



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Camila Fernanda Zorzella Creste

**Biopolímero de Fibrina associado a enxerto de osso
autólogo para regeneração de calvária em coelhos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais na área de conhecimento de Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Rui Seabra Ferreira Jr.
Coorientador: Prof.Dr. Aristides Augusto Palhares Neto

**Botucatu
2019**

Camila Fernanda Zorzella Creste

Biopolímero de Fibrina associado a enxerto de osso
autólogo para regeneração de calvária em coelhos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais na área
de conhecimento de Biotecnologia.

Orientador: Prof.Dr. Rui Seabra Ferreira Jr.

Coorientador: Prof.Dr. Aristides Augusto Palhares Neto

Botucatu

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRE 8/6772

Creste, Camila Fernanda Zorzella.

Biopolímero de Fibrina associado a enxerto de osso autólogo para regeneração de calvária em coelhos / Camila Fernanda Zorzella Creste. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rui Seabra Ferreira Jr

Coorientador: Aristides Augusto Palhares Neto

Capes: 90400003

1. Fibrina. 2. Transplante autólogo. 3. Regeneração óssea. 4. Osso e ossos.

Palavras-chave: Biopolímero de Fibrina; Osso autólogo; Regeneração óssea; Tecido ósseo.

“Não importa o quão ruim a vida possa ser, há sempre alguma coisa que você pode fazer e ter sucesso. Enquanto há vida, há esperança.”

- Stephen Hawking -

Resumo

O Capítulo I apresenta uma revisão bibliográfica, onde foram coletadas informações sobre reparo ósseo e a utilização de biomateriais e osso autólogo. O reparo de defeitos ósseos ainda é considerado um grande desafio clínico, já que nenhum método de reconstrução disponível ou o uso de biomateriais provaram ser completamente eficazes. Além disso, os defeitos neurocraniais ocasionam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, pois o tempo entre o estabelecimento da lesão e o reparo é longo. O reparo do defeito cranial regulariza anomalias encefalográficas, distúrbios de fluxo sanguíneo cerebral, a frequência de episódios epilépticos, além de reduzir o dano psicossocial com a correção estética da lesão. O material mais utilizado para o preenchimento de defeitos pequenos é o enxerto ósseo autólogo retirado da crista íliaca, costelas ou da própria calvária. Porém, a quantidade necessária para o tratamento de grandes defeitos pode tornar estas fontes inadequadas, além de aumentar os riscos inerentes aos procedimentos cirúrgicos. Nosso objetivo foi avaliar o potencial terapêutico regenerativo do Biopolímero de Fibrina (BF), produzido pelo CEVAP (UNESP – Botucatu, SP, Brasil), isolado ou associado a diferentes percentuais de enxerto ósseo autólogo fragmentado (100%; 50% e 25%) em defeitos críticos (15mm) na calvária de coelhos. No Capítulo II apresentamos um artigo científico, mostrando os resultados e conclusões obtidos a partir do estudo realizado. Foram utilizados 30 coelhos machos e adultos da raça *New Zealand*, divididos em 05 grupos de tratamento, de acordo com o tipo de preenchimento. Após 56 dias de observação, foi realizada tomografia computadorizada para avaliação da área e perímetro do defeito, área de cobertura do enxerto e densidade óssea do preenchimento, seguida da eutanásia. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à área do defeito. Nas demais análises houve diferença entre grupos específicos. Dentre os grupos com menor percentual de enxerto, o grupo 50% OSSO + BF apresentou a menor mediana de perímetro e maior mediana de área de cobertura do enxerto. A análise histológica quantificou a composição do tecido de preenchimento do defeito. Com relação à formação de tecido ósseo, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à formação de novos vasos sanguíneos e à quantificação de colágeno por área. A utilização do BF foi bem tolerada, sem efeitos adversos. É possível considerar a utilização de menores quantidades de fragmentos ósseos associados ao BF para a realização de cranioplastia. Considerando também a facilidade de uso e alta integração com o enxerto, o BF permitirá um procedimento mais rápido e menos invasivo para o paciente, reduzindo os riscos e custos, além do uso da menor quantidade de osso autólogo proposta (25%), associado ao BF, poder viabilizar o procedimento para pacientes com áreas doadoras escassas.

Palavras – chave: Biopolímero de fibrina, tecido ósseo, regeneração óssea, enxerto autólogo.

Abstract

In Chapter I present a review of the Literature showing a background of bone repair and the use of autologous bone grafts and biomaterials. The repair of bone defects is still considered a significant clinical challenge as neither available reconstruction methods nor the use of biomaterials have proved to be completely effective. Besides, cranial injuries cause great impact on the quality of life of patients because time between injury and repair is often long. The repair of cranial defects regularizes encephalographic abnormalities, impaired cerebral blood flow, frequency of epileptic seizures and reduces psychosocial damage with aesthetic correction of the injury. The most used material for small defects is the autologous bone graft from iliac crest, ribs or the calvarial bone itself. However, the quantity needed to treat large size defects may turn these sources unavailable as also as increase risks inherent to surgical procedures. Our objective was to evaluate the regenerative and angiogenic potential of Fibrin Biopolymer produced by CEVAP (UNESP – Botucatu, SP, Brazil) isolated or associated with different quantities of fragmented autologous bone grafts (100%; 50% and 25%) in critical size (15mm) rabbit calvarial defects. In Chapter II we present a research article embodying the results and conclusions of our study. There were used 30 male New Zealand rabbits divided in 05 groups according to defect filling. After 56 days of observation, computerized tomography (CT) was performed to evaluate area and perimeter of the defect, graft cover area and bone density of the filling, followed by euthanasia. Area of defect showed no statistical difference among groups. Other CT analysis showed statistical differences between specific groups. Among groups with lower graft percent, the group with 50% bone and fibrin biopolymer showed the lowest graft perimeter median and the highest graft area cover median. Histological analysis quantified filling tissue composition but there were no statistical differences among groups in terms of bone tissue formation, angiogenesis and collagen quantity per area. Fibrin biopolymer was well tolerated with no adverse events. It is possible to consider using lower quantities of bone fragments associated with fibrin biopolymer for cranioplasty. Also considering its ease of use and high graft integration, fibrin biopolymer may allow a faster and less invasive procedure, reducing risks and costs for patients. Besides, the lower use of autologous bone graft, proposed in group with 25% associated with fibrin biopolymer can make the procedure feasible for patients with no or poor donor areas.

Keywords: Fibrin biopolymer, bone tissue, bone regeneration, autologous graft.

Sumário

CAPÍTULO I

Revisão da Literatura	01
Objetivo	06
Referências	07

CAPÍTULO II

Artigo Científico	12
Anexo I.....	34
Anexo II.....	35



CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

A frequência de danos e distúrbios ósseos acidentais está aumentando em todo o mundo. A porcentagem da população idosa continua a crescer, o que resulta em um aumento no número de doenças ósseas degenerativas. Este envelhecimento da população aumenta a necessidade de implantes ósseos artificiais que empregam especificamente materiais biocompatíveis¹.

A perda óssea provocada por traumas ou doenças tem sido um problema de saúde cada vez mais recorrente. O reparo de defeitos ósseos ainda é considerado um grande desafio clínico, já que nenhum método de reconstrução disponível ou o uso de biomateriais provaram ser completamente eficazes².

No ambiente militar, o desenvolvimento de equipamentos de proteção individual mais avançados permitiu o aumento na sobrevivência de soldados e policiais de tropas de elite a projéteis e artefatos explosivos caseiros, casos que frequentemente requerem craniotomia descompressiva de emergência ou resultam em perda significativa de massa óssea, ocasionando um aumento exponencial na demanda por reconstrução do tecido ósseo cranial³.

A craniotomia é um procedimento cirúrgico amplamente utilizado para a redução da pressão intracraniana aumentada, por exemplo, por trauma, edema cerebral agudo, aneurisma hemorrágico subaracnoideo ou acidente vascular cerebral isquêmico, reduzindo o tempo de dependência de ventilação mecânica e estadia em unidade de cuidados intensivos⁴. A craniotomia também pode ser necessária para a ressecção de tumores de sistema nervoso central, retirada de tecido necrosado após radioterapia local ou processos infecciosos⁵.

A cranioplastia é o procedimento de reparação cirúrgica de um defeito no crânio, visando restaurar a função protetora e estética da calota craniana sendo que frequentemente o período de tempo entre o estabelecimento do trauma e sua respectiva reparação é mais longo quando comparado a outros ossos do corpo^{6,7}. O reparo do defeito na calota regulariza anomalias encefalográficas, distúrbios de fluxo sanguíneo cerebral e distúrbios neurológicos como, por exemplo, a frequência de episódios epiléticos. A reparação estética da lesão também reverte o impacto psicossocial, especialmente nos casos de efeitos adversos e/ou complicações causadas por tratamento médico, aumentando a qualidade de vida destes pacientes⁸.

No processo natural de regeneração óssea, imediatamente após a fratura,

ocorre a formação de hematoma constituído, tanto de células do sangue periférico quanto intramedular⁹. A lesão dispara uma resposta inflamatória aguda que é essencial para a regeneração óssea. Esta resposta, por sua vez, causa a coagulação do hematoma ao redor do local lesionado, nas extremidades da fratura e dentro da medula, formando o molde para a formação do calo ósseo⁹. Ao mesmo tempo, ocorre a formação de tecido cartilaginoso para estabilizar mecanicamente a lesão^{10,11}.

A osteogênese, também chamada de ossificação, é a formação do tecido ósseo e pode ser do tipo intramembranosa ou endocondral. Na osteogênese intramembranosa, o tecido ósseo é depositado diretamente sobre o tecido conjuntivo primitivo. Já na osteogênese endocondral, o tecido ósseo substitui uma cartilagem já existente^{12, 13, 14}.

No caso de ossos longos, depois de aproximadamente 02 ou 03 semanas após a lesão, o hematoma é substituído por matriz extracelular formada por fibroblastos e condroblastos derivados de células progenitoras recrutadas, desenvolvendo o calo mole que é caracterizado pela diminuição do movimento dos tecidos moles, dor e inchaço local. Ao longo de 03 a 04 meses, o calo mole é lentamente substituído pelo calo duro. A osteogênese endocondral começa periféricamente e progride para o centro, com o tecido ósseo preenchendo a lacuna e unindo as extremidades da fratura. Após a conclusão do calo duro, o osso é remodelado em osso lamelar ao longo de meses a anos, restaurando por completo o canal e suas propriedades ósseas¹⁵.

A osteogênese intramembranosa é realizada a partir da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos maduros. Estes osteoblastos depositam matriz óssea levando à formação de espículas. Essas espículas se desenvolvem e se fundem para formarem trabéculas. À medida que as trabéculas aumentam em tamanho e número, elas se interconectam formando osso imaturo, com estrutura fraca, desorganizada e alta proporção de osteócitos. Posteriormente, o osso imaturo será substituído por osso lamelar, organizado e mais forte. Este tipo de osteogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e a partir dela são formados os ossos laminares do crânio, vários ossos faciais, partes da mandíbula e clavícula. Além disso, também é importante para o crescimento de ossos curtos e aumento da espessura de ossos longos^{12, 13}.

Apesar da alta capacidade regenerativa do tecido ósseo, este processo biológico pode falhar ou ser limitado por fatores como tamanho do defeito, atraso no reparo ou até mesmo o desenvolvimento de pseudoartrose e nãojunção da fratura¹⁶.

Cerca de 30% dos pacientes com traumatismo craniano apresentam hematoma subdural¹⁷. Nestes casos, a formação do hematoma decorrente da fratura frequentemente ocasiona aumento da pressão intracraniana com danos ao tecido neurológico¹⁸. A reversão destes quadros ocorre com a drenagem precoce dos hematomas e coágulos intracranianos, o que previne a extensão da lesão cerebral, mas por outro lado desregula os mecanismos de regeneração óssea. O procedimento de drenagem pode ser realizado por craniotomia parcial ou craniotomia descompressiva, podendo retirar grande área da calota craniana para permitir a expansão do tecido cerebral edemaciado, resultando em um defeito crítico cranial de grande extensão^{17,18}.

Um defeito crítico é anatomicamente um defeito ósseo específico de tamanho suficiente para torná-lo incapaz de cura sem qualquer cicatriz fibrótica ou possível pseudoartrose nas margens do defeito, durante o período de vida de um animal. Os tamanhos de defeitos críticos variam entre diferentes espécies animais e dependem da idade do animal e da localização anatômica do defeito. Em coelhos machos e adultos, por exemplo, o diâmetro específico para o defeito crítico na calvária é de 15mm^{19,20}.

O material mais utilizado para o preenchimento de defeitos pequenos é o enxerto ósseo autólogo retirado da crista ílfaca, costelas ou da própria calvária. Entretanto, a quantidade necessária para o tratamento de defeitos de grande extensão pode tornar estas fontes inadequadas^{8, 21}.

O uso de enxerto ósseo autólogo apresenta vantagens como a alta biocompatibilidade; força e elasticidade semelhantes ao original; osteocondução (capacidade de crescimento ósseo em direção ao interior da lesão); resistência à infecção; extrusão e sua relativa disponibilidade. Todavia, algumas desvantagens do uso de osso autólogo incluem propensão à reabsorção, pouca maleabilidade, decréscimos subsequentes na força e na estética do contorno, e morbidade local variável entre os doadores, o que faz com que ainda não sejam os arcabouços ideais para a regeneração de grandes lesões³.

A principal função dos arcabouços é a de fornecer estrutura e sustentação para a migração e especialização das diferentes populações celulares envolvidas no reparo. Esta estrutura de sustentação deve permitir a adesão celular, fixação, diferenciação, proliferação e função biológica para o restauro da função do tecido lesionado²². O número de novos arcabouços tem aumentado devido, em parte, à visão otimista de que encontrar o *design* e material certos levará à regeneração óssea *in vivo*²³.

Vários materiais têm sido utilizados para reparar defeitos cranianos. O material ideal para ser usado em cranioplastia deve ser 1) radiolúcido, 2) resistente a infecções, 3) termoisolante, 4) resistente a processos biomecânicos, 5) maleável, para se ajustar completamente aos defeitos, 6) de baixo custo, e 7) pronto para uso²⁴.

A engenharia de tecidos tem se apresentado como uma área multidisciplinar que tem por objetivos a regeneração de tecidos e a restauração da função de órgãos, pela combinação de células vivas com um arcabouço sintético ou natural para produzir um tecido vivo tridimensional que é funcionalmente, estruturalmente e mecanicamente igual ao tecido original^{25, 26, 27}.

A escolha do arcabouço ideal deve levar em consideração materiais que equilibrem a função mecânica temporária juntamente com propriedades arquitetônicas para ajudar na comunicação biológica e regeneração de tecidos, tal como forma dos poros, tamanho e interconectividade²⁸.

Várias estratégias têm sido empregadas para atingir esse objetivo, como por exemplo, o uso de arcabouços de polímeros com diferentes estruturas de poros²⁹ e tecnologia de entrelaçamento tridimensional resultando em uma estrutura microporosa com diâmetro controlado dos poros. Esta estratégia foi utilizada com sucesso no restabelecimento de lesões no ligamento cruzado anterior, principal estrutura articular do joelho³⁰.

Igualmente importante para a engenharia do tecido ósseo é a capacidade osteocondutora de um arcabouço³¹. A hidroxiapatita, um dos biomateriais mais utilizados para regeneração óssea, possui propriedade osteocondutora, já que absorve os fatores de crescimento osteogênicos do meio local e da circulação, criando condições locais adequadas para a formação óssea. Também tem sido considerada um excelente arcabouço para diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais. Porém, não possui a propriedade de osteoindução, já que

não é suficiente para induzir a diferenciação de células osteogênicas quando implantadas em tecido não ósseo, como pele ou músculo^{32,33}.

O selante de fibrina, em sua concepção, é um agente hemostático, utilizado inicialmente em cirurgias vasculares, para minimizar a necessidade de reposição de fatores e a perda sanguínea em grandes cirurgias, especialmente em pacientes com distúrbios de coagulação³⁴.

No início dos anos 90, o biomaterial de fibrina produzido pelo CEVAP foi denominado cola de fibrina em função de suas propriedades hemostáticas semelhantes à das colas de fibrina comerciais³⁵. Entretanto, a hemostasia não é sua única função. A partir do início dos anos 2000, passou a ser denominado de adesivo de fibrina, por ter se apresentado como ótima alternativa à sutura convencional, em cirurgia periodontal³⁶.

O biomaterial é preparado pela combinação de um concentrado de fibrinogênio e trombina, reconstituído em solução de cloreto de cálcio. O princípio da adesividade está relacionado com a formação da rede de fibrina que, no momento da reação dos compostos, mimetiza a última fase da cascata da coagulação. O fibrinogênio é convertido em fibrina, na presença de íons cálcio, originando um coágulo estável e reforçado pela ativação do fator XIII, que também participa da proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, contribuindo para a cicatrização dos tecidos^{37, 38, 39, 40, 41}.

A fibrina também atua como matriz para adesão de outras células como células endoteliais, que levam à neoangiogênese e à remodelação tecidual. Os fibroblastos então remodelam a estrutura de fibrina e sintetizam colágeno, dando forma e estabilidade aos capilares⁴².

A partir de 2009, a denominação do biomaterial passa a ser selante de fibrina, em referência à sua propriedade hemostática inicial, apesar de sua aplicabilidade ter sido ampliada e demonstrada em animais e humanos, tornando-se ferramenta útil para a área clínica, devido à sua flexibilidade e diversidade de aplicações^{22,43}. A mistura de fragmentos de osso autólogo e cola de fibrina humana alogênica é uma técnica muito conhecida e foi relatada pela primeira vez em 1997, por Sawamura *et al.*⁴⁴, onde foram obtidos resultados promissores para a osteorregeneração, porém, foi sugerida a adição de algum fator de crescimento ou adjuvante similar para aumentar ainda mais o valor clínico da técnica⁴⁵.

No ano de 2015, o biomaterial passou a ser denominado selante heterólogo de fibrina, por não utilizar sangue humano em sua composição⁴⁶. A possibilidade de utilização de um biomaterial de fibrina, cujo fator polimerizador é derivado de veneno de serpente, abre uma importante opção biotecnológica visto que a enzima trombina-*like* derivada do veneno de serpente é mais potente que a trombina bovina⁴⁷. No biomaterial de fibrina derivado de veneno de serpente, desenvolvido por pesquisadores do CEVAP (UNESP, *campus* de Botucatu), não há utilização de sangue humano em sua composição, possibilitando maior padronização, produção em maior escala e formulação personalizada às necessidades clínico-cirúrgicas, controlando o tempo de coagulação e degradação. Com o andamento das pesquisas, principalmente do seu uso como *scaffold* para células tronco, adotou-se então a denominação de Biopolímero de Fibrina. Esta é mais adequada devido à grande plataforma de uso em saúde que a fibrina pode gerar como: Selante, Cola, *Scaffold*, *Drug Delivery*, Biocurativo, entre outros a serem investigados.

O fato de não utilizar insumos de origem humana também reduz o risco de infecção por doenças transmissíveis pelo sangue⁴⁷ e seu custo de produção é inferior aos selantes comerciais⁴³, devido à ampla disponibilidade de matéria-prima. E, além disso, tem sido utilizado em diversas aplicações da Medicina, como regeneração nervosa^{48, 49, 50, 51}, reparação óssea^{52, 53} e no tratamento de úlceras venosas em humanos⁵⁴. O uso em Medicina Regenerativa resultou em nova alteração da nomenclatura, agora para a denominação de biopolímero de fibrina, posicionando o produto corretamente junto aos demais biomateriais em desenvolvimento.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico da associação entre o Biopolímero de Fibrina (BF), produzido pelo CEVAP, e enxerto ósseo autólogo na regeneração óssea de defeitos críticos em calvária de coelhos, a fim de verificar a influência do BF nos processos de regeneração óssea e neovascularização local.

REFERÊNCIAS

- ¹Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Kim HW, Maiti TK, Bhattacharya D, et al. Silk scaffold in bone tissue engineering: an overview. *Acta Biomater.*2017;63:1-17. doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.027.
- ²Zhao L, Zhao J, Yu J, Sun R, Zhang X, Hu S. In vivo investigation of tissue-engineered periosteum for the repair of allogeneic critical size bone defects in rabbits. *Regen Med.* 2017;12(4):353-64.
- ³Goldstein JA, Paliga JT, Bartlett SP. Cranioplasty: indications and advances. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;21(4):400–09. DOI:10.1097/MOO.0b013e328363003e.
- ⁴Cooper JD, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D’Urso P, et al. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. *The DECRA Trial. N Eng J Med.* 2011;364(16):1943-502.
- ⁵Klinger DR, Madden C, Beshay J, White J, Gambrell K, Rickert K. Autologous and acrylic cranioplasty: a review of 10 years and 258 cases. *World Neurosurg.* 2014;82(3-4):e525-e530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2013.08.005>
- ⁶Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery.*1997;40:588–603.
- ⁷Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg.* 2004;100(2):163–68.
- ⁸Shah AM, Jung H, Skirboll S. Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurg Focus.* 2014;36(4):E19. DOI:10.3171/2014.2.FOCUS13561.
- ⁹Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873–84.
- ¹⁰Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392–404.
- ¹¹Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Ortho Rel Res.* 1998;355(Suppl):S7–21.
- ¹²Baldini N, Cenni E, Ciapetti G, Granchi D, Savarino L. Bone repair and regeneration. In: Planell JA, Best SM, Lacroix D, Merolli A. *Bone repair biomaterials.* 1sted. Cambridge: Woodhead Publishing, 2009. p. 69-105,2009.
- ¹³Celil AB, Guelcher S, Hollinger JO, Miller M. Tissue engineering applications – Bone. In: Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD (Eds). *Tissue engineering.* 1st ed. London: CRC Press, 2007. p. 21:1-21:22.
- ¹⁴Bruder SP, Caplan AI. Bone regeneration through cellular engineering. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J (Eds). *Principles of tissue engineering.* 2nd. ed. London: Academic Press, 1997. p. 683-694.

- ¹⁵Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. *Front BioengBiotechnol.* 2018;31(6):1-23. doi: 10.3389/fbioe.2018.00105.
- ¹⁶Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6): 551–55.
- ¹⁷Kwon YS, Yang KH, Lee YH. Craniotomy or decompressive craniectomy for acute subdural hematomas: surgical selection and clinical outcome. *Korean J Neurotrauma* 2016;12(1):22-27.
- ¹⁸Li LM, Koliass GA, Guilfoyle MR, Timofeev I, Corteen EA, Pickard JD. Outcome following evacuation of acute subdural haematomas: a comparison of craniotomy with decompressive craniectomy. *Acta Neurochir.* 2012;154:1555–1561. DOI 10.1007/s00701-012-1428-8.
- ¹⁹Lappalainen O, Korpi R, Haapea M, Korpi J, Ylikontiola LP, Kallio-Pulkkinen S, et al. Healing of rabbit calvarial critical-sized defects using autogenous bone grafts and fibrin glue. *Childs Nerv Syst.* 2015;31:581–587.
- ²⁰Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7:1918–1929.
- ²¹Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(4):483-90. DOI: 10.1089/tea.2007.0137
- ²²Shrivats RA, McDermott, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discov Today.* 2014;19(6):781-6.
- ²³Tour G, Wendel M, Tcacencu I. Cell-derived matrix enhances osteogenic properties of hydroxyapatite. *Tissue Eng Part A.* 2010;17,127-37.
- ²⁴Aydin S, Kucukyuruk B, Abuzayed B, Aydin S, Sanus GZ. Cranioplasty: review of materials and techniques. *J Neurosc Rural Pract.* 2011;2(2):162–67.
- ²⁵Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 2001;52:443-51.
- ²⁶Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, et al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg.* 2002;13(2):231-39.
- ²⁷Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1198-1211.
- ²⁸Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RG, Uth N. Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: a review. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(7):2460-81.
- ²⁹Cooper JA, Lu HH, Ko FK, Freeman JW, Laurencin CT. Fiber based tissue engineering scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials.* 2005;26:1523–32.

- ³⁰Wei G, Ma PX. Partially nanofibrous architecture of 3D tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2009;30:6426e34.
- ³¹Lu Q, Wang X, Lu S, Li M, Kaplan DL, Zhu H. Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process. *Biomaterials*. 2011;32:1059e67.
- ³²Riminucci M, Bianco P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(8):1027-36.
- ³³Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, *et al*. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17(4):327-36.
- ³⁴Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J. Surg*. 2010;34(4):632-4.
- ³⁵Iuan FC, Thomazini IA, Gianini MJM, Viterbo F, Toscano E, Moraes RA, Barraviera B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. *Sao Paulo Med. J*. 1995;113(5): 1000-02.
- ³⁶Barbosa MD, Gregghi SL, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J Periodontol* 2007;78(10):2026-31.
- ³⁷Brennan M. Fibrin glue. *Blood Ver*. 1991;5:240-4.
- ³⁸Duchenese B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. *Cornea*. 2001;20:230-2.
- ³⁹Erdey RA, Lindahl KJ, Temnycky GO, Aquavella JV. Techniques for application of tissue adhesive for corneal perforations. *Ophtalmic Surg*. 1991;22:352-4.
- ⁴⁰Khadem J, Truong T, Ernest JT. Photodynamic biologic tissue glue. *Cornea*. 1994;13:406-10.
- ⁴¹Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Mendes-giannini MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. *J Venom Anim Toxins*. 2001;7:1-10.
- ⁴²Gassling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(1):48-55.
- ⁴³Barros LC, Ferreira Jr. RS, Barraviera SRCS, *et al*. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. *J Toxicol Environ Health*. 2009;12(8):553-71.
- ⁴⁴Sawamura Y, Terasaka S, Ishii N, Tada M, Abe H. Osteoregenerative lateral suboccipital craniectomy using fibrin glue. *Acta Neurochir*. 1997;139:446-452.
- ⁴⁵Thomas Linsenmann, Camelia M Monoranu, Almuth F Kessler, Ralf I Ernestus and Thomas Westermaier. Bone chips, fibrin glue, and osteogenesis following lateral suboccipital craniectomy: a case report. *BMC Res Notes*. 2013;6:523.

- ⁴⁶Machado EG, Issa JP, Figueiredo FA, Santos GR, Galdeano EA, Alves MC, et al. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. *Acta Histochem.* 2015;117:288–296.
- ⁴⁷Rahal SC, Amaral MSP, Pai VD, et al. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2004;10(2):161-72.
- ⁴⁸Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS Jr, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res Bull.* 2015;112:14-24.
- ⁴⁹Biscola NP, Cartarzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2017;14;23:13.
- ⁵⁰Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira RS Jr, Buchaim DV, Rosa Jr GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury.* 2015;46(4):655-60.
- ⁵¹Buchaim DV, Rodrigues Ade C, Buchaim RL, Barraviera B, Ferreira Jr RS, Junior GM, et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers in MedSci.* 2016;31(5):965-72.
- ⁵²Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA Jr, Kaneno R, de Assis Golim M, dos Santos DC, et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *StemCell Res Ther.* 2017;8:205.
- ⁵³da Cunha MR, Menezes FA, dos Santos GB, Pinto CAL, Barraviera B, Martins VCA, et al. Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats. *Mater Res.* 2015;18(1): 196-203.
- ⁵⁴Abbade L, Barraviera SRCS, Silveiras MR, Ferreira RS Jr, Carneiro MTR, Medolago NB, et al. A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(Suppl 1):AB271.



CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO

Biopolímero de Fibrina associado a enxerto de osso autólogo para regeneração de calvária em coelhos

Camila Fernanda Zorzella Creste¹, Luis Antonio Justulin Junior², Danuta Pulz Doiche³, Benedito Barraviera^{1,4}, Aristides Augusto Palhares Neto⁵, Rui Seabra Ferreira Jr.^{1,4}

¹Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – UNESP, Botucatu – SP – Brasil.

²Departamento de Morfologia – IBB – UNESP, Botucatu – SP – Brasil.

³Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP, Botucatu – SP – Brasil.

⁴Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – FMB – UNESP, Botucatu – SP – Brasil.

⁵Departamento de Cirurgia e Ortopedia – FMB – UNESP, Botucatu – SP – Brasil.

Resumo

O reparo de defeitos ósseos ainda é considerado um grande desafio clínico, já que nenhum método de reconstrução disponível ou o uso de biomateriais provaram ser completamente eficazes. As lesões craniais, iatrogênicas ou traumáticas, ocasionam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, pois o tempo entre o estabelecimento da lesão e o reparo é longo. O reparo do defeito cranial regulariza anomalias encefalográficas, distúrbios de fluxo sanguíneo cerebral, a frequência de episódios epilépticos e reduz o dano psicossocial com a correção estética da lesão. O material mais utilizado para o preenchimento de defeitos pequenos é o enxerto ósseo autólogo retirado da crista íliaca, costelas ou da própria calvária. Entretanto, a quantidade necessária para o tratamento de defeitos de grande extensão pode tornar estas fontes inadequadas, bem como aumentar os riscos inerentes aos procedimentos cirúrgicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico regenerativo do Biopolímero de Fibrina (BF), produzido pelo CEVAP (UNESP – Botucatu, SP, Brasil), isolado ou em associação com diferentes percentuais de enxerto ósseo autólogo fragmentado (100%; 50% e 25%) em defeitos críticos (15mm) na calvária de coelhos. Foram utilizados 30 coelhos machos da raça *New Zealand*, divididos em 05 grupos de tratamento, de acordo com o tipo de preenchimento do defeito: 100%O – 100% de enxerto; 100%O+BF - 100% enxerto + BF; 50%O+BF – 50% enxerto + BF; 25%O+BF – 25% enxerto + BF; e BF – sem enxerto, somente BF. Foram utilizados 02mL de BF em todos os grupos. Após 56 dias de observação, foi realizada tomografia computadorizada para avaliação da área e perímetro do defeito, área de cobertura do enxerto e densidade óssea do preenchimento, seguida da eutanásia. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à área do defeito. Nas demais análises houve diferença entre grupos específicos. Dentre os grupos com menor percentual de enxerto, o grupo 50% OSSO + BF apresentou a menor mediana de perímetro e maior mediana de área de cobertura do enxerto. A análise histológica quantificou a composição do tecido de preenchimento do defeito. Com relação à formação de tecido ósseo, não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à formação de novos vasos sanguíneos e à quantificação de colágeno por área. A utilização do BF foi bem tolerada, sem efeitos adversos. É possível considerar a utilização de menores quantidades de fragmentos ósseos associados ao BF para a realização de cranioplastia. Considerando também a facilidade de uso e alta integração com o enxerto, o BF permitirá um procedimento mais rápido e menos invasivo para o paciente, reduzindo os riscos e custos, além do uso da menor quantidade de osso autólogo proposta (25%), associado ao BF, poder viabilizar o procedimento para pacientes com áreas doadoras escassas.

Palavras – chave: Biopolímero de fibrina, tecido ósseo, regeneração óssea, osso autólogo.

1. Introdução

A perda óssea provocada por traumas ou doenças tem sido um problema de saúde cada vez mais grave. O reparo de defeitos ósseos ainda é considerado um grande desafio clínico, já que nenhum método de reconstrução disponível ou o uso de biomateriais provaram ser completamente eficazes¹.

A craniotomia é amplamente utilizada para a redução da pressão intracraniana ocasionada, por exemplo, por trauma, edema cerebral agudo, acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico, reduzindo a dependência de ventilação mecânica e estadia em UTI². A craniotomia também pode ser necessária para a ressecção de tumores, retirada de tecido necrosado após radioterapia local ou processos infecciosos³.

A cranioplastia é o procedimento que visa restaurar a função protetora e estética da calota craniana, regularizando anomalias encefalográficas, distúrbios de fluxo sanguíneo cerebral e a frequência de episódios epilépticos^{4,5}. A reparação estética da lesão também reverte o impacto psicossocial, aumentando a qualidade de vida destes pacientes⁶. Entretanto, o período de tempo entre o estabelecimento do defeito e sua respectiva reparação é longo, o que pode resultar em um defeito crítico.

Um defeito ósseo crítico é anatomicamente uma perda óssea de tamanho suficiente para torná-la incapaz de cura sem qualquer cicatriz fibrótica ou pseudoartrose nas margens do defeito. Os tamanhos de defeitos críticos variam entre diferentes espécies animais e dependem da idade e da localização anatômica do defeito. Em coelhos machos e adultos, por exemplo, o diâmetro específico para o defeito crítico na calvária é de 15 mm^{7,8}.

O material mais utilizado para o preenchimento de defeitos pequenos é o enxerto ósseo autólogo retirado da crista ilíaca, costelas ou da própria calvária. Entretanto, a quantidade necessária para o tratamento de defeitos de grande extensão pode tornar estas fontes inadequadas^{8,9}.

O uso de enxerto ósseo autólogo apresenta vantagens como a alta biocompatibilidade; força e elasticidade semelhantes ao original; osteocondução; resistência à infecção; extrusão e sua relativa disponibilidade. Todavia, algumas

desvantagens do uso de osso autólogo incluem propensão à reabsorção, pouca maleabilidade, decréscimos subsequentes na força e na estética do contorno, e morbidade local variável entre os doadores³.

Vários materiais têm sido utilizados para reparar defeitos cranianos. O material ideal para ser usado em cranioplastia deve ser 1) radiolúcido, 2) resistente a infecções, 3) termoisolante, 4) resistente a processos biomecânicos, 5) maleável, para se ajustar completamente aos defeitos, 6) de baixo custo, e 7) pronto para uso¹⁰.

A principal função dos arcabouços é a de fornecer estrutura de sustentação para a migração e especialização das diferentes populações celulares envolvidas no reparo. Esta estrutura deve permitir a adesão celular, proliferação, diferenciação e função biológica para o restauro do tecido lesionado¹¹. O número de novos arcabouços tem aumentado devido, em parte, à visão otimista de que encontrar o *design* e material certos levará à regeneração óssea *in vivo*¹².

A escolha do arcabouço ideal deve levar em consideração materiais que equilibrem a função mecânica temporária juntamente com propriedades arquitetônicas, tal como forma dos poros, tamanho e interconectividade, para ajudar na comunicação biológica e regeneração de tecidos¹³.

A mistura de fragmentos de osso autólogo e cola de fibrina humana alogênica é uma técnica muito conhecida e foi relatada pela primeira vez em 1997, por Sawamura *et al.*¹⁴, onde foram obtidos resultados promissores para a osteorregeneração, porém, foi sugerida a adição de algum fator de crescimento ou adjuvante similar para aumentar ainda mais o valor clínico da técnica¹⁵.

O selante de fibrina, em sua concepção, é um agente hemostático, utilizado inicialmente em cirurgias vasculares, para minimizar a necessidade de reposição de fatores e a perda sanguínea em grandes cirurgias, especialmente em pacientes com distúrbios de coagulação¹⁶.

No processo natural de regeneração óssea, a lesão dispara uma resposta inflamatória aguda que causa a coagulação do hematoma nas extremidades da fratura e dentro da medula, formando o molde para a migração celular e formação do tecido ósseo^{9,17,18,19}.

A fibrina também atua como matriz para adesão de outras células como células endoteliais, que levam à neoangiogênese e à remodelação tecidual. Os fibroblastos então remodelam a estrutura de fibrina e sintetizam colágeno, dando

forma e estabilidade aos capilares²⁰.

No Biopolímero de Fibrina (BF) derivado do veneno de serpente, desenvolvido por pesquisadores do CEVAP (UNESP, *campus* de Botucatu), não há utilização de sangue humano em sua composição, possibilitando maior padronização, produção em maior escala e formulação personalizada às necessidades clínico-cirúrgicas, controlando o tempo de coagulação e degradação²¹.

O fato de não utilizar insumos de origem humana também reduz o risco de infecção por doenças transmissíveis pelo sangue⁴⁷ e seu custo de produção é inferior aos selantes comerciais²². E, além disso, tem sido utilizado em diversas aplicações da Medicina, como regeneração nervosa^{23, 24, 25, 26}, reparação óssea^{27, 28} e no tratamento de úlceras venosas em humanos²⁹.

A utilização do Biopolímero de Fibrina poderá se apresentar como uma importante alternativa cirúrgica, quando associado a osso autólogo. O seu uso está altamente recomendado, por não apresentar efeitos adversos sobre a viabilidade celular³⁰ e ter se mostrado uma matriz adequada para osteogênese²⁸, podendo assim contribuir para o conhecimento e melhora das terapias teciduais.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico da associação entre o Biopolímero de Fibrina (BF), produzido pelo CEVAP, e enxerto ósseo autólogo na regeneração óssea de defeitos críticos em calvária de coelhos, a fim de verificar a influência do BF nos processos de regeneração óssea e neovascularização local.

2. Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) sob nº 1198/2016 (Anexo 01), e seguiu, de maneira estrita, os critérios e princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

2.1. Animais

Foram utilizados 30 coelhos machos da raça *New Zealand*, pesando entre 3 e 3,5Kg e divididos em 05 grupos experimentais. Todos os procedimentos de eutanásia foram realizados com tiopental sódico na dose de 100mg/Kg, em infusão

venosa rápida, e, após o animal atingir o plano anestésico profundo, infusão venosa rápida de 05mL de solução de cloreto de potássio a 19,1%.

O peso dos animais foi utilizado como indicador de bem-estar e foi calculado imediatamente antes do procedimento cirúrgico e no momento da eutanásia, após 56 dias.

2.2. Desenho experimental

Em todos os grupos foi realizado um defeito de 15mm de diâmetro e de espessura total da calvária. Cada grupo recebeu preenchimento nos defeitos conforme descrito no quadro 01. A dose do Biopolímero de Fibrina utilizada em todos os grupos experimentais foi preestabelecida pelo CEVAP, resultando em 2mL de volume final.

Quadro 01– Distribuição dos grupos experimentais por tipo de tratamento (06 animais por grupo).

GRUPO (SIGLA)	TIPO DE PREENCHIMENTO
100% O	100% do osso autólogo fragmentado
100% O +BF	100% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
50% O + BF	50% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
25% O + BF	25% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
BF	Somente 2mL de BF

O = osso autólogo do coelho; BF = Biopolímero de Fibrina

Após 56 dias de observação³¹, os animais foram anestesiados para realização da análise tomográfica, seguida da eutanásia, e por fim, foi realizada a retirada da amostra tecidual para posterior análise morfométrica.

2.3. Obtenção do Biopolímero de Fibrina

O Biopolímero de Fibrina foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), FMB, UNESP - Botucatu, cujos

componentes e fórmula de aplicação constam em suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto^{28,30,32}.

2.4. Procedimento cirúrgico para a realização do defeito crítico em calvária de coelhos

Em cada coelho foi realizado um defeito crítico cranial de espessura total da calvária e 15mm de diâmetro. Cada animal foi anestesiado com xilazina (3,0mg/Kg) e quetamina (30mg/Kg), via acesso venoso na veia marginal da orelha. O acesso foi mantido durante todo o procedimento cirúrgico, caso houvesse necessidade de reforço da medicação anestésica.

Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral e foi realizada uma incisão arqueada ao longo da linha média longitudinal, com a finalidade de evitar formação cicatricial no centro do defeito. Após exposição do tecido ósseo, um defeito crítico de 15mm de diâmetro foi realizado com a utilização de broca de 1,0mm de diâmetro acoplada a um minimotor de alta rotação, mantendo a integridade da dura-máter (Figura 01). Durante todo o processo de perfuração do osso, o local foi irrigado com solução de cloreto de sódio 0,9%, estéril, para evitar o superaquecimento do osso.



Figura 01 – Defeito crítico já realizado (sem tratamento).

Nos grupos em que o defeito foi preenchido com osso autólogo, o osso foi retirado intacto da calvária dos coelhos, e em seguida, foi fragmentado em partículas de tamanhos semelhantes, utilizando instrumental cirúrgico específico (sacabocado). O material fragmentado foi pesado e o percentual de osso a ser utilizado no preenchimento do defeito foi calculado para os grupos que receberam 50% e 25% de osso autólogo, sendo imediatamente retornado ao local do defeito. No grupo 100% todo o material fragmentado foi imediatamente retornado ao local do defeito.

No grupo preenchido apenas com BF foram aplicados 2mL do biopolímero, dose pré-estabelecida pelo fornecedor. Nos grupos preenchidos com osso autólogo associado ao BF, além do percentual correspondente de enxerto ósseo, foram aplicados 2mL de BF.

A sutura foi realizada após aproximadamente 03 minutos para a correta polimerização e fixação do BF no local do defeito. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualizados em observação, até o retorno anestésico completo e receberam Tramadol (5mg/Kg), via intramuscular, a cada 12 horas por 03 dias, e Enrofloxacino (10mg/Kg), via intramuscular, a cada 24 horas por 03 dias.

2.5. Análises pós-operatórias

2.5.1 Acompanhamento pós-operatório dos animais

Nos sete dias subsequentes ao procedimento cirúrgico, os animais foram avaliados diariamente quanto a eventos adversos. A partir do D+8, os animais foram avaliados a cada 48h até o término do período experimental.

2.5.2. Tomografia computadorizada tridimensional

Os exames tomográficos foram realizados com os coelhos em decúbito ventral, com a coluna cervical e o crânio estendidos de forma que o palato duro estivesse paralelo à mesa. As imagens foram obtidas em tomógrafo *single-slice CT scanner*, modelo SCT-7800CT (Shimadzu, Kyoto, Japão), no corte transversal e posteriormente reconstruídas com software de pós-processamento Voxar[®] (Barco, Kortrijk, Bélgica) em cortes longitudinais/sagitais e coronais/dorsais. As imagens foram avaliadas com ferramentas do sistema PACS SINAPSE[®]

(Fujifilm, Tokyo, Japão), quanto ao preenchimento da falha óssea e à aparência tomográfica dos enxertos^{33, 34}.

Foram avaliados a área (mm²) e o perímetro (mm) do defeito, a área de cobertura do enxerto (mm²) e a densidade do tecido expressa como o valor médio de unidades Hounsfield no foco (UH).

2.5.3. Análise histológica

Os ossos foram coletados e fixados em formalina tamponada a 04%, por 48h e em seguida descalcificados em EDTA 10% diluído em PBS por 30 dias. Após descalcificação, foi mantida apenas a área receptora do implante e uma pequena região de osso intacto. As amostras foram lavadas em água corrente *overnight*, desidratadas em série crescente de álcool etílico, diafanizadas em xilol e, finalmente, incluídas em Paraplast® (Sigma Co., Saint Louis, MO). Os cortes foram confeccionados de maneira que as análises sempre fossem realizadas nas regiões de maior área de lesão.

Os cortes histológicos, com 5µm de espessura, foram corados pela Hematoxilina e Eosina para visão geral da morfologia óssea e por Picrossirius para quantificação de colágeno.

Nas análises estereológicas foram determinadas, nos diferentes grupos experimentais, as porcentagens dos diferentes compartimentos teciduais compreendidos na área de lesão (vasos sanguíneos, tecido adiposo, tecido fibroso e área de formação óssea). Para estas análises, foi utilizada a metodologia proposta por Weibel com uma grade com 168 pontos de teste³⁵. Foram analisadas, em média, 10 fotos de cada lâmina por animal, utilizando a objetiva de 20X. Para se determinar a quantidade de colágeno, as lâminas coradas com a técnica de picrossirius foram fotografadas no aumento de 20X. Foram capturadas, em média, 10 fotos de cada lâmina por animal. A área ocupada pelo colágeno foi detectada automaticamente pelo software LeicaQWin versão 3.0, e expressa em porcentagem.

2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism® (versão 5.00; GraphPad Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste de KRUSKAL-WALLIS) seguida do teste de Dunns pareado (pós-teste). Os resultados foram expressos como mediana,

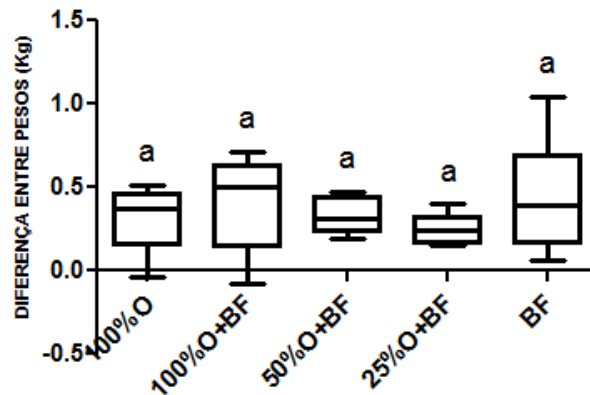
percentis (25 e 75) e valores mínimo e máximo, e foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Avaliação pós-operatória

Não foram observados eventos adversos ou quaisquer alterações fisiológicas em decorrência do procedimento cirúrgico. Os animais mantiveram alimentação e ciclos de claro-escuro inalterados durante todo o período. Não foram observadas rupturas de suturas ou processos infecciosos/inflamatórios.

A figura 02 apresenta a diferença das médias de peso dos coelhos entre o período de procedimento cirúrgico e eutanásia. Não houve diferença significativa entre os grupos. A análise da mediana demonstrou ganho de peso durante o período de observação, indicando que os animais continuaram alimentando-se normalmente, mesmo depois do procedimento cirúrgico.

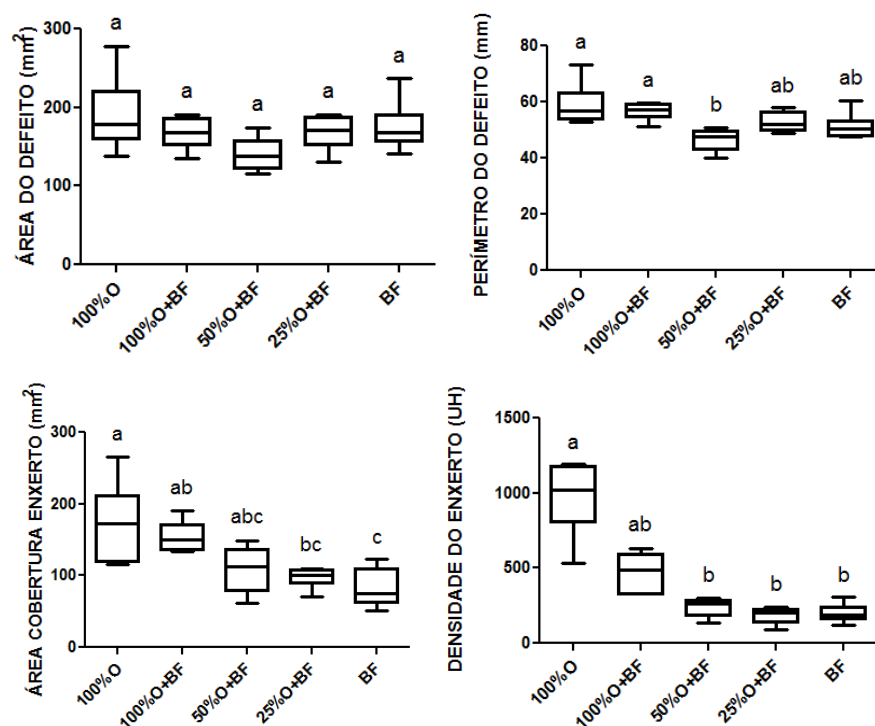


100%O: 100% enxerto ósseo; 100%O+BF: 100% enxerto + BF; 50%O+BF: 50% enxerto + BF; 25%O+BF: 25% enxerto + BF; BF: somente Biopolímero de Fibrina.

Figura 02. Diferença da média dos pesos dos animais entre procedimento cirúrgico e eutanásia. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

3.2. Tomografia computadorizada tridimensional

Os valores de área e perímetro do defeito, área de cobertura do enxerto e a densidade do enxerto expressa em valor médio de unidades Hounsfield no foco (UH) estão apresentados a seguir.



100%O: 100% enxerto ósseo; 100%O+BF: 100% enxerto + BF; 50%O+BF: 50% enxerto + BF; 25%O+BF: 25% enxerto + BF; BF: somente Biopolímero de Fibrina.

Figura 03. Área e perímetro do defeito (acima); área de cobertura e densidade do enxerto (abaixo) após 56 dias. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na figura 03 não foi possível observar diferença estatística entre os grupos com relação à área do defeito. Em relação ao perímetro do defeito, foi possível observar que o grupo tratado com 50%O+BF apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos 100%O e 100%O+BF. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre si.

O grupo 100%O apresentou maior valor de mediana da área de cobertura do enxerto com diferença estatística significativa em relação aos grupos 25%O+BF e BF. O grupo 100%O+BF também apresentou diferença significativa em relação aos grupos 25%O+BF e BF. E os grupos 50%O+BF, 25%O+BF e BF não apresentaram diferença estatística entre si.

Quanto à densidade do enxerto, foi possível observar que o grupo 100%O apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos 50%O+BF, 25%O+BF e BF, porém não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo 100%O+BF.

3.3. Análise histológica

Na figura 04 é possível observar alguns fragmentos ósseos ao longo da área da lesão, presença de tecido fibroso entre eles e tecido adiposo na camada mais interna, no grupo 100% OSSO.



Figura 04. Sequência de imagens microscópicas (20x), coradas com H&E, demonstrando a lesão de três dos animais do grupo 100% OSSO, onde: TO = tecido ósseo; TF = tecido fibroso; TA = tecido adiposo; VS = vaso sanguíneo.

Na figura 05 observa-se a presença de tecido ósseo distribuído pela lesão, intercalado com tecido fibroso e adiposo, no grupo 100% OSSO + BF.

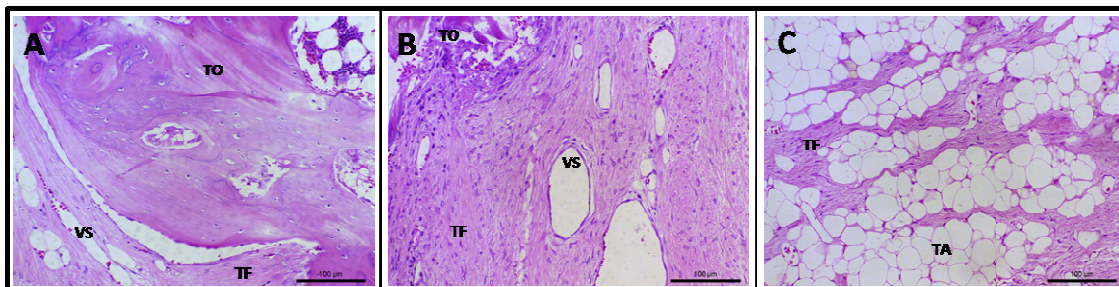


Figura 05. Sequência de imagens microscópicas (20x), coradas com H&E, demonstrando a lesão de três dos animais do grupo 100% Osso + BF, onde: TO = tecido ósseo; TF = tecido fibroso; TA = tecido adiposo; VS = vaso sanguíneo.

Na figura 06, podemos notar alguns fragmentos ósseos na área de lesão, porém com predominância de tecido fibroso, no grupo 50% OSSO + BF.



Figura 06. Sequência de imagens microscópicas (20x), coradas com H&E, demonstrando a lesão de três dos animais do grupo 50% OSSO + BF, onde: TO = tecido ósseo; TF = tecido fibroso; TA = tecido adiposo; VS = vaso sanguíneo.

No grupo 25%OSSO +BF (figura 07), a quantidade de fragmentos ósseos é menor do que nos grupos anteriores.

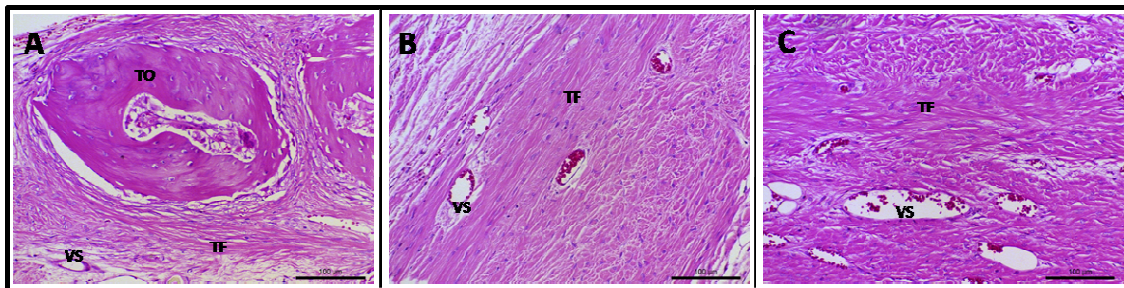


Figura 07. Sequência de imagens microscópicas (20x), coradas com HE, demonstrando a lesão de três dos animais do grupo 25% OSSO + BF, onde: TO = tecido ósseo; TF = tecido fibroso; VS = vaso sanguíneo.

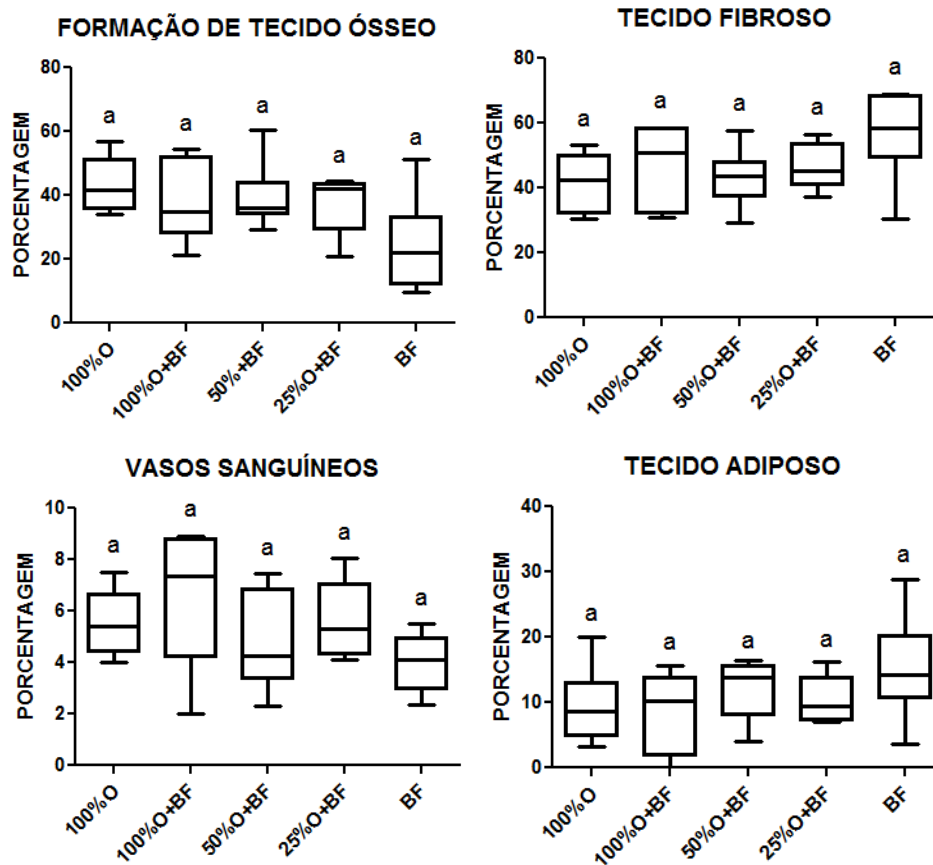
A figura 08, do grupo tratado com BF, mostra a maior quantidade de tecido adiposo e a menor quantidade de tecido de formação óssea, quando comparado aos demais grupos.



Figura 08. Sequência de imagens microscópicas (20x), coradas com H&E, demonstrando a lesão de três dos animais do grupo BF, onde: TO = tecido ósseo; TF = tecido fibroso; TA = tecido adiposo; VS = vaso sanguíneo.

3.4. Quantificação dos diferentes tipos de tecidos

A quantificação dos diferentes tecidos presentes na área do defeito permitiu calcular a porcentagem média de cada tecido. Os valores da quantificação de tecido ósseo, tecido fibroso, vasos sanguíneos e tecido adiposo estão apresentados abaixo.



100%O: 100% enxerto ósseo; 100%O+BF: 100% enxerto + BF; 50%O+BF: 50% enxerto + BF; 25%O+BF: 25% enxerto + BF; BF: somente Biopolímero de Fibrina.

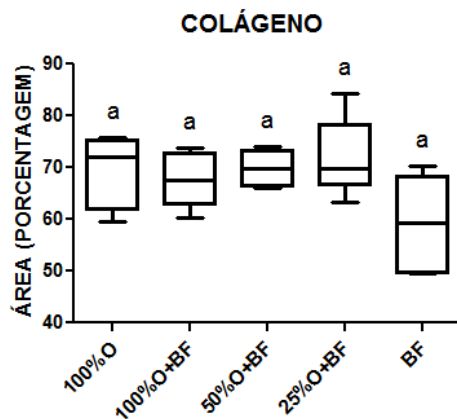
Figura 09. Percentual de tecido ósseo (superior esquerdo), tecido fibroso (superior direito), vasos sanguíneos (inferior esquerdo) e tecido adiposo (inferior direito) após 56 dias. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos de tratamento com relação a todos os tipos de tecidos observados e quantificados.

Vale destacar em formação de tecido ósseo, o alto valor da mediana apresentada pelo grupo 50%O+BF, e sua proximidade com o valor da mediana do grupo 100%O, utilizado como padrão ouro.

3.4.1. Quantificação de colágeno

Na figura 10 foi possível observar que não houve diferença estatística entre os grupos com relação à quantificação de colágeno.

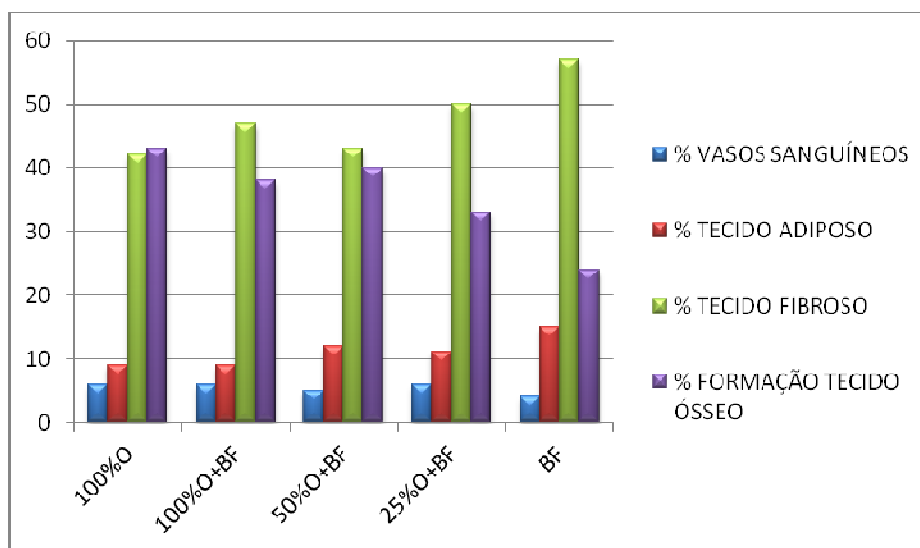


100%O: 100% enxerto ósseo; 100%O+BF: 100% enxerto + BF; 50%O+BF: 50% enxerto + BF; 25%O+BF: 25% enxerto + BF; BF: somente Biopolímero de Fibrina.

Figura 10. Porcentagem de colágeno por área, nos grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3.4.2. Composição histológica média

A composição histológica média do preenchimento nos diferentes grupos experimentais está demonstrada na Figura 11 a seguir:



100%O: 100% enxerto ósseo; 100%O+BF: 100% enxerto + BF; 50%O+BF: 50% enxerto + BF; 25%O+BF: 25% enxerto + BF; BF: somente Biopolímero de Fibrina.

Figura 11. Composição histológica média (%) de vasos sanguíneos, de tecido adiposo, de tecido fibroso e de formação de tecido ósseo, nos grupos experimentais.

4. Discussão

O desenvolvimento de um biopolímero abre um grande leque na sua utilização, seja em procedimentos cirúrgicos invasivos, ou ainda em curativos superficiais. Considerando que o Biopolímero de Fibrina é um polímero heterólogo, poderia existir a possibilidade de reação alérgica ou de corpo estranho, o que não foi observado em nossos experimentos. A aplicação do BF, na concentração proposta pelo CEVAP, foi bem tolerada pelos animais já que não foram observados sinais de reação inflamatória nem sangramento no local, assim como visto por Oliveira Gonçalves *et al.*, 2016³⁶. Além disso, estudos anteriores demonstraram não haver citotoxicidade causada pelo BF⁵², sendo bem aceito no tratamento contínuo de feridas crônicas em pacientes humanos²⁹.

A pequena variação da média no peso dos animais entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Sendo o peso um dos indicadores de bem-estar, nossos dados demonstram que o processo cirúrgico foi bem padronizado e que o manejo dos animais foi adequado.

Fragments, partículas ou pó de osso são frequentemente coletados anteriormente à cranioplastia e misturados com polímeros de fibrina comerciais, úteis para o preenchimento de defeitos cranianos⁷. Os selantes de fibrina têm sido utilizados com frequência para diminuição de sangramento³⁷ e de espaço “morto” em campos cirúrgicos, bem como para evitar extravasamento de conteúdo, como, por exemplo, em cirurgias do trato gastrointestinal³⁸. O uso do selante de fibrina pode proporcionar a redução do tempo de cirurgia visto que, a diminuição do sangramento permite uma melhor visualização do sítio cirúrgico. Adicionalmente, suas propriedades adesivas favorecem a estabilização e a fixação dos enxertos, especialmente no uso de material particulado como o enxerto autólogo fragmentado ou substitutos ósseos sintéticos de alto valor agregado, evitando a perda de material, em especial, em áreas com alto fluxo sanguíneo e de difícil acesso. Nos casos de pacientes com poucas áreas doadoras e escassez de material para compor o enxerto ósseo autólogo, esta característica torna-se ainda mais relevante.

Os grupos tratados com diferentes quantidades de fragmentos de osso autólogo associados ao BF não apresentaram diferença estatística entre si em relação à formação de tecido ósseo. Tais resultados podem estar relacionados ao fato do BF ter atuado inicialmente como uma barreira física entre os fragmentos

ósseos, impedindo maiores taxas de osteocondução e osteoindução. Mesmo mimetizando a fase final da cascata de coagulação, a presença de uma malha de fibrina extremamente densa pode ser prejudicial para a mobilidade das células responsáveis pela regeneração e modelação óssea a ponto de impedir que diversas atividades celulares aconteçam naturalmente³⁹.

O BF pode atuar preenchendo espaços vazios, diminuindo a formação do hematoma natural fibrina-trombina-plaqueta, que contém fatores de crescimento derivados de plaquetas. Outra explicação pode ser que o crescimento vascular no osso enxertado e no tecido fibroso circundante possa ser retardado pelo BF. No entanto, sabemos que o processo biológico de como o polímero de fibrina parece atrasar a ossificação permanece desconhecido e necessita de um estudo mais aprofundado⁷.

A concentração de fibrina no BF pode ser otimizada para melhor atender à aplicação clínica proposta. Em nosso trabalho, utilizamos a concentração previamente padronizada para aplicação tópica em úlceras dérmicas²⁹, a qual requer uma rápida polimerização e grande densidade para a proteção da úlcera. Embora o mecanismo fisiológico de reparo seja semelhante e o estudo anterior tenha apresentado resultados positivos, a concentração utilizada não foi adequada para a aplicação proposta, que visava acelerar o processo regenerativo ou reduzir a quantidade de osso necessária. Estudos demonstraram que a concentração de fibrinogênio nos selantes de fibrina alteram o diâmetro das fibras e dos poros da rede o que altera as características físicas de adesividade às bordas da lesão e de migração celular^{40,41}. Uma nova padronização da concentração de fibrina poderá resultar em uma malha menos densa, propiciando o desenvolvimento de tecido ósseo observado em estudos anteriores^{27,30}.

Em nosso estudo, mesmo não havendo diferença estatística entre os grupos de tratamento quanto à formação de tecido ósseo, vale destacar o alto valor da mediana apresentada pelo grupo 50%O+BF, e sua proximidade com o valor da mediana do grupo 100%O, utilizado como padrão ouro na realização de cranioplastias⁴². Além disso, o grupo 50%O+BF apresentou os menores valores de mediana para a área e perímetro do defeito.

Baseando-se nestes resultados é possível considerar a alternativa da utilização de menores quantidades de fragmentos ósseos quando associados ao BF, para a realização de cranioplastias. Com isso, o procedimento poderá se tornar

mais rápido e menos invasivo, reduzindo os riscos inerentes aos procedimentos cirúrgicos e a morbidade no pós-operatório, além de otimizar o custo do procedimento.

Além disso, não houve diferença estatística entre os grupos 50%O+BF e 25%O+BF, em relação à formação óssea, embora o segundo grupo apresente mediana de área e perímetro do defeito maiores que o grupo 50%O+BF. O uso da menor quantidade de osso autólogo proposta (25%), em associação ao BF, poderá viabilizar o procedimento para pacientes sem áreas doadoras ou com áreas doadoras escassas, reduzindo ou evitando o uso de enxertos ósseos heterólogos ou mesmo substitutos ósseos comerciais.

A fragmentação do tecido ósseo influencia no processo de remodelação/reabsorção visto que, mesmo nos grupos onde 100% do material retirado da área do defeito foi implantado, não houve regeneração completa, e até mesmo, redução do tecido ósseo na área de preenchimento. Isto pode estar associado à implantação de 100% do enxerto no local da lesão, o qual também possa ter atuado como uma barreira física, impedindo a formação do hematoma natural, e, conseqüentemente, reduzindo a migração celular, a oferta de citocinas e de matriz para a condução do processo regenerativo normal.

Não houve diferença entre os grupos em relação à angiogênese. Isto pode estar relacionado à outras características fisiológicas não avaliadas em nosso modelo como, por exemplo, a vascularização do tecido adjacente ao leito da ferida. Observamos que a mediana do grupo BF foi inferior aos demais grupos, indicando um retardo na angiogênese. Apesar de não ser um efeito benéfico para este modelo de estudo, esta característica do BF pode ser vantajosa para regeneração de tecidos onde a baixa vascularização é necessária para a correta diferenciação celular, como por exemplo, tecido cartilaginoso.

5. Conclusões

A utilização do Biopolímero de Fibrina na concentração proposta pelo CEVAP foi bem tolerada, sem efeitos adversos.

A associação do BF ao enxerto ósseo autólogo permite a redução da quantidade de material ósseo utilizado, mantendo as mesmas taxas de regeneração óssea, o que foi evidenciado pela formação de tecido ósseo, redução da área e perímetro da lesão.

É possível considerar a condução de ensaios clínicos utilizando menores quantidades de fragmentos ósseos associados ao BF para a realização de cranioplastia. Considerando também a facilidade de uso e alta integração com o enxerto, o BF permitirá um procedimento mais rápido e menos invasivo para o paciente, reduzindo os riscos e custos da cranioplastia.

O uso da menor quantidade de osso autólogo proposta (25%), em associação ao BF, poderá viabilizar o procedimento para pacientes sem áreas doadoras ou com áreas doadoras escassas. Estas características permitem ampliar as aplicações terapêuticas e abrem novos campos de aplicação para o Biopolímero de Fibrina.

6. Referências

- ¹Zhao L, Zhao J, Yu J, Sun R, Zhang X, Hu S. *In vivo* investigation of tissue-engineered periosteum for the repair of allogeneic critical size bone defects in rabbits. *Regen Med*. 2017;12(4):353-64.
- ²Cooper JD, Rosenfeld JV, Murray L, Arabi YM, Davies AR, D'Urso P, et al. Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. The DECRA Trial. *N Eng J Med*. 2011;364(16):1943-52.
- ³Klinger DR, Madden C, Beshay J, White J, Gambrell K, Rickert K. Autologous and acrylic cranioplasty: a review of 10 years and 258 cases. *World Neurosurg*. 2014;82:3/4:e525-e530. DOI:10.1016/j.wneu.2013.08.005.
- ⁴Sanan A, Haines SJ. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery*. 1997;40:588-603.
- ⁵Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JR, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg* 2004;100 (2):163-68.
- ⁶Shah AM, Jung H, Skirboll S. Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurg Focus*. 2014;36(4):E19. DOI:10.3171/2014.2.FOCUS13561.
- ⁷Lappalainen O, Korpi R, Haapea M, Korpi J, Ylikontiola LP, Kallio-Pulkkinen S, et al. Healing of rabbit calvarial critical-sized defects using autogenous bone grafts and fibrin glue. *Childs Nerv Syst*. 2015;31:581-7.
- ⁸Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012;7:1918-29.
- ⁹Di Bella C, Farlie P, Penington AJ. Bone regeneration in a rabbit critical-sized skull defect using autologous adipose-derived cells. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(4):483-90. DOI: 10.1089/tea.2007.0137.
- ¹⁰Aydin S, Kucukyuruk B, Abuzayed B, Aydin S, Sanus GZ. Cranioplasty: review of materials and techniques. *J Neurosci Rural Pract*. 2011;2(2):162-167.
- ¹¹Shrivats RA, Mc Dermott, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Dru Disco Today*. 2014;19(6):781-6.
- ¹²Tour G, Wendel M, Tcacencu I. Cell-derived matrix enhances osteogenic properties of hydroxyapatite. *Tissue Eng Part A*. 2010;17:127-37.
- ¹³Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RG, Uth N. Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: a review. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(7):2460-81.
- ¹⁴Sawamura Y, Terasaka S, Ishii N, Tada M, Abe H. Osteoregenerative lateral suboccipital craniectomy using fibrin glue. *Acta Neurochir*. 1997;139:446-52.
- ¹⁵Linsenmann T, Monoranu CM, Kessler AF, Ernestus RI, Westermaier T. Bone chips, fibrin glue and osteogenesis following lateral suboccipital craniectomy: a case report. *BMC Res Notes*. 2013;6:523-6.

- ¹⁶Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J Surg.* 2010;34(4):632–4.
- ¹⁷Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873–84.
- ¹⁸Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392–404.
- ¹⁹Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Ortho Rel Res.* 1998;355(Suppl):S7–21.
- ²⁰Gassling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod.* 2009;108(1):48–55.
- ²¹Ferreira RS J, de Barros LC, Abbade LPF, Barraviera SRCS, Silveiras MRC, de Pontes LG, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside – an overview. *J VenomAnimToxinsinclTropDis.* 2017;23:21.
- ²²Barros LC, Ferreira RS Jr, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJ, et al. A new fibrin sealant from *Crotalusdurissusterrificus* venom: applications in medicine. *J ToxicolEnviron Health.* 2009;12(8):553-71
- ²³Cartarozzi LP, Spejo AB, Ferreira RS Jr, Barraviera B, Duek E, Carvalho JL, et al. Mesenchymal stem cells engrafted in a fibrin scaffold stimulate Schwann cell reactivity and axonal regeneration following sciatic nerve tubulization. *Brain Res Bull.* 2015;112:14-24.
- ²⁴Biscola NP, Cartarzi LP, Ulian-Benitez S, Barbizan R, Castro MV, Spejo AB, et al. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2017;14;23:13.
- ²⁵Buchaim RL, Andreo JC, Barraviera B, Ferreira RS Jr, Buchaim DV, Rosa Jr GM, et al. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on peripheral nerve regeneration using fibrin glue derived from snake venom. *Injury.* 2015;46(4):655-60.
- ²⁶Buchaim DV, Rodrigues Ade C, Buchaim RL, Barraviera B, Ferreira Jr RS, Junior GM, et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. *Lasers in Med Science.* 2016;31(5):965-72.
- ²⁷Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA Jr, Kaneno R, de Assis Golim M, dos Santos DC, Zorzella Creste CF, et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *StemCell Res Ther.* 2017;8:205.
- ²⁸da Cunha MR, Menezes FA, dos Santos GB, Pinto CAL, Barraviera B, Martins VCA, et al. Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats. *Mater Res.* 2015;18(1): 196-203.

- ²⁹Abbade L, Barraviera SRCS, Silveiras MR, Ferreira RS Jr, Carneiro MTR, Medolago NB, et al. A new fibrin sealant derived from snake venom candidate to treat chronic venous ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(Suppl 1):AB271.
- ³⁰Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(3):78.
- ³¹Lappalainen OP, Karhula S, Haapea M, Kyllonen L, Haimi S, Miettinen S, et al. Bone healing in rabbit calvarial critical-sized defects filled with stem cells and growth factors combined with granular or solid scaffolds. *Childs Nerv Syst*. 2016 Apr;32(4):681-8.
- ³²Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011;17(1):23-33.
- ³³Saunders J, Schwartz T. Principles of CT Image Interpretation. In: Schwartz T, Saunders J (ed.). *Veterinary Computed Tomography*. 1st ed. Hoboken, NJ: Willey-Blackwell, 2011. p. 29-34.
- ³⁴Thrall DE. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. 7^aed. St Louis, MO:Elsevier, 2018.
- ³⁵Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*. 1966;30(1):23-38.
- ³⁶de Oliveira Gonçalves JB, Buchaim DV, de Souza Bueno CR, Pomini KT, Barraviera B, Júnior RSF, et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *J Photochem Photobiol B*. 2016;162:663-668.
- ³⁷Zhao Z, Ma X, Ma J, Sun X, Li F, Lu J. A systematic review and meta-analysis of the topical administration of fibrin sealant in total hip arthroplasty. *Sci Rep*. 2018;8:78. doi: 10.1038/s41598-017-16779-3.
- ³⁸Papavramidis ST1, Eleftheriadis EE, Papavramidis TS, Kotzampassi KE, Gamvros OG. Endoscopic management of gastrocutaneous fistula after bariatric surgery by using a fibrin sealant. *Gastrointest Endosc*. 2004 Feb;59(2):296-300.
- ³⁹Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:4937-61.
- ⁴⁰Lee HH, Haleem AM, Yao V, Li J, Xiao X, Chu CR. Release of bioactive adeno-associated virus from fibrin scaffolds: effects of fibrin glue concentrations. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(15-16):1969-78. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0586.
- ⁴¹Campos F, Fujio S, Sugata S, Tokimura H, Hanaya R, Bohara M, Arita K. Effect of thrombin concentration on the adhesion strength and clinical application of fibrin glue-soaked sponge. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(1):17-20.
- ⁴²Maenhoudt W, Hallaert G, Kalala JP, Baert E, Dewaele F, Bauters W, et al. Hydroxyapatite cranioplasty: a retrospective evaluation of osteointegration in 17 cases. *Acta Neurochir (Wien)*. 2018;160(11):2117-24.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado CEUA

		
Comissão de Ética no Uso de Animais Cidade atendida da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012		
CERTIFICADO Nº 1198/2016-CEUA		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Potencial terapêutico do Selante Heterólogo de Fibrina associado ao enxerto ósseo autógeno e células tronco para a regeneração de defeitos críticos cranianos em coelhos", registrada com o n. 1198/2016, sob a responsabilidade da Camila Fernanda Zorzella Cresce, orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 27/10/2016.</p>		
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização	30/04/2017	
Espécie/Linhagem/Raça	Coelho New Zealand	
Nº de animais	70	
Peso/Idade	1,5 quilos/2 meses	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNESP - Botucatu	
<p> Prof. Dra. Moema Sousa Rocha Vice-Presidente de CEUA</p> <p> Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA</p>		
Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-687 Fone: (14) 3880-1628/980-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br		

ANEXO II –Material adicional

MATERIAL E MÉTODOS (versão expandida)

Animais

Foram utilizados 30 coelhos machos da raça *New Zealand*, pesando entre 1,5 e 2,0Kg, quando fornecidos pelo Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu - São Paulo. Foram divididos em 05 grupos de 06 animais cada. Os coelhos foram mantidos individualmente, em gaiolas suspensas de aço inox no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), da FMB, UNESP – Botucatu.

Durante o período experimental, os animais ficaram aclimatados à temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de claro-escuro de 12 horas e foram alimentados com ração de manutenção Labina-Purina® e água *ad libitum*. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados quando os animais atingiram o peso de 3,0 a 3,5Kg.

Todos os procedimentos de eutanásia foram realizados com tiopental sódico na dose de 100mg/Kg, em infusão venosa rápida, e, após o animal atingir o plano anestésico profundo, infusão venosa rápida de 05mL de solução de cloreto de potássio a 19,1%.

O peso dos animais foi utilizado como indicador de bem estar e foi calculado imediatamente antes do procedimento cirúrgico e no momento da eutanásia, após 56 dias.

Desenho experimental

Em todos os grupos foi realizado um defeito de 15mm de diâmetro e de espessura total da calvária. Cada grupo recebeu um tratamento e/ou preenchimento nos defeitos conforme descrito no quadro 01. A dose do Biopolímero de Fibrina utilizada em todos os grupos experimentais foi preestabelecida pelo CEVAP, resultando em 02mL de volume final (0,4mL Fração 01(crioprecipitado extraído de bubalinos) + 1mL Fração 02 (serinoprotease extraída de veneno de serpente) + 0,6 mL Diluente (cloreto de cálcio)).

Quadro 01– Distribuição dos grupos experimentais por tipo de tratamento (06 animais por grupo).

GRUPO (SIGLA)	TIPO DE PREENCHIMENTO
100% O	100% do osso autólogo fragmentado
100% O +BF	100% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
50% O + BF	50% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
25% O + BF	25% do osso autólogo fragmentado + 2mL de BF
BF	Somente 2mL de BF

O = osso autólogo do coelho; BF = Biopolímero de Fibrina

Após 56 dias de observação¹, os animais foram anestesiados e encaminhados ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP - Botucatu, para serem obtidas imagens de tomografia computadorizada (TC) tridimensional. Após o retorno imediato ao laboratório de pesquisa, os animais foram eutanasiados, para a retirada da amostra tecidual e posterior análise morfométrica.

Obtenção do Biopolímero de Fibrina

O Biopolímero de Fibrina foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), FMB, UNESP - Botucatu, cujos componentes e fórmula de aplicação constam em suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto^{2, 3, 4}.

Procedimento cirúrgico para a realização do defeito crítico em calvária de coelhos

Em cada coelho foi realizado um defeito crítico cranial de espessura total da calvária e 15mm de diâmetro. Cada animal foi anestesiado com xilazina (3,0mg/Kg)

e quetamina (30mg/Kg), via acesso venoso na veia marginal da orelha. O acesso foi mantido durante todo o procedimento cirúrgico, caso houvesse necessidade de reforço da medicação anestésica.

Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral e foi realizada uma incisão arqueada ao longo da linha média longitudinal, com a finalidade de evitar formação cicatricial no centro do defeito. Após exposição do tecido ósseo, um defeito crítico de 15mm de diâmetro foi realizado com a utilização de broca de 1,0mm de diâmetro acoplada a um minimotor de alta rotação, mantendo a integridade da dura-máter (Figura 01). Durante todo o processo de perfuração do osso, o local foi irrigado com solução de cloreto de sódio 0,9%, estéril, para evitar o superaquecimento do osso.

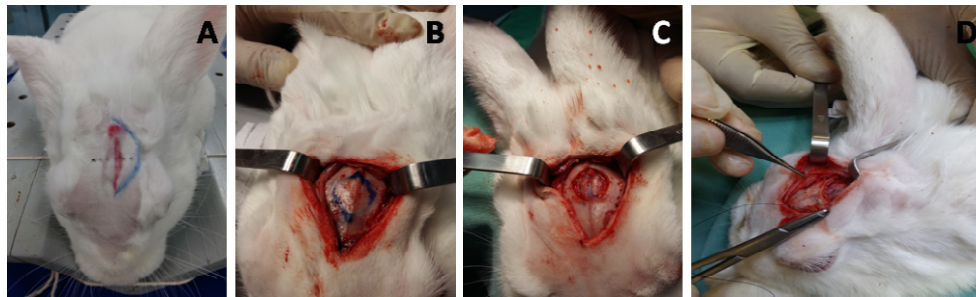


Figura 01 – **A.** Marcação cirúrgica da linha média longitudinal. **B.** Marcação cirúrgica da área do defeito crítico de 15mm de diâmetro. **C.** Defeito crítico já realizado (sem tratamento). **D.** Realização da sutura.

Nos grupos em que o defeito foi preenchido com osso autólogo, o osso foi retirado intacto da calvária dos coelhos, e em seguida, foi fragmentado em partículas de tamanhos semelhantes, utilizando instrumental cirúrgico específico (sacabocado). O material fragmentado foi pesado e o percentual de osso a ser utilizado no preenchimento do defeito foi calculado para os grupos que receberam 50% e 25% de osso autólogo, sendo imediatamente retornado ao local do defeito. No grupo 100% todo o material fragmentado foi imediatamente retornado ao local do defeito.

No grupo preenchido apenas com BF foram aplicados 02mL do biopolímero, dose pré-estabelecida pelo fornecedor. Nos grupos preenchidos com osso autólogo associado ao BF, além do percentual correspondente de enxerto ósseo, foram aplicados 02mL de BF.

A sutura foi realizada após aproximadamente 03 minutos para a correta polimerização e fixação do BF no local do defeito. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos individualizados em observação, até o retorno anestésico completo e receberam Tramadol (05mg/Kg), via intramuscular, a cada 12 horas por 03 dias, e Enrofloxacino (10mg/Kg), via intramuscular, a cada 24 horas por 03 dias.

Análises pós-operatórias

Acompanhamento pós-operatório dos animais

Nos sete dias subsequentes ao procedimento cirúrgico, os animais foram avaliados diariamente quanto a eventos adversos (ruptura da sutura, sangramento), sinais e sintomas de infecção e inflamação (edema, eritema, extrusão purulenta), evidência de lesões neurológicas (alterações de comportamento, falha na deambulação, alterações de propriocepção) e sinais de estresse (perda de apetite, agressividade). A partir do D+8, os animais foram avaliados a cada 48h até o término do período experimental.

Tomografia computadorizada tridimensional

A análise tomográfica foi realizada no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP - Botucatu.

Os exames foram realizados com os coelhos em decúbito ventral, com a coluna cervical e o crânio estendidos de forma que o palato duro estivesse paralelo à mesa (Figura 02). As imagens foram obtidas em tomógrafo *single-slice CT scanner*, modelo SCT-7800CT (Shimadzu, Kyoto, Japão), no corte transversal e posteriormente reconstruídas com software de pós-processamento Voxar[®] (Barco, Kortrijk, Bélgica) em cortes longitudinais/sagitais e coronais/dorsais. As imagens foram avaliadas com ferramentas do sistema PACS SINAPSE[®] (Fujifilm, Tokyo, Japão), quanto ao preenchimento da falha óssea e à aparência tomográfica dos enxertos^{5,6}.

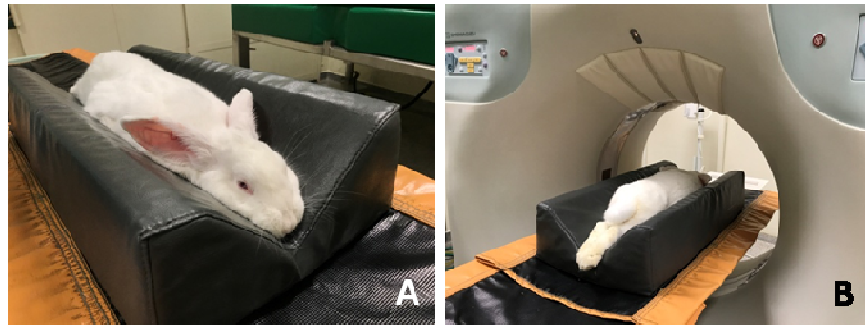


Figura 02 (A e B) – coelho em posição de decúbito ventral, para realização do exame tomográfico.

As medidas foram realizadas nos cortes coronais, devido à possibilidade de observação de todo o defeito em uma única imagem, utilizando os demais planos como referência para determinação da maior área do defeito, utilizada nas mensurações.

Foram avaliados a área (mm^2) e o perímetro (mm) do defeito, a área de cobertura do enxerto (mm^2) e a densidade do tecido expressa como o valor médio de unidades Hounsfield no foco (UH). A área de cobertura do enxerto se apresentou acentadamente irregular, portanto para quantificação da área total de cobertura, foram excluídas as regiões de menor densidade, selecionadas através da ferramenta de desenho livre, que possibilita seleção de contorno livre dos bordos da área desejada e cálculo de área, perímetro e média de atenuação da seleção (Figura 03).

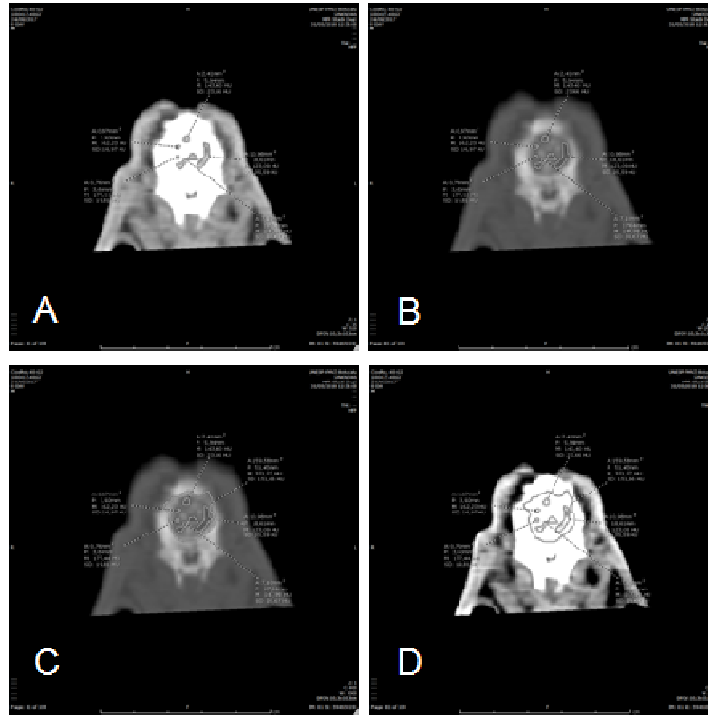


Figura 03 (A, B, C e D) – Quantificação da área de cobertura do enxerto utilizando tomografia computadorizada.

Na avaliação do exame tomográfico, as janelas são ferramentas de pós-processamento utilizadas para evidenciar os tecidos alvos no diagnóstico desejado, através da escolha de uma faixa de densidade para ser focada na imagem. Tecidos ósseos ou que contém muito ar possuem densidades extremas e são analisadas em janelas amplas, portanto, apresentam menos detalhes de diferenças de atenuação entre as estruturas presentes.

Por isso neste trabalho utilizou-se a janela de tecidos moles (menor variação) para que as porções do enxerto que apresentassem atenuação próxima, porém menor que o tecido ósseo (próximo de 1000UH), fossem visualizadas e fossem somadas à área total de cobertura do enxerto.

A densidade do tecido é quantificada pelo valor de UH sendo que quanto maior o valor, maior a densidade do tecido. O tecido ósseo possui densidade maior ou igual a 1000UH.

2.5.3. Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC), do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), UNESP - Botucatu.

Após a eutanásia, os ossos foram coletados e fixados em formalina tamponada a 04%, por 48h e em seguida descalcificados em EDTA 10% diluído em PBS por 30 dias. Após descalcificação, a área da lesão foi separada do restante do osso, mantendo-se apenas a área receptora do implante e uma pequena região de osso intacto. As amostras foram lavadas em água corrente *overnight*, desidratadas em série crescente de álcool etílico, diafanizadas em xilol e, finalmente, incluídas em Paraplast® (Sigma Co., Saint Louis, MO). Os cortes foram confeccionados de maneira que as análises sempre fossem realizadas nas regiões de maior área de lesão.

Os cortes histológicos, com 05µm de espessura, foram corados pela Hematoxilina e Eosina para visão geral da morfologia óssea. Em seguida, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional LeicaDM2500 (Leica Microsystems, Nussloch, Germany), acoplado à câmera digital e software de análise de imagem (Leica Qwin.V3).

Nas análises estereológicas foram determinadas, nos diferentes grupos experimentais, as porcentagens dos diferentes compartimentos teciduais compreendidos na área de lesão (vasos sanguíneos, tecido adiposo, tecido fibroso e área de formação óssea). Para estas análises, foi utilizada a metodologia proposta por Weibel com uma grade com 168 pontos de teste⁷. Foram analisadas, em média, 10 fotos de cada lâmina por animal, utilizando a objetiva de 20x. Os valores relativos foram determinados por contagem dos pontos coincidentes na grade e dividindo-os pelo número total de pontos (Figura 04). Para se determinar a quantidade de colágeno, as lâminas coradas com a técnica de picrossírius foram fotografadas no aumento de 20X. Foram capturadas, em média, 10 fotos de cada lâmina por animal. A área ocupada pelo colágeno foi detectada automaticamente pelo software LeicaQWin versão 3.0, e expressa em porcentagem.

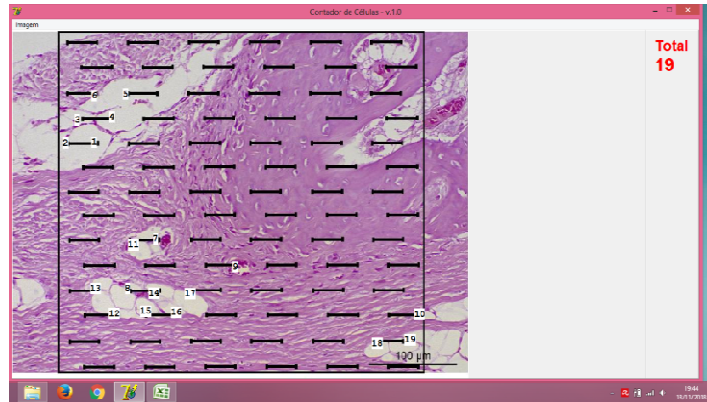


Figura 04 - Imagem de lâmina corada com HE, observada em aumento de 20x, com sobreposição da grade de Weibel, para contagem dos pontos.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism[®] (versão 5.00; GraphPadInc., San Diego, EUA). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste de KRUSKAL-WALLIS) seguida do teste de Dunns pareado (pós-teste). Os resultados foram expressos como mediana, percentis (25 e 75) e valores mínimo e máximo, e foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

REFERÊNCIAS

- ¹Lappalainen OP, Karhula S, Haapea M, Kyllonen L, Haimi S, Miettinen S, et al. Bone healing in rabbit calvarial critical-sized defects filled with stem cells and growth factors combined with granular or solid scaffolds. *ChildsNervSyst.* 2016 Apr;32(4):681-8.
- ²da Cunha MR, Menezes FA, dos Santos GB, Pinto CAL, Barraviera B, Martins VCA, et al. Hydroxyapatite and a new fibrin sealant derived from snake venom as scaffold to treatment of cranial defects in rats. *Mater Res.* 2015;18(1): 196-203.
- ³Gasparotto VPO, Landim-Alvarenga, Oliveira ALR, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera B, et al. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. *Stem Cell ResTher.* 2014;5(3):78.
- ⁴Barros LC, Soares AM, Costa FL, Rodrigues VM, Fuly AL, Giglio JR, et al. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalusdurissusterrificus* venom. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2011;17(1):23-33.
- ⁵Saunders J, Schwartz T. Principles of CT Image Interpretation. In: Schwartz T, Saunders J (ed.). *Veterinary Computed Tomography.* 1st ed. Hoboken, NJ: Willey-Blackwell, 2011. p. 29-34.
- ⁶Thrall DE. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology.* 7^aed. St Louis, MO:Elsevier, 2018.
- ⁷Weibel ER, KistlerGS, Scherl WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol.* 1966;30(1):23-38.