osteoblástica utilizando o laser de 830 nm com 20 J/cm². Fato que nos leva a crer na aceleração do processo cicatricial com aumento da densidade óssea e a produção mais acelerada na formação do calo ósseo como evidenciado por Liu et al. (2007) e Pinheiro et al. (2012).

A fase inicial do processo de regeneração óssea com o uso do laser de baixa potência é marcada pelo incremento na angiogênese e a presença de novos vasos na área do enxerto, como observado em nosso trabalho, auxilia no processo de regeneração (FREITAS; BARANAUSKAS; CRUZ-HOFLING, 2000; PINHEIRO et al., 2012). A nova vascularização, os estímulos térmicos e biológicos da terapia por laser, geralmente conduzem a uma melhor integração dos enxertos. Nos resultados observou-se diferença significativa favorável ao Grupo EII, quando se compara à EI, em todos os períodos, com uma menor interface e melhor integração do enxerto.

Estudos anteriores já comparavam a força de adesão entre a cola de fibrina e a cola comercial, atentando ao fato desta produzir o dobro de adesão que a cola de fibrina fato este que pode ser explicado em virtude da perda do fibrinogênio de cerca de 8,5% durante o processo de liofilização da cola de fibrina (GESTRING; LERNER, 1983; BRITTAİN et al, 1989). Isto nos leva a atentar ao fato de apesar da provável diferença na força de adesão, não há diferença significativa na adesividade final em cirurgias realizadas com adesivo comercial e adesivo autólogo (BRITTAİN et al, 1989), o que configura como mais uma indicação da cola de fibrina em procedimentos cirúrgicos.

Assim como utilizado neste estudo, a associação de fibrina com o uso do laser de baixa intensidade, latecola et al. (2013) encontraram neoformação óssea

nos defeitos ósseos produzidos em calota craniana de ratos creditando tal fato a possível capacidade osteocondutora desta associação, não encontrando infiltrado inflamatório significativo.

O uso alternativo do cianocrilato para a fixação de membranas é uma realidade (FAROUK et al., 1996). Contudo, toxicidade local e efeito carcinogênico tornam uma agravante potencial na escolha deste material (SOUZA et al., 2007). Em contrapartida, tanto biodegradável como hemostática, a cola de fibrina por muitos anos vem sendo empregada sem efeitos colaterais significantes. Deste modo além da vantagem de ser bem mais biológico o uso da cola de fibrina nos moldes deste trabalho, devem ser muito mais estudadas, deixando de fornecer o biomaterial apenas de forma autóloga.

A utilização do adesivo de fibrina na fixação dos blocos ósseos, em ambos os grupos analisados (EI e EII), estimulou significativamente a neoformação óssea, sobretudo no grupo com o uso do laser de baixa potência (EII), tanto do ponto de vista histológico como histomorfométrico, o que leva à possibilidade do uso deste material para fixação de enxertos e na necessidade de maiores estudos conferindo a viabilidade biológica deste material nas mais diversas opções terapêuticas com malhas, telas ou mesmo na fixação direta de blocos ósseos em reconstruções do complexo bucomaxilofacial.

Tendo em vista a importância das reconstruções ósseas maxilomandibulares, torna-se necessário conhecer a viabilidade e a influência dos biomateriais, associados ou não a enxertos autógenos, na reparação óssea e também na busca por materiais de fixação cada vez mais biocompatíveis e reabsorvíveis. Mesmo o osso autólogo carece de mais estudos a fim de prover a mesma qualidade como também em quantidade de osso sem a necessidade de cirurgias extensas que consagradamente são consideradas de grande morbidade. Além disso, teste de resistência à tração do enxerto, assim como tratamentos químicos no bloco retirado, pode ser um novo direcionamento para complementação deste estudo realizado.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia empregada e os dados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente promoveu regeneração óssea parcial em enxerto do tipo onlay fixado em calvária;
- b) A laserterapia de baixa potência promoveu uma melhora nos resultados desse processo de regeneração.

Referências

REFERÊNCIAS**(Formato Vancouver)**

Ahn DK, Sims CD, Randolph MA, O'Connor D, Butler PE, Amarante MT, Yaremchuk MJ. Craniofacial skeletal fixation using biodegradable plates and cyanoacrylate glue. *Plast Reconstr Surg*. 1997 May;99(6):1508-15; discussion 1516-7.

Akagawa Y, Kubo T, Koretake K, Hayashi K, Doi K, Matsuura A, Morita K, Takeshita R, Yuan Q, Tabata Y. Initial bone regeneration around fenestrated implants in Beagle dogs using basic fibroblast growth factor-gelatin hydrogel complex with varying biodegradation rates. *J Prosthodont Res*. 2009 Jan;53(1):41-7.

Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Effect of cortical perforations of both graft and host bed on onlay incorporation to the rat skull. *Eur J Oral Sci*. 1996 Oct-Dec;104(5-6):554-61.

Alberius P, Gordh M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Dec;124(12):1382-6.

Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS, Menitove JE, Fratantoni JC. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion*. 1995 Sep;35(9):783-90.

Amarante MT, Constantinescu MA, O'Connor D, Yaremchuk MJ. Cyanoacrylate fixation of the craniofacial skeleton: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1995 Apr;95(4):639-46.

Axhausen W. The osteogenetic phases of regeneration of bone. A historical and experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 1956;38: 593-600.

Bänninger H, Hardegger T, Tobler A, Barth A, Schüpbach P, Reinhart W, Lämmle B, Furlan M. Fibrin glue in surgery: frequent development of inhibitors of bovine thrombin and human factor V. *Br J Haematol*. 1993 Nov;85(3):528-32.

Barbizan R, Castro MV, Rodrigues AC, Barraviera B, Ferreira RS, Oliveira ALR: Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *Plos One* 2013, 8:63260.

Barbosa MDS, Gregghi SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J. Periodontol.* 2007. 78:2026–2031.

Barbosa MDS, Stipp AC, Passanezi E, Gregghi LA. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. Histological analysis. *J. Appl. Oral Sci.* 2008.16:310–315.

Barros LC, Ferreira RS Jr, Barraviera SR, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, Toscano E, Barraviera B. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2009 Oct;12(8):553-71.

Bergell S. Über Wirkungen des Fibrins. *Dtsch Med Wochenschr* 1909;35:633.

Bloonquist A D S, Turkey T A. Bone grafting in deformities. In: Bell W H. *Modern practice in orthognathic and reconstructive surgery.* Sauders. 1992. Philadelphia. 831-853.

Boyne PJ. Use of marrow-cancellous bone grafts in maxillary alveolar and palatal clefts. *J Dent Res.* 1974 Jul-Aug;53(4):821-4.

Brennan M. Fibrin glue. *Blood Rev.* 1991 Dec;5(4):240-4.

Brighton CT, McCluskey WP. Response of cultured bone cells to a capacitively coupled electric field: inhibition of cAMP response to parathyroid hormone. *J Orthop Res.* 1988;6(4):567-71.

Brittain GP, Rostron CK, Morton DB, Rees JE. The use of a biological adhesive to achieve sutureless epikeratophakia. *Eye (Lond).* 1989;3 (Pt 1):56-63.

Chacon GE, Ellis JP, Kalmar JR, McGlumphy EA. Using resorbable screws for fixation of cortical onlay bone grafts: an in vivo study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Nov;62(11):1396-402.

Chalhoub M, Prestes NC, Lopes MD, Rocha NS, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ. The use of snake venom derived fibrin glue in hysterorrhaphy of ovine caesarean surgery. *J. Venom. Anim. Toxins .* 2000;6(2): 220-237.

Chiquito GCM. Comparison between suture and fibrin adhesive derived from snake venom for fixation of connective tissue graft in correction of marginal tissue recession. *J. Venom Anim. Toxins Trop. Dis.* 2007. 13:559.

Colls J. La terapia laser hoy. Centro de documentación laser de meditec. Barcelona, 1984;15: 1-5.

Davis BR, Sándor GK. Use of fibrin glue in maxillofacial surgery. *J Otolaryngol.* 1998 Apr;27(2):107-12.

Donos N, Mardas N, Chadha V. Clinical outcomes of implants following lateral bone augmentation: systematic assessment of available options (barrier membranes, bone grafts, split osteotomy). *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;35(8 Suppl):173-202.

Dym H, Huang D, Stern A. Alveolar bone grafting and reconstruction procedures prior to implant placement. *Dent Clin North Am.* 2012 Jan;56(1):209-18, x.

Epstein GH, Weisman RA, Zwillenberg S, Schreiber AD. A new autologous fibrinogen-based adhesive for otologic surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1986 Jan-Feb;95(1 Pt 1):40-5.

Esteves JC, Monteiro JM, Aranega AM, Betoni Junior W, Sonoda CK. Utilization of ethyl cyanoacrylate and 2-octyl cyanoacrylate adhesives for autogenous bone graft fixation: histomorphometric study in rats. *J Oral Implantol.* 2014 Aug;40(4):411-7.

Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. *Braz Oral Res.* 2009 Apr-Jun;23(2):137-43.

Farouk R, Drew PJ, Qureshi A, Roberts AC, Duthie GS, Monson JR. Preliminary experience with butyl-2-cyanoacrylate adhesive in tension-free inguinal hernia repair. *Br J Surg.* 1996 Aug;83(8):1100.

Fayaz HC, Giannoudis PV, Vrahas MS, Smith RM, Moran C, Pape HC, Krettek C, Jupiter JB. The role of stem cells in fracture healing and nonunion. *Int Orthop.* 2011 Nov;35(11):1587-97.

Ferraro GC, Moraes JRE, Pereira GT, Moraes FR, Bueno de Camargo MH. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived of fibrin glue tendon healing in dogs. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 2005. 11:433–446.

Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA. Laser effects on osteogenesis. *Applied Surface Sci.* 2000. 154-155:548-54.

Friedlaender GE. "Current Concepts Review: Bone Grafts". *J. Bone Joint Surg.* 1987. (69)786-90.

Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 2006 Dec;79(6):443-50.

Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004 Jan;19(1):43-8.

Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B.* 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Gatti MAN. Treatment of venous ulcers with surgical adhesive derived from snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 2009. 15:368.

Gestring GF, Lerner R. Autologous fibrinogen for tissue adhesion, hemostasis and embolization. *Vase Surg.* 1983.17:294-304.

Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve.* 2005 Jun;31(6):694-701. Review.

Goldberg VM, Steverson S. Natural History of Autografts and Allografts. *Clin Orthop.* 1987;225:7-16.

Gonçalves WL, Souza FM, Conti CL, Cirqueira JP, Rocha WA, Pires JG, Barros LA, Moysés MR. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. *Braz J Med Biol Res.* 2007Jun;40(6):877-84.

Gosain AK, Song L, Corrao MA, Pintar FA. Biomechanical evaluation of titanium, biodegradable plate and screw, and cyanoacrylate glue fixation systems in craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Mar;101(3):582-91.

Gouin F, Passuti N, Verrielle V, Delecrin J, Bainvel JV. Histological features of large bone allografts. *J Bone Joint Surg Br.* 1996 Jan;78(1):38-41.

Grey EG. Fibrin a hemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynecol Obstet* 1915;21:452.

Gupta AK, Lyons DC, Abramovits W. Low-level laser/light therapy for androgenetic alopecia. *Skinmed.* 2014 May-Jun;12(3):145-7.

Hämmerle CH, Olah AJ, Schmid J, Flückiger L, Gogolewski S, Winkler JR, Lang NP. The biological effect of natural bone mineral on bone neoformation on the rabbit skull. *Clin Oral Implants Res.* 1997 Jun;8(3):198-207.

Hermeto LC, Rossi R, Pádua SB, Pontes ERJ, Santana AE. Comparative study between fibrin glue and platelet rich plasma in dogs skin grafts. *Acta Cir. Bras.* 2012 Nov; 27(11):789-794.

Hino M, Ishiko O, Honda KI, Yamane T, Ohta K, Takubo T, Tatsumi N. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. *Br J Haematol.* 2000 Jan;108(1):194-5.

Huh JY, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Kim BY, Lee SH. The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in autogenous bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Apr;101(4):426-31.

Iatecola A, Barraviera B, Ferreira RS Jr, dos Santos GR, Neves JI, da Cunha MR. Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair of skull defects in rats. *Braz Dent J.* 2013 Sep-Oct;24(5):456-61.

Israels SJ, Israels ED. Development of antibodies to bovine and human factor V in two children after exposure to topical bovine thrombin. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1994 Aug;16(3):249-54.

Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJ, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, Barravieira B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. *Sao Paulo Med J.* 1995 Sep-Oct;113(5):1000-2.

Jensen SS, Broggini N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):237-43.

Karu T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B.* 1989 Aug;3(4):638-40.

Kawamura M, Sawafuji M, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayashi K. Frequency of transmission of human parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during thoracic surgery. *Ann Thorac Surg*. 2002 Apr;73(4):1098-100.

Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci*. 2010 Jan;25(1):73-7.

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3503-9.

Kim H, Camata RP, Lee S, Rohrer GS, Rollett AD, Vohra YK. Crystallographic texture in pulsed laser deposited hydroxyapatite bioceramic coatings. *Acta Mater*. 2007 Jan;55(1):131-139.

Kimura Y, Yu DG, Fujita A, Yamashita A, Murakami Y, Matsumoto K. Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone. *J Periodontol*. 2001 Sep;72(9):1178-82.

Kontio R. Treatment of orbital fractures: the case for reconstruction with autogenous bone. *J. Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(7): 863- 68.

Lee DH, Kim TH, Lee SH, Kim CW, Kim JM, Bin SI. Evaluation of meniscus allograft transplantation with serial magnetic resonance imaging during the first postoperative year: focus on graft extrusion. *Arthroscopy*. 2008 Oct;24(10):1115-21.

Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, Hedrick MH, Berthold L, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004 Dec;32(6):370-3.

Lerner R, Binur NS. Current status of surgical adhesives. *J Surg Res*. 1990 Feb;48(2):165-81.

Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Sep;86(3):449-56.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Tratado de Periodontia clínica e implantologia oral*, Guanabara-Koogan, 2010. Rio de Janeiro, 5ª. ed., 1304 páginas.

Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg*. 2007 Dec;25(6):487-94.

Mardas N, Dereka X, Donos N, Dard M. Experimental model for bone regeneration in oral and cranio-maxillo-facial surgery. *J Invest Surg*. 2014 Feb;27(1):32-49.

Marino JAM, Taciro C, Zuanon JAS, Benatti Neto C, Parizotto NA. Efeito do Laser terapêutico de baixa potência sobre o processo de reparação óssea em tíbia de rato. *Rev Bras Fisioter*. 2003; 7:167-73.

Misch Carl E, DDS, MDS. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2a ed. Santos. 2000. São Paulo. 521-535.

Misch CE, Silc JT. Socket grafting and alveolar ridge preservation. *Dent Today*. 2008 Oct;27(10):146, 148, 150 passim.

Nazirkar G, Singh S, Dole V, Nikam A. Effortless effort in bone regeneration: a review. *J Int Oral Health*. 2014 Jun;6(3):120-4.

Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone*. 2007 Jan;40(1):140-8. Epub 2006 Sep 15.

Odobasic A, Krdzalic G, Hodzic M, Hasukic S, Sehanovic A, Odobasic A. The role of fibrin glue polypropylene mesh fixation in open inguinal hernia repair. *Med Arch*. 2014;68(2):90-3.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:191-220. Review

Panis R, Haid T, Scheele J. [Use of a fibrin glue for reconstructing the posterior meatal wall (author's transl)]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).* 1979 May;58(5):400-3. German.

Papatheofanis FJ, Barmada R. The principles and applications of surgical adhesives. *Surg Annu.* 1993;25 Pt 1:49-81.

Pinheiro AL, Soares LG, Cangussú MC, Santos NR, Barbosa AF, Silveira Júnior L. Effects of LED phototherapy on bone defects grafted with MTA, bone morphogenetic proteins and guided bone regeneration: a Raman spectroscopic study. *Lasers Med Sci.* 2012 Sep;27(5):903-16.

Porcellini Adolfo. Regenerative medicine: a review. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [serial on the Internet]. 2009 Aug [cited 2014 Aug 25] ; 31(Suppl 2): 63-66.

Raghoobar GM, Liem RS, Bos RR, van der Wal JE, Vissink A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Jun;17(3):288-93.

Rahal SC, Amaral MSP, Pai VD, Barraviera, SRCS, Caporali EHG. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 2004.10:161–172.

Rapaport SI, Zivelin A, Minow RA, Hunter CS, Donnelly K. Clinical significance of antibodies to bovine and human thrombin and factor V after surgical use of bovine thrombin. *Am J Clin Pathol.* 1992 Jan;97(1):84-91.

Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007 Aug;25(4):275-80.

Rocha JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. 2004;17(1):44-48.

Rocha Jr AM, Vieira BJ, De Andrade LCF, Aarestrup FM. Effects of low-level laser therapy on the progress of wound healing in humans: the contributions of in vitro and in vitro experimental studies. *J Vasc Bras*. 2007 Sep;6(3):257-265.

Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg*. 2012 Jan;23(1):323-7.

Sampaio RL, Ranzani JJT, Brandão CVS., Thomazini-Santos IA, Barraviera B, Barraviera SRCS, Giannini MJSM. Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers—Experimental study in dogs. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis*. 2007. 13:857–873.

Saska S, Gaspar AM, Hochuli-Vieira E. [Cyanoacrylate adhesives for the synthesis of soft tissue]. *An Bras Dermatol*. 2009 Nov-Dec;84(6):585-92.

Scheele J, Gentsch HH, Matteson E. Splenic repair by fibrin tissue adhesive and collagen fleece. *Surgery*. 1984 Jan;95(1):6-13.

Shermak MA, Wong L, Inoue N, Crain BJ, Im MJ, Chao EY, Manson PN. Fixation of the craniofacial skeleton with butyl-2-cyanoacrylate and its effects on histotoxicity and healing. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Aug;102(2):309-18.

Sheta SM, Hida T, McCuen BW 2nd. Cyanoacrylate tissue adhesive in the management of recurrent retinal detachment caused by macular hole. *Am J Ophthalmol*. 1990 Jan 15;109(1):28-32.

Silva DN, Silva AC, Aydos RD, Viterbo F, Pontes ER, Odashiro DN, Castro RJ, Augusto DG. Nerve growth factor with fibrin glue in end-to-side nerve repair in rats. *Acta Cir Bras*. 2012 Apr;27(4):325-32.

Sisti KE, de Rossi R, Antonioli AM, Aydos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP, Garcia IR Jr, Piattelli A, Tavares HS. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by laser with and without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol*. 2012 Jun;38(3):231-7.

Sittitavornwong S, Gutta R. Bone graft harvesting from regional sites. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Aug;22(3):317-30, v-vi.

Smiler D, Soltan M, Lee JW. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. *Implant Dent*. 2007 Mar;16(1):42-53.

Soltan M, Smiler DG. Antral membrane balloon elevation. *J Oral Implantol*. 2005;31(2):85-90.

Souza SC, Oliveira WL, Soares DF, Briglia CH, Athanázio PR, Cerqueira MD, Guimarães PH, Carreiro MC. Comparative study of suture and Cyanoacrylates in skin closure of rats. *Acta Cir Bras*. 2007 Jul-Aug;22(4):309-16.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005 Apr;23(2):161-6.

Stolf HO. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from patient's nasolabial fold. *J. Venom. Anim. Toxins*. 1999. 5:227.

Tiphlova O, Karu T. Role of primary photoacceptors in low-power laser effects: action of He-Ne laser radiation on bacteriophage T4-Escherichia coli interaction. *Lasers Surg Med*. 1989;9(1):67-9.

Vecooso MC. Laser em fisioterapia. São Paulo: Lovise; 1993.

Viterbo F, Franciosi LF, Palhares A. Nerve graftings and end-to-side neurorrhaphies connecting the phrenic nerve to the brachial plexus. *Plast Reconstr Surg*. 1995 Aug;96(2):494-5.

Viterbo F, Salvio AG, Griva BL, Maciel FO. The embracing end-to-side neurorrhaphy in rats. *Acta Cir Bras*. 2012 Mar;27(3):260-5.

Wilson SM, Pell P, Donegan EA. HIV-1 transmission following the use of cryoprecipitate fibrinogen as gel/adhesive. *Transfusion*. 1991;31:51.

Young JZ, Medawar PB. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet* 1940; 2:126–8.

Anexos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 012/2012

Bauru, 25 de julho de 2012.

Senhor Professor,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Reparação óssea de enxerto autólogo fixado com adesivo de fibrina. Análise histológica e morfométrica"**, de autoria de Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves, sob sua orientação, foi novamente analisado por um relator e considerado **APROVADO ad referendum** deste Colegiado, nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim
Docente do Departamento de Ciências Biológicas