

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LUARA FERNANDA SIMÃO

**ANÁLISE DA REPARAÇÃO DE ENXERTO ÓSSEO
AUTÓGENO, TRATADO COM ÁCIDO CÍTRICO E
ESTABILIZADO COM O NOVO ADESIVO DE
FIBRINA, ASSOCIADO AO USO DE LASER DE
BAIXA POTÊNCIA**

BAURU
2016

LUARA FERNANDA SIMÃO

**ANÁLISE DA REPARAÇÃO DE ENXERTO ÓSSEO
AUTÓGENO, TRATADO COM ÁCIDO CÍTRICO E
ESTABILIZADO COM O NOVO ADESIVO DE
FIBRINA, ASSOCIADO AO USO DE LASER DE
BAIXA POTÊNCIA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de cirurgião dentista, sob orientação do Profº Drº Geraldo Marco Rosa Junior.

BAURU
2016

Simão, Luara Fernanda

S593a

Análise da reparação de enxerto ósseo autógeno, tratado com ácido cítrico estabilizado com o novo adesivo de fibrina, associado ao uso de laser de baixa potência / Luara Fernanda Simão. -- 2016.

30f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.


1. Enxerto ósseo. 2. Osseointegração. 3. Laserterapia. 4. Regeneração óssea. 5. Selante de fibrina. I. Rosa Junior, Geraldo Marco. II. Título.




ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Luara Fernanda Simão.

Ao dia nove de dezembro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Luara Fernanda Simão intitulado: "**Análise da reparação de enxerto ósseo autógeno, tratado com ácido cítrico e estabilizado com o novo adesivo de fibrina, associado ao uso de laser de baixa potência**". Compuseram a banca examinadora os professores Dr. Geraldo Marco Rosa Junior, Dr. Rogério Leone Buchaim e Dra. Pâmela Leticia dos Santos. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVAR, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.



Dr. Geraldo Marco Rosa Junior (Orientador)



Dr. Rogério Leone Buchaim (Avaliador 1)



Dra. Pâmela Leticia dos Santos (Avaliador 2)

Dedico este trabalho aos meus pais, por todo amor, apoio e confiança que recebi, por fazerem dos meus sonhos os deles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que permitiu com que tudo na minha vida acontecesse da melhor forma, desde a minha escolha por essa profissão, até todas as suas bênçãos derramadas ao longo dessa jornada.

Agradeço aos meus pais Wilson Simão e Rosimeire Teixeira, por sempre respeitarem minhas escolhas, me incentivando, sonhando comigo. Por serem meu exemplo de caráter, honestidade e garra, por serem minha base e pelo amor incondicional. À vocês todo meu esforço, admiração e todo amor dessa vida.

Aos demais familiares pelo apoio de hoje e sempre.

Aos meus professores e orientadores Prof. Rogério Leone Buchaim e Prof. Geraldo Marco Rosa Junior, pelos ensinamentos, paciência e por confiarem em mim a Iniciação Científica e a oportunidade de aprender com vocês. Por serem excelentes profissionais e acima de tudo pessoas admiráveis. Minha eterna gratidão, respeito e admiração por vocês.

Às minhas amigas de faculdade e agora da vida, Eduarda Zanini, Monise Longatto e Flávia Saraiva por me darem as melhores lembranças desses anos de graduação, que sorte a minha encontrar a amizade e o conforto todos os dias ao lado de vocês. Todo meu carinho e amor sempre.

À minha amiga, companheira e amada Débora Camargo, por esses anos dividindo o teto e a vida, por ser mãe, irmã, professora, conselheira, enfim, por ser minha família a cada hora dos meus dias em Bauru. À você meu amor e imensa gratidão.

Aos meus amigos João Henrique Izidoro e Cleuber Bueno, por toda ajuda nessa pesquisa, por horas de cirurgia, pelos cuidados com os animais e pelas risadas garantidas.

Agradeço à todos os professores do curso de odontologia da Universidade do Sagrado Coração, por transmitirem conhecimentos, compartilhar experiências e me guiarem durante esses anos.

RESUMO

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. 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. O adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente é um selante biológico e biodegradável, proveniente do plasma sanguíneo, que pode ser uma ferramenta útil clinicamente, por sua flexibilidade de aplicações e sua capacidade adesiva. Visto isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica, o processo de reparo de enxerto ósseo autógeno tratado com ácido cítrico e estabilizado em calvária de ratos com o novo adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e se a terapia por LASER de baixa potência interfere nesse processo. Foram utilizados utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (90 dias de idade), machos e separados aleatoriamente em dois grupos experimentais (EI e EII). No grupo EI realizou-se uma osteotomia circular no osso parietal direito, com broca trefina 5 mm. No lado esquerdo foi feita a descorticalização realizando-se 9 perfurações com broca esférica nº 6. O fragmento obtido do lado direito, recebeu tratamento com ácido cítrico a 50% em pH 1 durante 3 minutos, e foi colocado no lado esquerdo, com o novo adesivo de fibrina. No grupo EII foram realizados os mesmos procedimentos do grupo EI, associando a terapia por LASER de baixa frequência. Decorridos os períodos de 15, 30, 60 e 90 dias pós cirúrgico, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados. As peças foram submetidas a análise histológica e histomorfométrica. Observou-se no grupo EII um processo de regeneração com neoformação óssea mais evidente do que no EI. Nos períodos de 60 e 90 dias observou-se um novo tecido ósseo que estava unindo o enxerto ao leito receptor. Na análise histomorfométrica, comparando-se os dois grupos, dentro dos mesmos períodos, observou-se um melhor desempenho no EII no processo de formação de novo osso, apresentando diferenças estatísticas significantes em todos os períodos analisados. Concluiu-se que o adesivo promoveu integração do enxerto ósseo após tratamento ácido e que a terapia por LASER potencializou os resultados desse processo de integração.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Osseointegração. Laserterapia. Regeneração óssea. Adesivo de fibrina.

ABSTRACT

Grafts are a way of treating bone defects, which can result from the processes of a disease, a post-traumatic, postoperative, or congenital defect. Autogenous bone is still considered the gold standard for grafting because it becomes vascularized and osseointegrated with surrounding bone, thus minimizing the risk of fracture, infection or displacement. The fibrin adhesive derived from snake venom is a biological and biodegradable sealant, derived from blood plasma, which may be a clinically useful tool, because of its flexibility of applications and its adhesive capacity. Thus, the objective of this study was to evaluate, through histomorphometric and histomorphometric analysis, the autogenous bone graft repair process treated with citric acid and stabilized in calvaria of rats with the new fibrin adhesive derived from the venom of snake. Low-power LASER therapy interferes with this process. Thirty male rats (*Rattus norvegicus*) of the Wistar line (90 days old) were randomly assigned to two experimental groups (EI and EII). In the EI group, a circular osteotomy was performed on the right parietal bone, with a 5 mm trephine drill. On the left side, the descorticalization was performed by performing 9 perforations with spherical drill nº 6. The fragment obtained on the right side was treated with 50% citric acid at pH 1 for 3 minutes and placed on the left side with the new Fibrin adhesive. In the EII group, the same procedures of the EI group were performed, associating the low frequency LASER therapy. After the periods of 15, 30, 60 and 90 days postoperatively, five animals from each group, per period, were euthanized. The pieces were submitted to histological and histomorphometric analysis. In the EII group a regeneration process with more evident bone neoformation was observed than in the EI. During 60 and 90 days a new bone tissue was observed that was joining the graft to the receptor bed. In the histomorphometric analysis, comparing the two groups, within the same periods, a better performance was observed in the IBD in the process of formation of new bone, presenting statistically significant differences in all periods analyzed. It was concluded that the adhesive promoted integration of the bone graft after acid treatment and that LASER therapy enhanced the results of this integration process

Keywords: Bone graft. Osseointegration. Laser therapy. Bone regeneration. Fibrin adhesive.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Parietais expostos	13
Figura 2 – Perfurações	13
Figura 3 – Enxerto posicionado	14
Figura 4 – Laserpulse e caneta (Ibramed).....	15
Figura 5 – Aspecto microscópico do local em que se realizou o enxerto ósseo autógeno estabilizado com selante de fibrina (sem laserterapia) nos animais do Grupo Experimental I (GEI).....	17
Figura 6 – Aspecto microscópico do local em que se realizou o enxerto ósseo autógeno estabilizado com selante de fibrina (com laserterapia) nos animais do Grupo Experimental II.....	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
3 METODOLOGIA	12
3.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	12
3.2 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	15
3.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	16
4 RESULTADOS	17
4.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	17
4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	18
5 DISCUSSÃO	20
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7 REFERÊNCIAS	26
ANEXOS – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	30

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. Além disso, enxertos pequenos e mais frágeis muitas vezes são inadequados para suportar a inserção de um parafuso para sua fixação. (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; BARBIZAN et al., 2013).

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 é a utilização de desmineralização óssea superficial do enxerto com ácido cítrico, que aumenta significativamente a neoformação óssea nessa interface e estimula a proliferação de osteoblastos em cultura (DE REZENDE et al., 2014; DE REZENDE et al., 2015 DE REZENDE et al., 2015). Outra forma 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. (FUKUHARA et al., 2006; ROCHA et al., 2007; GONÇALVES et al., 2007).

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise histológica e histomorfométrica, o processo de reparo de enxerto ósseo autógeno tratado com ácido cítrico e estabilizado em calvária de ratos com o novo adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e se a terapia a LASER de baixa potência interferiu nesse processo.

3 METODOLOGIA

A pesquisa foi composta por 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (90 dias de idade), machos, provenientes do Biotério-USC Universidade do Sagrado Coração - Bauru – SP. (CEUA nº 4474300315). (Anexo A)

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

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

2. Grupo Experimental II - EII: Constituído de vinte animais, nos quais foi feita 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, após tratamento ácido, foi colado com o novo 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.

3.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram previamente pesados e submetidos à anestesia geral com injeção de pentobarbital sódico intraperitoneal (30mg/kg). A tricotomia na parte superior da cabeça foi realizada 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, os tecidos foram afastados até o periósteo, para visualização dos ossos parietais.



Figura 1 - Parietais expostos

No Grupo EI, foi realizada uma osteotomia circular no osso parietal direito, com broca trefina 5 mm (Neodent®), em baixa rotação, com irrigação de Cloreto de Sódio a 0,9%, obtendo-se 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

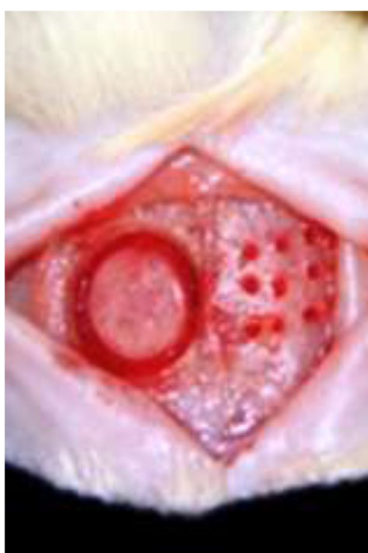


Figura 2 – Perfurações

Os fragmentos de osso, coletados do lado direito e o leito receptor, receberam desmineralização com ácido cítrico a 50% em pH 1 durante 3 minutos antes da fixação com adesivo de fibrina.

O adesivo de fibrina, que foi fornecido pelo CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, UNESP/BOTUCATU-SP), utilizado neste estudo, é composto por três soluções separadas e homogêneas 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). Ao final da aplicação dos três componentes, o enxerto ósseo onlay foi colocado em posição e foi aguardado um tempo de 10 segundos para secagem, para posterior realização da sutura por planos.



Figura 3 – Enxerto posicionado

Os animais do Grupo 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 J/cm², 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 foi aplicado 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 4 – LASERpulse e Caneta (Ibramed)

Para finalizar o procedimento cirúrgico, os tecidos foram reposicionados individualmente por sutura.

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam analgésico paracetamol na dose de 200 mg/Kg, dissolvido na água disponível no bebedouro. O uso do analgésico foi durante 3 dias.

3.2 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Decorridos os períodos de 15, 30, 60 e 90 dias pós-cirúrgico, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados. Após a realização de paramentação, a eutanásia foi realizada em ambiente silencioso e longe dos outros animais. Foi utilizado o Barbitúrico (Tiopental), dosagem ratos (150mg/kg) da seguinte forma: Tiopental Sódico 2,5%, por via intraperitoneal - IP, aplicado no quadrante abdominal inferior esquerdo do animal (associado com anestésico local, cloridrato de lidocaína na dosagem de 10 mg/kg). Após a confirmação da morte do animal, esse foi acondicionado em saco branco de resíduo biológico e enviado para descarte. Antes do descarte, a calvária foi removida e fixada em formol a 10% tamponado, por um período de 48 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 24

horas e colocadas em EDTA a 10%, trocado a cada 7 dias, para o processo de desmineralização. Realizados os passos anteriores, foram submetidas a procedimentos histológicos padronizados, com desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em Histosec - Merck®.

3.3 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

As secções histológicas foram realizadas a 5 µm levando em consideração a região central do defeito (de maior diâmetro) e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Foram padronizados 20 cortes por enxerto (04 a 05 cortes por lâmina). 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 foram mensurados quanto à espessura óssea total da área cirúrgica (leito receptor + enxerto autógeno) em 11 diferentes pontos ao longo do corte.

As medidas foram realizadas em imagens capturadas em um microscópio óptico com câmera fotográfica acoplada. As espessuras verticais do leito receptor mais enxerto ósseo foram determinadas no sistema de análise Image-Pro Plus® 6.0, 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 à 0,5mm de intervalo e a média da espessura vertical calculada.

A análise quantitativa foi realizada utilizando-se o programa ImagePro-Plus® 6.0. Para a análise estatística, a espessura total e interface, no mesmo grupo, nos diferentes períodos, foram utilizadas 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 teste t não pareado, com nível de significância $p < 0,05$. O programa a ser utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Nos animais do GEI evidenciou-se a presença de um tecido conjuntivo fibroso bem organizado nos períodos iniciais do processo de reparo (15 e 30 dias) e que foi gradativamente sendo substituído por uma matriz osteóide nos períodos finais analisados (60 e 90 dias), com áreas de reabsorção e neoformação óssea na interface leito receptor com enxerto autógeno. Em todos os períodos analisados não se encontrou evidência de reação inflamatória. Notou-se pouco tecido conjuntivo e quantidade considerável de tecido ósseo neoformado próximo às áreas de embricamento e também no restante da interface, principalmente aos 60 dias, unindo o enxerto ao leito receptor em grande área da interface, ocorrendo uma integração óssea no período final de 90 dias.

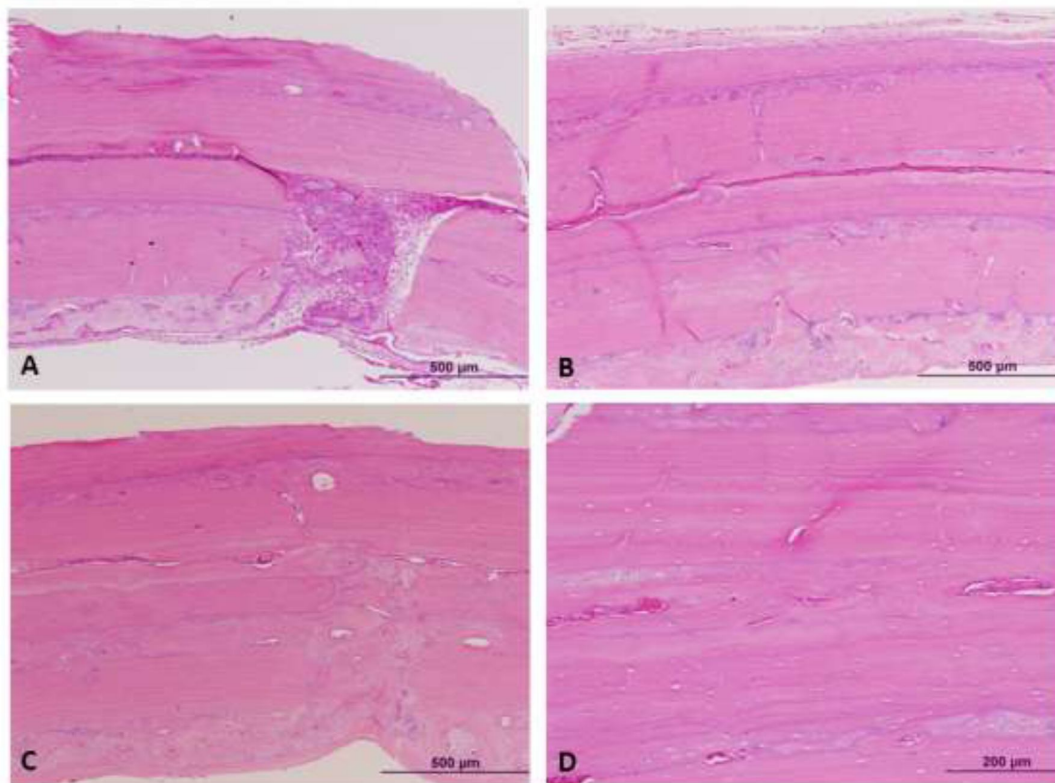


Figura 5 - Aspecto microscópico do local em que se realizou o enxerto ósseo autógeno estabilizado com selante de fibrina (sem LASERterapia) nos animais do Grupo Experimental I (GEI): A - 15 dias; B - 30 dias; C - 60 dias; D - 90 dias.

Nos animais do GEII observou-se um processo de regeneração com neoformação óssea mais evidente do que no GEI. No período de 60 e 90 dias observou-se um novo tecido ósseo que estava unindo o enxerto ao leito receptor. Em todos os períodos analisados não se encontrou evidência de reação inflamatória.

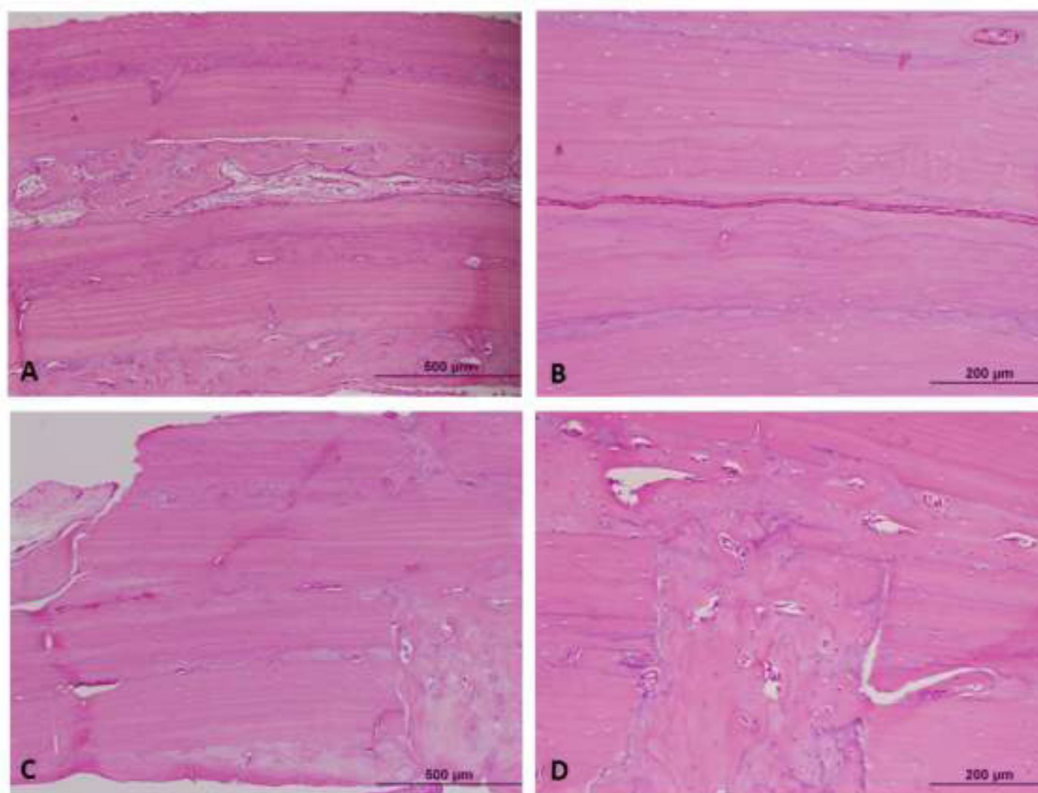


Figura 6 - Aspecto microscópico do local em que se realizou o enxerto ósseo autólogo estabilizado com selante de fibrina (com LASERterapia) nos animais do Grupo Experimental II (GEII): A - 15 dias; B - 30 dias; C - 60 dias; D - 90 dias.

4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Dentro do mesmo grupo, nos períodos analisados, na mensuração da interface, não ocorreu diferença significativa entre os períodos de 15 e 30 dias, mas observou-se diferença significativa desses quando comparados aos períodos de 60 dias e 90 dias (Tabela 1).

O período de 90 dias não se encontra representado na tabela 1, pois o valor foi zero para os dois grupos analisados.

Tabela 1 - Análise comparativa da espessura da interface entre os Grupos EI e EII nos períodos analisados. Média \pm Desvio Padrão.

Grupos	15 dias	30 dias	60 dias
EI	0.073 \pm 0.021	0.043 \pm 0.017	0.012 \pm 0.005
EII	0.032 \pm 0.012	0.019 \pm 0.009	0.000

Na análise comparativa entre os dois grupos (EI x EII), dentro dos mesmos períodos, observou-se um melhor desempenho no GEII no processo de formação de novo osso, apresentando diferenças estatísticas significantes em todos os períodos analisados.

5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar se o adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente promove fixação de enxerto ósseo em calvária de ratos, tratado com ácido cítrico e observar se a terapia a LASER de baixa potência interfere nesse processo. Após a realização das análises, concluiu-se que o selante heterólogo de fibrina promoveu integração óssea do tipo onlay estabilizado em calvária após tratamento ácido e que a terapia por LASER de baixa potência potencializou os resultados desse processo de integração.

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

A utilização desses adesivos sintéticos como 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; PAPTHEOFANIS; 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 o 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 a 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 coágulo 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; SCHEELLE, 1979 ; SCHEELLE; 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 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.

Na busca pelo aperfeiçoamento da regeneração óssea, várias pesquisas vêm demonstrando potencial aumentado para a consolidação de enxertos ósseos mediante desmineralização do material enxertado e/ou das superfícies de consolidação. Isso deve-se ao fato de que a desmineralização óssea propicia um substrato sobre o qual as células pré-osteoblásticas adquirem morfologia compatível com estágio de diferenciação mais avançado, promovendo maior cobertura de área, o que aumenta o potencial para deposição de novo osso sobre essas superfícies em comparação ao tecido não condicionado. (COESTA, 2012)

A fim de otimizar esse processo de cicatrização, vários estudos têm demonstrado que a terapia com LASER de baixa potência promove 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 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 da 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), oque 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, IATECOLA 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 (E I e E II), estimulou significantemente e 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 autógeno 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 de enxerto, assim como tratamentos químicos no bloco retirado, pode ser um novo direcionamento para complementação deste estudo realizado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluiu-se que o novo selante heterólogo de fibrina promoveu integração óssea em enxerto do tipo onlay estabilizado em calvária de ratos após tratamento ácido e que a terapia por LASER de baixa potência potencializou os resultados desse processo de integração.

7 REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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.

De Rezende ML, Domingues RS, Salmeron S. Efeito da desmineralização ácida na consolidação de enxerto ósseo autógeno em bloco. *Innovations Implant Journal processes* 2014; 9: 48-52.

de Rezende ML, Coesta PT, de Oliveira RC, Salmeron S, Sant'Ana AC, Damante CA, Greggi SL, Consolaro A. Bone demineralization with citric acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. *J Periodontol.* 2015 Jan;86(1):146-54.

Rezende ML, Consolaro A, Sant'Ana AC, Damante CA, Greggi SL, Passanezi E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. *J Periodontol.* 2014 May;85(5):e121-9.

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.

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.

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.

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*. 2007 Jun;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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Coesta, PTG. Efeito da desmineralização óssea superficial na migração, adesão e diferenciação de pré-osteoblastos. 2012. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru. 2012.

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

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.

Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Jun;15(3):325–32.

Kawasaki, K. & Shimizu, N., 2000, Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 26, pp. 282-291.

Kreisner PE, Blaya DS, Gaião L, Maciel-Santos ME, Etges A, Santana-Filho M, et al. Histological evaluation of the effect of low-level laser on distraction

osteogenesis in rabbit mandibles. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Jul;15(4):e616–8.

Weber JB, Pinheiro AL, de Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg*. 2006;24:38-44.

ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DO
**SAGRADO
CORACÃO**
A Universidade da sua vida

PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "ANÁLISE DA REPARAÇÃO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO, TRATADO COM ÁCIDO CÍTRICO E ESTABILIZADO COM O NOVO ADESIVO DE FIBRINA, ASSOCIADO AO USO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA.", protocolado sob o CEUA nº 1118060116, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior e equipe: Geraldo Marco Rosa Junior; Rogerio Leone Buchaim** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 01/03/2016.

We certify that the proposal "ANALYSIS OF RECOVERY OF BONE GRAFT AUTOGENOUS, TREATED WITH CITRIC ACID AND STABILIZED WITH NEW LABEL FIBRIN, ASSOCIATED WITH LOW POWER LASER USE.", utilizing 40 Heterogenics rats (40 males), protocol number CEUA 1118060116, under the responsibility of **Prof. Dr. Geraldo Marco Rosa Junior and team; Geraldo Marco Rosa Junior; Rogerio Leone Buchaim** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 03/01/2016.

Vigência da Proposta: de 03/2016 a 12/2016

Área: Centro De Ciências Da Saúde

Procedência: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

Gênero: Machos

idade: 90

N: 40

Linhagem: wistar

Peso: 250g

Nota: 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. 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. Baseado no exposto, o objetivo deste estudo será avaliar, por meio de análise histológica e histomorfométrica, o processo de reparo de enxerto ósseo autógeno tratado com ácido cítrico e estabilizado em calvaria de ratos com o novo adesivo de fibrina derivado do veneno de serpente, e se a terapia a laser de baixa potência interfere nesse processo. A pesquisa será composta por 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (90 dias de idade), machos, provenientes do Biotério Central da Universidade do Sagrado Coração ? USC, Bauru/SP. Os animais serão separados aleatoriamente em dois grupos experimentais, assim constituídos: Grupo Experimental I - EI: Constituído de vinte animais, nos quais será feita uma osteotomia circular no osso parietal direito. No osso parietal esquerdo será feita a descorticalização com broca esférica nº 6. O fragmento obtido do lado direito, após tratamento ácido, será colado no lado esquerdo, com o novo adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente. Grupo Experimental II - EII: Constituído de vinte animais, nos quais será feita uma osteotomia circular no osso parietal direito e no osso parietal esquerdo efetuar-se a descorticalização com broca esférica nº 6. O fragmento obtido do lado direito, após tratamento ácido, será colado com o novo adesivo de fibrina, derivado de veneno de serpente, no lado esquerdo e submetido a aplicação de laser com comprimento de onda de 830 nm ? GaAIAs (gallium-aluminum-arsenide) de pulso contínuo.

Bauru, 01 de março de 2016

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração