

A NEW FIBRIN SEALANT COMBINED WITH HYDROXYAPATITE AS A SUPPORT FOR THE TREATMENT OF CRANIAL DEFECTS IN RATS

M. R. Cunha*, F. A. Menezes**, R. S. F. Junior***, B. Barraviera***, G. R. Santos*, M. S. Pettian*, V. C. A. Martins****, A. M. G. Plepis ****

*Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ), Jundiaí, Brasil

** Centro Universitário Padre Anchieta (UniAnchieta), Jundiaí, Brasil

*** Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP), Botucatu, Brasil

**** Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, Brasil

e-mail: cunhamr@hotmail.com

Resumo: Os biomateriais constituem uma alternativa promissora no processo de enxertia óssea, incluindo as biocerâmicas pela composição semelhante ao tecido ósseo e os selantes de fibrina devido as suas propriedades hemostáticas e cicatrizantes. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o processo da neoformação óssea durante o reparo de defeitos cranianos enxertados com hidroxiapatita e selante de fibrina derivado do veneno de cobra. Utilizou-se 20 ratos para criação cirúrgica de uma falha na calota craniana e foram divididos nos grupos: G1 (sem enxerto); G2 (com hidroxiapatita); G3 (com selante de fibrina) e G4 (hidroxiapatita e selante). Após 6 semanas da cirurgia, ocorreu o sacrifício e as amostras da área cirúrgicas foram submetidas às análises macroscópica, radiológica histomorfométrica. A neoformação óssea foi quantificada baseando no princípio de Delesse e os resultados foram comparados usando testes Anova e Tukey ($p < 0.05$). Nos resultados, o osso formado apresentava maduro e envolvia várias partículas de hidroxiapatita. O percentual do volume relativo do osso neoformado na área cirúrgica em G1 a G4 foram 10.66 ± 0.57 , 20.66 ± 1.15 ; 29.66 ± 1.52 , 53.66 ± 0.57 , respectivamente, sendo maior no G4. Concluiu que o selante de fibrina em combinação com hidroxiapatita acelera o reparo ósseo.

Palavras-chave: Biocerâmica, Selante de fibrina, Reparo ósseo

Abstract: Biomaterials are used as a promising alternative to bone grafts, including bioceramics whose composition resembles that of bone and fibrin sealants due to their hemostatic and healing properties. The objective of this study was to evaluate bone neoformation during the repair of cranial defects grafted with hydroxyapatite and fibrin sealant derived from snake venom. A skull defect was created surgically in 20 rats and the animals were divided into four groups: G1 (no graft); G2 (with hydroxyapatite); G3 (with fibrin sealant), and G4 (hydroxyapatite and sealant). The animals were sacrificed 6 weeks after surgery and would area specimens were submitted to macroscopic, radiologic and histomorphometric

analysis. The newly formed bone was quantified based on the principle of Delesse and the results were compared by ANOVA and the Tukey test ($p < 0.05$). In results, the new bone was mature and surrounded several hydroxyapatite particles. The relative volume (%) of new bone in the wound area in G1, G2, G3 e G4 was 10.66 ± 0.57 , 20.66 ± 1.15 , 29.66 ± 1.52 and 53.66 ± 0.57 , respectively, and was significantly higher in G4. In conclusion, the fibrin sealant in combination with hydroxyapatite accelerates bone repair.

Keywords: Bioceramic, Fibrin sealant, Bone repair

Introdução

A utilização dos enxertos ósseos autólogos vem sendo a opção mais comum para o tratamento da reconstrução do esqueleto craniomaxilofacial e nas diversas lesões ósseas decorrentes de traumas de alta energia ou deformidades ósseas. A sua grande aceitação clínica está na sua osteoindutividade por meio do fornecimento de células que possam imediatamente iniciar o processo da regeneração óssea [1]. Porém, algumas dificuldades e os riscos traumáticos envolvidos na cirurgia odontológica e ortopédica de sua obtenção têm estimulado o aperfeiçoamento de novos materiais sintéticos como alternativa para enxertia [2].

O biomaterial aceitável deve ser degradável, absorvível e atuar como arcabouço (scaffold) para o crescimento do tecido ósseo regenerado com nenhuma complicação associada ao seu uso. Assim, dentre do grupo de biomateriais que mais se assemelham à composição química do osso, está à cerâmica de fosfato de cálcio [3].

A hidroxiapatita é uma biocerâmica com características importantes para o processo de reparo ósseo devido a semelhança com a apatita mineral que compõe o osso humano, além de ser atóxica e apresentar uma microestrutura controlável quanto ao tamanho dos poros [4]. Devido às propriedades osteogênicas, a hidroxiapatita vem sendo amplamente usada nas cirurgias de reconstrução óssea [5]. Outro material utilizado principalmente nas terapias regenerativas de tecidos moles são os selantes de fibrina por atuarem

como arcabouço para adesão e crescimento celular, além de apresentarem propriedades hemostáticas e outras vantagens como indutor de cicatrização, selamento de cavidades e carreador de liberação de drogas [6].

O selante de fibrina comercializado é preparado pela combinação de um concentrado de fibrinogênio humano e trombina bovina reconstituída em solução de cloreto de cálcio. O fibrinogênio é convertido em fibrina, originando um coágulo estável e reforçado pela ativação do fator XIII, que também participa da síntese de colágeno, estimulando a proliferação de fibroblastos e contribuindo para a cicatrização dos tecidos e como excelente agente hemostático. Entretanto, o seu uso está limitado devido à possibilidade de transmissão viral como o Parvovírus, Hepatite e AIDS além dos pacientes poderem desenvolver anticorpos contra a trombina bovina. Para contornar estas dificuldades, o selante desenvolvido através da utilização de uma trombina-like extraída do veneno de serpentes e fibrinogênio de grandes animais, em substituição aos componentes humanos, vem mostrando excelentes resultados em pesquisas experimentais de regeneração de diferentes tecidos. Este novo selante é um produto biodegradável que não produz reações adversas, não contém constituintes de sangue humano, tem boa capacidade adesiva e não transmite doenças infecciosas. Por essas favoráveis propriedades, este novo selante deve ser clinicamente mais explorado nas diversas terapias regenerativas [7,8]. Desta maneira, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a potencialidade osteogênica da combinação da hidroxiapatita combinada a este novo selante de fibrina no processo de acelerar a regeneração óssea.

Materiais e métodos

Biomateriais:

A hidroxiapatita utilizada foi sintetizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP/SP) e o selante de fibrina no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP/SP). Os biomateriais foram cedidos ao experimento na Faculdade de Medicina de Jundiaí (FMJ/SP) devido às parcerias entre as Instituições.

Animais e planejamento experimental

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos, com 12 semanas de idade e com peso de 330 gramas, mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí/SP, Brasil.

Os animais foram anestesiados com a solução de Xylazina (Virbac Brasil Ind. e Com., São Paulo, Brazil) e Ketamina (Sespo Ind. e Com., Jacaré, São Paulo, Brazil) na proporção de proporção de 1:1 e na dose de 1mg/Kg de massa corpórea, via intramuscular. Os animais foram colocados em decúbito ventral e realizada a tricotomia da calota craniana. Em seguida, foi feita uma incisão na pele para expor os ossos parietais. O perióstio foi descolado através de material cirúrgico apropriado e com auxílio de uma broca

cirúrgica acoplada a um mini-motor (BELTEC LB-100, Araraquara, São Paulo, Brasil) foi feito um defeito de 5mm na calota craniana. Após cirurgia, o perióstio e a pele foram reposicionados e suturados.

Os animais foram divididos em 4 grupos (G) com 5 animais cada e distribuídos da seguinte maneira: Grupo 1 (G1): Animais com falha craniana e sem preenchimento; Grupo 2 (G2): Animais com falha craniana preenchida com 8 mg de partículas de hidroxiapatita; Grupo 3 (G3): Animais com a falha preenchida com 8 µl de selante de fibrina; Grupo 4 (G4): Animais com a falha preenchida com 8 mg hidroxiapatita e 8 µl de selante de fibrina.

No período de seis semanas pós-cirúrgico, realizou a eutanásia dos animais e as calotas cranianas foram removidas, fotodocumentadas e radiografadas para avaliar as condições macroscópicas da lesão óssea. Em seguida, foram realizados cortes histológicos da área cirúrgica para a coloração com hematoxilina e eosina tendo o objetivo de analisar a morfologia e quantificação do osso neoformado no local do defeito craniano. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro Universitário Padre Anchieta, Jundiaí-SP, Brasil, protocolo 01/2012.

A quantificação do osso formado na área cirúrgica baseou no princípio de Delesse usando a fórmula $V_v = P_p/P_t$ (%), onde V_v é a densidade do volume ósseo, P_p é número de pontos sobre o osso formado e P_t é o número total de pontos do sistema (Lacerda, 1999). Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos Anova e Tukey usando software Bioestat 5.0 com nível de significância $p < 0.05$.

Resultados

Nas análises macroscópicas e radiológicas de todos os grupos estudados, notou boa definição e condição morfológica normal da área cirúrgica e sem indícios de reações patológicas ou rarefação óssea características de rejeição imunológica aos biomateriais.

Nos resultados histológicos, verificou osso neoformado maturo projetando-se das margens da lesão óssea. Em G2, o osso jovem envolvia algumas partículas de hidroxiapatita localizadas próximas à superfície. No G4, ocorreu uma intensificação da neoformação óssea circundando totalmente várias partículas da hidroxiapatita e sem interposição de tecido conectivo (figura 1).

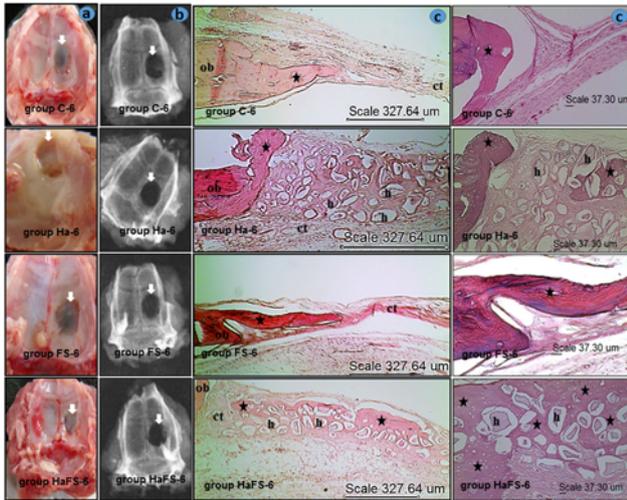


Figura 1. Imagens macroscópicas (a), radiológicas (b) e histológica (c) da área cirúrgica dos grupos estudados. Observe ausência de sinais inflamatórios, permanência do defeito e a neoformação óssea (★) sendo mais pronunciada em G4 visto o envolvimento da maioria das partículas de hidroxiapatita pelo osso jovem. Indicados: osso original (ob), partículas de hidroxiapatita (h), tecido conjuntivo (ct).

O percentual (%) com desvio padrão (\pm) do volume relativo de osso neoformado na área do defeito craniano nos grupos G1 a G4 foram 10.66 ± 0.57 , 20.66 ± 1.15 ; 29.66 ± 1.52 e 53.66 ± 0.57 , respectivamente. Neste caso, houve diferença significativa entre todos os grupos, sendo maior em G4.

Discussão

Neste estudo foi possível verificar a biocompatibilidade do novo selante de fibrina com o tecido ósseo visto a ausência macroscópica, radiológica e histológica de processos inflamatórios que caracterizam rejeição imunológica a este biomaterial. Além disso, notou-se favorável crescimento de osso na área cirúrgica principalmente nos grupos que receberam o novo selante de fibrina. Este resultado está relacionado à sua configuração espacial em forma de malha de rede de fibrilas interpostas, funcionando como suporte para o crescimento celular além de sua afinidade celular conforme demonstrado em pesquisas associando este novo selante com cultura de células tronco mesenquimais [9].

Já foi demonstrada na literatura que o selante de fibrina convencional (Tissucol) não apresenta adequada função osteogênica quando aplicado em defeito ósseo criado em rato [10], ao contrário do observado nessa pesquisa onde se presenciou o crescimento significativo de osso jovem na área da lesão óssea dos grupos G3 e G4 que foi enxertada com o novo selante de fibrina derivado do veneno de cobra. Assim sendo, este novo selante derivado do veneno de cobra apresentou biofuncionalidade, pois não houve reações adversas com o sistema biológico e favoreceu a

cicatrização óssea. Em adição, a osteogênese no local da falha óssea foi mais intensificada no grupo G4 que recebeu este novo selante associado com a biocerâmica. O crescimento ósseo foi a partir da margem do osso original e também adjacente e circundando a maioria das partículas da hidroxiapatita, reduzindo significativamente a quantidade de tecido conectivo devido a maior ocupação do volume de osso neoformado na área da lesão óssea. Esta resposta biológica é essencial para a regeneração óssea bem como para o processo gradativo da reabsorção da biocerâmica concomitante com a neoformação óssea [11]. Nesta pesquisa, observou-se a permanência das partículas de hidroxiapatita implantada durante o período experimental sendo importante para o estímulo osteogênico do reparo ósseo.

Nas primeiras semanas do reparo de defeito ósseo enxertado com biomateriais porosos ocorre uma resposta inflamatória e formação de coágulo que posteriormente torna-se organizado e contendo fibrina e plaquetas. Em seguida, há a proliferação de células osteoprogenitoras promovendo a formação de osso trabeculado após 4 semanas da implantação do biomaterial, completando assim o primeiro estágio do crescimento ósseo. O segundo estágio é caracterizado pelo remodelamento do osso jovem sendo influenciado pelas características do biomaterial [12,13]. Nesta pesquisa, verificou osso jovem de morfologia cortical e em contato direto com a hidroxiapatita, sem interposição de tecido conectivo, caracterizando a osteointegração. A maior concentração de neoformação óssea ocorreu em G4, demonstrando assim o potencial osteogênico da combinação dos biomateriais.

Conclusão

O novo selante de fibrina derivado da serinoprotease do veneno de serpente apresentou biofuncionalidade com o tecido ósseo e osteocondutividade durante o reparo ósseo. Ao ser combinado com a hidroxiapatita, proporcionou maior estímulo osteogênico. Desta maneira, a combinação desses biomateriais específicos constitui uma interessante opção a ser mais explorada nas terapias reconstrutivas do esqueleto.

Agradecimentos

FAPESP (proc. 2012/02689-3), CEVAP/UNESP, NAPED/FMJ, UniAnchieta (Jundiaí/SP), IQSC/USP, CEUNSP (Itu/SP)

Referências

- [1] Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res.* 2011; 90(12):1428-33.

- [2] Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br.* 2001; 83(1):3-8.
- [3] Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury.* 2011; 42(6):569-73
- [4] Legeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin.Orthop.Relat. Res.* 2002; 395:81-98.
- [5] Burton DC, Carlson BB, Johnson PL, Manna BJ, Riazi-Kermani M, Glattes RC, Jackson RS. Backfilling of iliac crest defects with hydroxyapatite-calcium triphosphate biphasic compound: a prospective, randomized computed tomography and patient-based analysis. *Spine J.* 2013; 13(1):54-61.
- [6] Alving BM, Weinstein MJ, Finlayson JS, Menitone JE, Fratantoni JC. Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses. *Transfusion.* 1995; 35:783-90.
- [7] Thomazini-Santos IA. Fibrin adhesive from snake venom: the effect of adding epsilon-aminocaproic acid, tranexamic acid and apronitinin for coaptation of wound in rat skin incisions. *J Venoms Anim Toxins.* 2001; 7:148-59
- [8] Barros LC, Ferreira Jr. RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, et al. A New fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: Applications in Medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 2009; 12(8):553-71.
- [9] Gasparotto VPO, et al. Viability of fibrin sealant from snake venom as scaffold to rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Toxicon.* 2012, 60:95-8.
- [10] Okamoto T, Alves-Rezende MC, Okamoto AC, Buscariolo IA, Garcia IR Jr. Osseous regeneration in the presence of fibrin adhesive material (Tissucol) and epsilon-aminocaproic acid (EACA). *Braz Dent J.* 1995; 6(2):77-83.
- [11] Junior BK. *Implantologia e Osteointegração.* 1ª edição. Editora Roca; 2010.
- [12] Spector M, Harmon SL, Kreutner A. Characteristics of tissue growth into Proplast and porous polyethylene implants in bone. *J Biomed Mater Res.* 1979; 13(5):677-92.
- [13] Weinans H, Huiskes R, van Rietbergen B, Sumner DR, Turner TM, Galante JO. Adaptive bone remodeling around bonded noncemented total hip arthroplasty: a comparison between animal experiments and computer simulation. *J Orthop Res.* 1993; 11(4):500-13.