

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

RIAN SOUZA VIEIRA

**Avaliação de falhas ósseas críticas na calvária de ratos tratados com  
diferentes enxertos ósseos autólogos**

Ribeirão Preto

2021

RIAN SOUZA VIEIRA

**Avaliação de falhas ósseas críticas na calvária de ratos tratados com  
diferentes enxertos ósseos autólogos**

Versão original

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino.

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Vieira, Rian Souza

Avaliação de falhas ósseas críticas na calvária de ratos tratados com diferentes enxertos ósseos autólogos. Ribeirão Preto, 2021.

50 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor. Área de concentração: Medicina.

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido

1.Osso. 2.Enxerto ósseo. 3.Regeneração óssea. 4.Modelos Animais. 5. Ratos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rian Souza Vieira

Título: Avaliação de falhas ósseas críticas na calvária de ratos tratados com diferentes enxertos ósseos autólogos

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Ciências da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

## **Dedicatórias**

**Aos meus pais João e Maria** pelo amor e exemplos.

**À minha esposa Rhyane**, luz da minha vida.

**Aos meus filhos Luiza e Pedro**, meus motivos.

Dedico este trabalho.

## **Agradecimentos**

Ao **Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino** pela confiança depositada, oportunidades e ensinamentos técnicos e pessoais, minha eterna gratidão.

À **Dra. Ariane Zamarioli** por toda a ajuda a paciência.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Shimano** pela expertise e simpatia.

Ao amigo **Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi**, um gênio que dissemina saber.

Ao amigo **Renan Ernesto Reis Borges**, sem sua ajuda teria sido impossível.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)** pelos anos vividos, o que lá adquiri e exerço.

Ao **Departamento de Ortopedia e Anestesiologia da FMRP-USP**, em especial aos **Profs. Drs. Luís Vicente Garcia, Edgard Eduard Engel e José Batista Volpon**, com os Srs. muito aprendi e fui moldado profissionalmente.

Ao **Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde Aplicada ao Aparelho Locomotor (FMRP-USP)**,

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” e por isso agradecemos.

Aos alunos de iniciação científica da FMRP-USP **Lucas Klarosk Ismael e Lucas Vinicius Batista Rocha** por toda a ajuda.

À **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e técnicos **Marco Antônio e Nilza Letícia** pela disponibilidade e acesso ao **Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia (FORP-USP)**.

**Ao técnico Daniel e ao Centro para Documentação da Biodiversidade do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) pelo apoio e uso do nano tomógrafo.**

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, minha sincera gratidão.

*“Luto nunca curou nenhum osso quebrado”*

Charles Dickens



## RESUMO

VIEIRA, R.S. **Avaliação de falhas ósseas críticas na calvaria de ratos tratados com diferentes enxertos ósseos autólogos.** 2021. 50f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Histórico:** Embora a enxertia óssea autóloga seja o tratamento mais utilizado para falhas ósseas, a técnica mais eficaz de preparação do enxerto ainda não está clara. Este modelo animal teve como objetivo investigar e comparar diferentes preparações de enxerto ósseo autólogo local para tratamento de falha óssea crítica na calvária de ratos. **Métodos:** 108 ratos foram alocados aleatoriamente em um de três grupos: controle, moído ou picado. Os espécimes foram submetidos a craniotomias no centro superior de suas calvárias com uma fresa circunferencial de 7mm de diâmetro movida por um motor elétrico de alta rotação. A falha óssea crítica produzida foi tratada ou não de acordo com o grupo em que o espécime foi alocado. Os ratos foram submetidos a eutanásia com 3, 6 ou 12 semanas após as cirurgias e as peças obtidas foram analisadas histológica, histomorfométrica, densitométrica, tomográfica e mecanicamente. **Resultados:** Análises histológicas mostraram maior percentual de regeneração da falha óssea crítica no grupo picado seguido pelo moído quando comparados ao controle. A densitometria óssea (DXA) evidenciou maior densidade óssea em todos os períodos de eutanásia ( $p < 0,05$ ) no grupo picado. Os dados da microtomografia ( $\mu$ CT) demonstraram um aumento expressivo do volume ósseo (BV) e sua fração por volume total (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th) e densidade de conectividade (Conn.D) no grupo picado comparados aos grupos moído e controle. Os ensaios mecânicos apresentaram os maiores valores de deformação, força máxima e rigidez relativa no grupo picado em qualquer momento de eutanásia ( $p < 0,05$ ). Foram estabelecidas correlações estatisticamente relevantes entre dados biomecânicos, parâmetros microestruturais e massa óssea. **Conclusões:** Nosso trabalho experimental mostrou que a preparação de enxerto ósseo picado apresentou resultados significativamente melhores do que a de enxerto ósseo moído no tratamento de um defeito ósseo crítico na calvária de ratos.

**Palavras-chave:** Osso. Enxerto Ósseo. Regeneração Óssea. Modelos Animais. Ratos.

## ABSTRACT

VIEIRA, R.S. **Evaluation of critical bone defects in rats calvaria treated with different autologous bone grafts.** 2021. 50f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

**Background:** Although autologous bone grafting is the most used treatment for bone defects, the most effective technique for preparing the graft is still unclear. This animal model aimed to investigate and compare different local autologous bone graft technique preparations for the treatment of critical bone defect in rats' calvaria. **Methods:** 108 rats were randomly allocated into one of three groups: sham, macerated or chopped. The specimens were submitted to craniotomies in the upper center of their calvaria with a 7mm diameter circumferential cutter driven by a high-speed electric motor. The critical bone defect produced was treated or not according to the group to which the specimen was assigned. The rats were euthanized at 3, 6 or 12 weeks after the surgeries and the samples obtained were analyzed histologically, histomorphometrically, densitometrically, tomographically and mechanically. **Results:** Histological analyzes showed a higher percentage of critical bone failure regeneration in the chopped followed by macerated group when compared to sham. Bone densitometry (DXA) showed greater bone density in all periods of euthanasia ( $p < 0.05$ ) in the chopped group. Microtomography data ( $\mu$ CT) showed a significant increase in bone volume (BV) and its fraction per total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and connectivity density (Conn.D) in the chopped group compared to the macerated and sham groups. The mechanical tests showed the highest values of deformation, maximum force and relative stiffness in the chopped group at any time of euthanasia ( $p < 0.05$ ). Statistically relevant correlations were established among biomechanical data, microstructural parameters and bone mass. **Conclusions:** Our experimental work showed that chopped bone graft technique preparation presented significantly better results than macerated bone graft in the treatment of a critical bone defect in rats' calvaria.

**Keywords:** Bone. Bone Transplantation. Bone Regeneration. Animal Models. Rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Organograma básico do estudo	18
Figura 2 – Instrumental cirúrgico para a confecção da falha óssea	19
Figura 3 – Passos técnicos da cirurgia para confecção da falha óssea crítica	21
Figura 4 – Aspecto do enxerto moído preenchendo a falha óssea	21
Figura 5 – Aspecto do enxerto picado preenchendo a falha óssea	22
Figura 6 – Retirada de fragmento retangular de calvária contendo a falha óssea	23
Figura 7 – Seleção dos ROIs e histograma para algoritmo ser aplicado	25
Figura 8 – Algoritmo aplicado evidenciando áreas de osso neoformado	25
Figura 9 – Aspecto microtomográfico dos três grupos com 6 semanas	26
Figura 10 – Ensaio mecânico por diferentes ângulos e em detalhes	27
Figura 11 – Histologia comparativa entre grupos (12 semanas pós operatórias)	29
Figura 12 – Percentual de falha óssea recoberta por osso	30
Figura 13 –BMC (CMO) e BMD (DMO) nos grupos e tempos	32
Figura 14 – Volume ósseo (BV) e Volume ósseo pelo Volume total (BV/TV)	35
Figura 15 – Superfície por volume ósseo (BS/BV) e Índice modelo estrutural (SMI)	35
Figura 16 – Espessura trabecular (Tb.Th) e Número trabecular (Tb.N)	36
Figura 17 – Separação trabecular (Tb.Sp) e Porosidade total (Po tot)	36
Figura 18 – Densidade de conexão trabecular (Conn.Dn)	36
Figura 19 – Força máxima (N) e deformação (mm)	38
Figura 20 – Rigidez relativa (N.mm) e Módulo de elasticidade (N.mm)	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de p para a comparação par a par de Dunn	31
Tabela 2 – Sumário de estatísticas da densitometria	31
Tabela 3 – Sumário de estatísticas da microtomografia	32
Tabela 4 – Sumário de estatísticas do ensaio mecânico	37

## LISTA DE SIGLAS

ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
BMC	Bone mineral content ou CMO
BMD	Bone mineral density ou DMO
BS/BV	Razão da superfície óssea pelo volume ósseo
BV	Volume ósseo total
BV/TV	Volume ósseo sobre o volume total
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMO	Conteúdo mineral ósseo ou BMC
Conn.D	Densidade de conexão entre as múltiplas trabéculas ósseas
DXA	Densitometria óssea
DMO	Densidade mineral óssea ou DMC
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina e eosina
IM	Intramuscular
MAD	Desvio absoluto da mediana
Po tot	Porcentagem de porosidade total
PUSP-RP	Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto
RGB	Red, Green and Blue (vermelho, verde e azul)
ROI	Região de interesse
SMI	Índice de modelo estrutural
Tb.N	Número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido
Tb.Sp	Espaçamento entre as trabéculas ósseas
Tb.Th	Espessura trabecular
TV	Volume ósseo total
USP	Universidade de São Paulo

## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
μCT	Microtomografia computadorizada
μm	Micrômetros
cm	Centímetro
g	Grama
g/cm <sup>2</sup>	Gramas por centímetro quadrado
Kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por Quilo
mm	Milímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
N	Newton
rpm	Rotação por minuto
v	Versão
x	Vezes, repetições

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais Experimentais</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Grupos experimentais</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Procedimento cirúrgico</b> .....	<b>19</b>
3.3.1	Cuidados pós-operatórios .....	22
3.3.2	Eutanásia e coleta de amostras .....	23
<b>3.4</b>	<b>Histologia</b> .....	<b>24</b>
3.4.1	Software de Leitura .....	24
<b>3.5</b>	<b>Densitometria óssea</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Microtomografia</b> .....	<b>26</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio mecânico</b> .....	<b>26</b>
<b>3.8</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise Histológica</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Densitometria óssea</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Microtomografia</b> .....	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Ensaio mecânico</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Limitações do estudo</b> .....	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>49</b>
	A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais .....	49
	B – Artigo submetido para publicação no Journal of Orthopaedic Science .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência e a relevância das falhas ósseas na população estão aumentando e demandando soluções adequadas (CHIARLONE et al., 2020; GUPTA et al., 2021; KLÜTER et al., 2020; MONIR et al., 2021; PARK; LIPORACE; MARWIN, 2017). Essas lesões têm profundos impactos econômicos e clínicos além de os desfechos do tratamento serem prejudicados por altas taxas de complicações e reoperações (NAUTH et al., 2018; PADALHIN et al., 2021; PARK; LIPORACE; MARWIN, 2017). A enxertia óssea autóloga é o tratamento mais utilizado para defeitos ósseos, pois é fácil de se obter, apresenta necessárias propriedades combinadas (osteogênese, osteoindução, osteocondução) e não induz respostas imunes ou transmite doenças infecciosas (ASHMAN; PHILLIPS, 2013; AZI et al., 2016; BALDWIN et al., 2019; BUSCH et al., 2021; DIMITRIOU et al., 2011; HOFMANN et al., 2020; MYEROFF; ARCHDEACON, 2011; SCHMIDT, 2021). Entretanto, permanece a dúvida sobre qual é a técnica de preparação de enxerto ósseo autólogo mais eficaz para fins de tratamento (BERENGO et al., 2006; DIALLO et al., 2021; KRUYT et al., 2004; MOEST et al., 2015; TAŞDEMİR et al., 2020; WONG, 1999).

Uma falha óssea deve ser crítica para que uma técnica de enxerto seja avaliada fidedignamente. Por definição, um defeito ósseo considerado crítico é um defeito que não será preenchido ou regenerará sem intervenção (SCHEMITSCH, 2017; SPICER et al., 2012) ou ainda o menor tamanho de defeito tecidual que não cicatrizará completamente ao longo da vida natural de um indivíduo (FERREIRA et al., 2004; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SPICER et al., 2012). No modelo de defeito ósseo crítico da calvaria do rato, falhas maiores que cinco milímetros foram consideradas críticas (ARAÚJO et al., 2020; BRASSOLATTI et al., 2018; GAO et al., 2018; LUCA et al., 2020; LUCATELI et al., 2018; NETTLETON et al., 2019; SCHMIDT et al., 2019; SOUZA et al., 2020; SPICER et al., 2012; STRAUSS et al., 2021).

A pedra fundamental para o desenvolvimento pré-clínico das tecnologias translacionais é a reprodutibilidade confiável, análogas à condição clínica que estão investigando, em modelos animais (JIMÉNEZ et al., 2018; SPICER et al., 2012). Por isso, utilizamos um modelo animal no qual produzimos um defeito ósseo crítico de calvaria de rato tratado com diferentes técnicas de enxerto ósseo. A regeneração óssea foi posteriormente avaliada em diferentes períodos pós-operatórios por



histologia qualitativa, histomorfometria, microtomografia ( $\mu$ CT), densitometria óssea (DXA) e ensaios mecânicos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo primário**

O presente estudo teve o objetivo primário de averiguar se existe diferença e qual a melhor técnica de preparo de enxerto ósseo autólogo local entre enxerto moído e enxerto picado comparados ao controle para o tratamento de uma falha óssea crítica em calvária de ratos.

### **2.2 Objetivo secundário**

Ambicionamos secundariamente auxiliar cirurgiões das mais distintas áreas de atuação a escolher uma melhor estratégia de enxertia óssea para sua rotina cirúrgica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

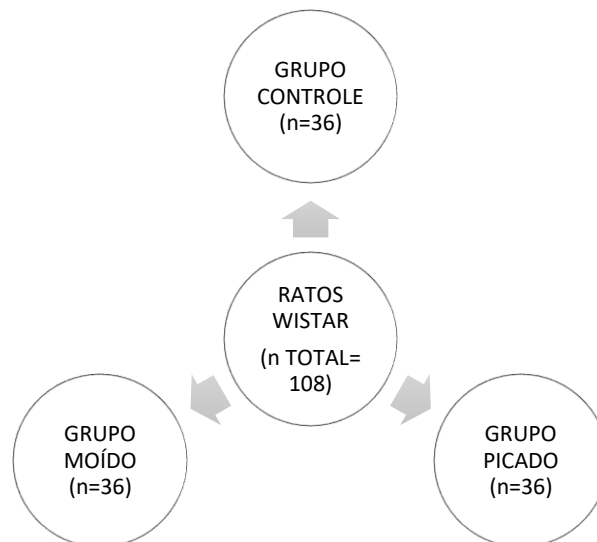
#### 3.1 Animais Experimentais

Ratos Wistar machos com sete semanas de idade pesando 200 g ( $\pm 10$  g) foram obtidos no biotério central da Prefeitura do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (PUSP-RP) e alojados em gaiolas individuais numa sala com condições controladas de umidade (55-60%), temperatura ( $23 \pm 1$  °C) e um ciclo de luz / escuridão artificial de 12 horas cada. Os procedimentos experimentais foram iniciados após os ratos atingirem a maturidade com 300g ( $\pm 10$ g) e média de dez semanas de idade. Todos os animais já estavam adaptados ao ambiente do laboratório no momento dos experimentos.

#### 3.2 Grupos experimentais

Cento e oito (108) ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos ( $n = 36$  por grupo): (1) Controle: ratos com falha óssea crítica na calvária (7 mm de diâmetro) não submetidos a enxertia; (2) Moído: ratos com falha óssea crítica em calvária e tratados com enxerto ósseo autólogo local moído; (3) Picado: ratos com falha óssea crítica na calvária e tratados com enxerto ósseo autólogo local picado.

Figura 1 -Organograma básico do estudo



Fonte: Elaborado pelo autor

Todos os ratos foram inspecionados e tratados periodicamente no mesmo período no intuito de reduzir as interferências externas e o sofrimento de rotina em nossos resultados. As gaiolas foram limpas, água e rações trocadas a cada 2 dias. Os animais eram pesados semanalmente como forma de monitorar sua saúde geral ao longo do estudo.

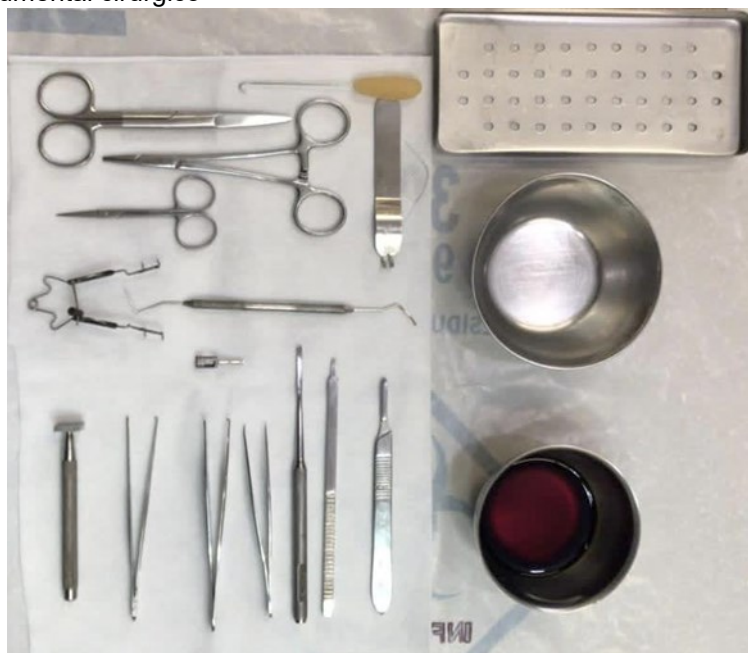
Os procedimentos experimentais (cirurgias iniciais e cirurgias de eutanásia) foram realizados no mesmo horário. O mesmo instrumental, sala cirúrgica e laboratório foram utilizados em todos os experimentos. O mesmo cirurgião realizou todos as cirurgias, a fim de minimizar vieses ambientais e de técnica.

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo aprovou previamente o piloto, protocolos e experimentos com os espécimes realizados neste estudo (protocolo 120/2019) assim como o relatório final dele.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Todos os instrumentais cirúrgicos foram esterilizados em autoclave e resfriados até atingir a temperatura ambiente ( $\sim 23^{\circ}\text{C}$ ). A mesa cirúrgica e materiais outros foram submetidos a antissepsia com abundante quantidade de álcool a 70%.

Figura 2 – Instrumental cirúrgico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular (IM) de Cetamin® (cloridrato de cetamina 10%, 60 mg/kg) e Xylazin® (cloridrato de xilazina 2%, 7,5 mg/kg), ambos do fabricante Syntec. Ao atingir o plano anestésico, os animais tiveram os pelos raspados com máquina elétrica convencional. A raspagem se deu desde o ponto mediano de uma linha tangente a base do focinho até a extremidade distal da calvária também em seu ponto mediano ganhadas as lateralidades simetricamente até a linha que tangencia a base das aurículas externas bilateralmente. Um algodão embebido em álcool foi usado para remover as aparas de cabelo e Lacrilube® da Allergan Inc. aplicado em cada olho para proteção. A região raspada foi pintada com cotonetes de iodo, tomando o cuidado de não se aplicar a solução sobre os olhos do animal. Um campo cirúrgico estéril foi colocado sobre os corpos com uma abertura redonda acima da calvária do rato.

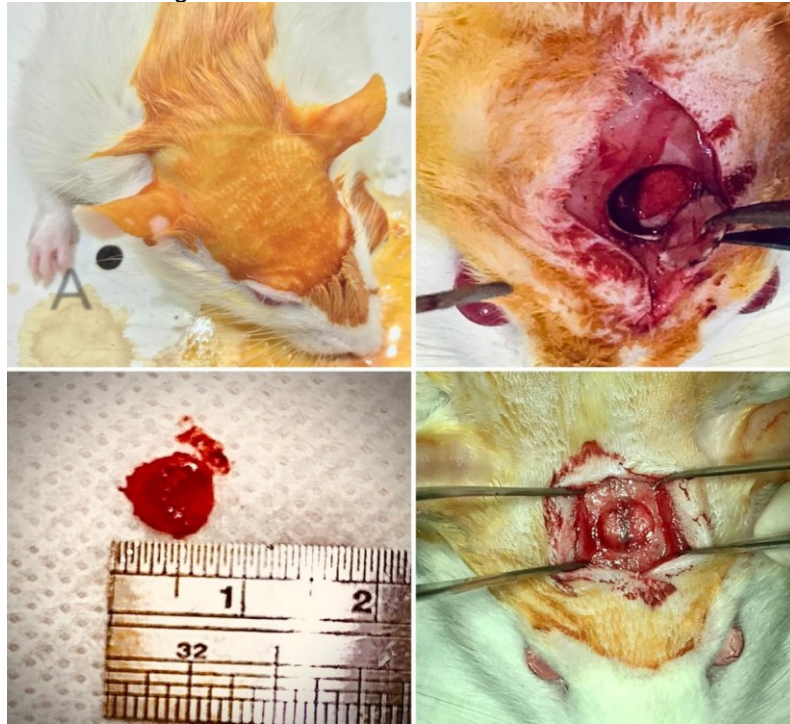
O procedimento cirúrgico foi iniciado com uma incisão longitudinal de aproximadamente 1,5cm da superfície da pele até o periósteo sobre a calvária, desde o osso nasal em sentido caudal até a crista sagital média ou bregma. O periósteo foi então dividido ao meio com o bisturi através de uma linha média sagital elevando-o do crânio. Um afastador de auto estático manteve os tecidos moles separados e expôs o osso subjacente.

Foi desenhada uma área-alvo centrada na intersecção das duas linhas médias anteroposterior e later lateral da calvária. A fresa circular Zipperer® com 7 mm de diâmetro total acoplada ao motor elétrico de alta rotação Strong® Micro Motor 210/105L toca o topo da calvária a 1500 rpm ou menos, arrefecida por gotas estéreis de solução salina normal (1 gota a cada segundo) para evitar a lesão térmica. A fresa foi manuseada com pressão suave constante contra a superfície do crânio para produzir a falha óssea. Um instrumental elevador foi usado na margem da osteotomia e circundando todo o orifício, desta forma completando o defeito. O mesmo elevador foi usado para descolar o cilindro ósseo, liberando-o da dura-máter em sua parte inferior. Nesse momento, quaisquer fragmentos remanescentes do osso foram removidos.

Uma protuberância leve do córtex era esperada e foi observada através do defeito, uma vez que a pressão intracraniana atua sob a ausência de uma calvária intacta após a craniotomia (LAD; MAHESHWARI; SAXENA, 2019).

O defeito foi abundantemente lavado com solução salina para remover quaisquer detritos e lascas de osso antes que o tratamento fosse realizado ou não.

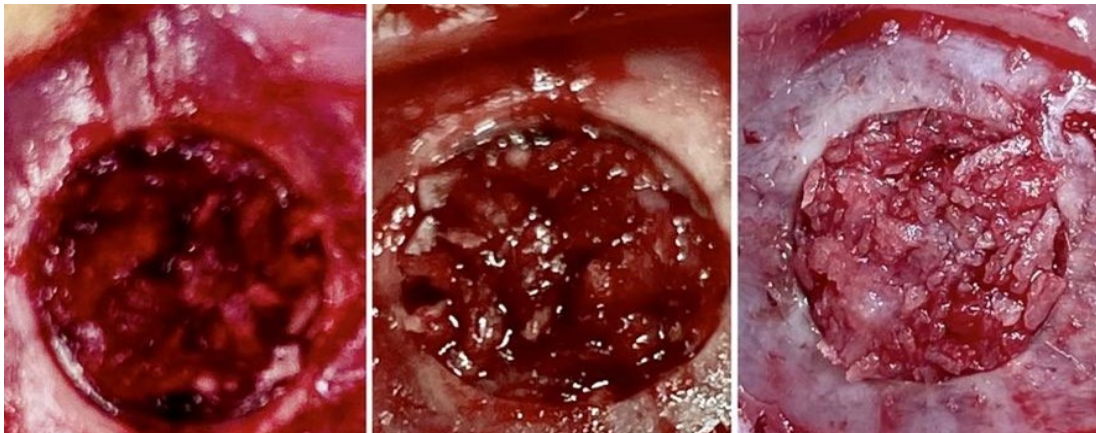
Figura 3 – Passos técnicos da cirurgia inicial.



Fonte: Elaborado pelo autor

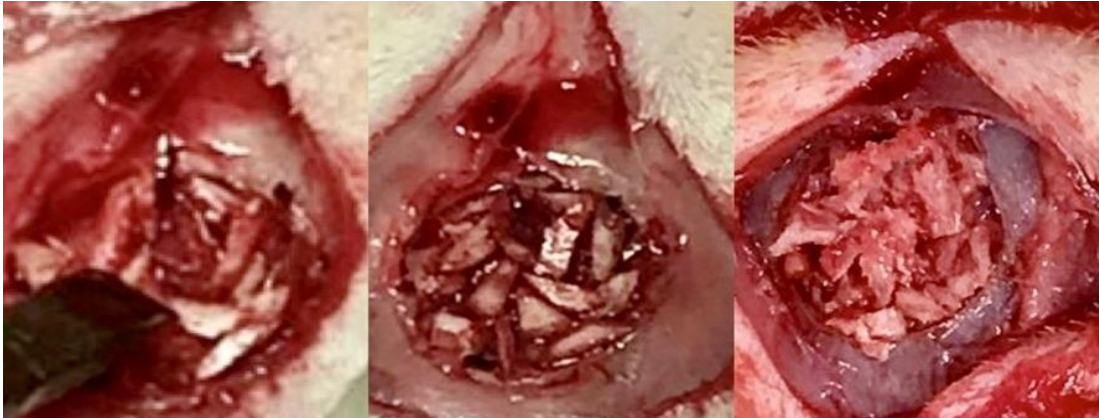
O fragmento de cilindro ósseo, circunferencial com aproximadamente 7mm de diâmetro recebeu diferentes destinações de acordo com o grupo ao qual o rato pertencia. Aqueles espécimes pertencentes ao grupo picado tiveram seus fragmentos ósseos imediatamente partidos com osteótomo para cuidadosamente serem colocados um a um num mosaico preenchendo a falha óssea. Os membros do grupo moído tiveram seus fragmentos esmagados com pilão constituindo substrato para preencher o defeito ósseo recém-criado. Por último, os fragmentos dos ratos do grupo controle foram descartados.

Figura 4 – Aspecto do enxerto moído preenchendo a falha óssea



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 – Aspecto do enxerto picado preenchendo a falha óssea



Fonte: Elaborado pelo autor

O periósteo superior da calvária foi fechado cuidadosamente com sutura contínua contendo seja uma falha óssea não tratada (grupo controle) ou o volume ósseo enxertado (grupos picado ou moído). A pele foi suturada com pontos simples. Ao término das suturas, a cabeça foi limpa com solução salina abundante para remover sujidades. Os ratos foram então colocados sob observação até qualquer sinal de movimentação espontânea para então serem transferidos às gaiolas de manejo laboratoriais.

Perfurar a calvária no sentido craniocaudal, colocar o enxerto ósseo são os dois momentos que se mostraram mais perigosos da cirurgia, uma vez que a pressão excessiva no encéfalo pode causar lesões com abundante sangramento, edema cerebral e até a morte súbita (ANDREWS et al., 2020). Extremo cuidado foi tomado ao longo dessas etapas.

### 3.3.1 Cuidados pós-operatórios

O cuidado pós-operatório diário foi composto por uma avaliação da saúde do animal, incluindo inspeção da ferida, ambiente controlado silencioso, observação neurológica e analgesia otimizada. Todos os ratos foram tratados com tramadol (25 mg/kg) por via subcutânea duas vezes ao dia por 3 dias para dor pós-operatória. Protocolo de cuidados com os animais foram reestabelecidos à rotina prévia após 3 dias.

Todos os animais operados foram aleatoriamente distribuídos dentro de seus grupos em subgrupos para diferentes tempos de eutanásia: 3, 6 e 12 semanas pós-operatórias.

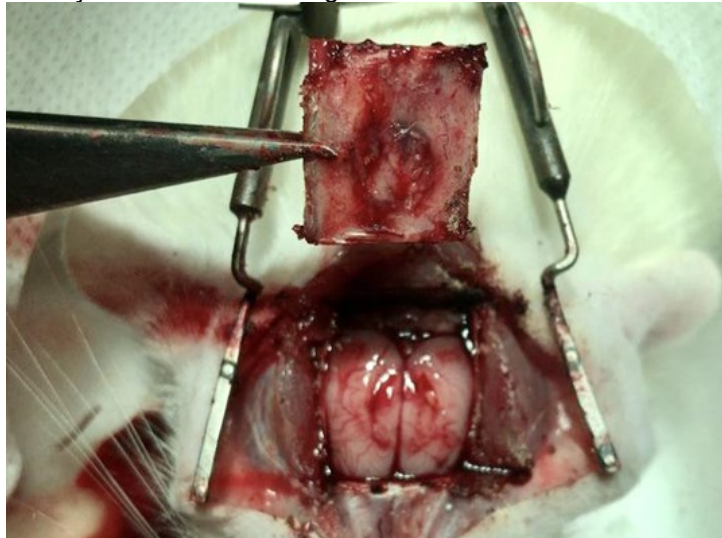
### 3.3.2 Eutanásia e coleta de amostras

Os ratos dos três grupos foram sacrificados em três momentos distintos: 3, 6 e 12 semanas de pós-operatório. O método de eutanásia utilizado foi a injeção intramuscular de overdose anestésica de Cetamin® e Xylazin®.

Passos técnicos similares aos do procedimento original foram realizados com um acesso cirúrgico um pouco mais longo (2,5 cm) centrado na incisão anterior.

Um segmento retangular da calvária do rato foi delimitado e cortado com disco serrilhado SDT® de granulometria fina 19/0,15mm a 9000 rpm acoplado ao mesmo Strong® Micro Motor 210/105L. Os fragmentos da calvária foram coletados contendo o defeito ósseo crítico circundado pelo osso do crânio original, com um tamanho médio de 15,01 x 11,85 mm, um retângulo ósseo por assim dizer.

Figura 6 – Cirurgia para obtenção da amostra retangular de calvária contendo a falha óssea



Fonte: Elaborado pelo autor

Um total de 54 amostras destinadas à histologia foram fixadas em paraformaldeído a 4% frio, enquanto outras 54 amostras foram incluídas em recipientes de álcool 70% para avaliação densitométrica óssea, escaneamento micro tomográfico e ensaios mecânicos.



### 3.4 Histologia

As amostras foram processadas no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto -USP.

A fixação das amostras em paraformaldeído a 4% frio se deu por 24 horas, posteriormente foram descalcificadas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% de 30 a 60 dias e então desidratadas com concentrações crescentes de álcool de 70 a 100%. Submetidas então a diafanização com xilol e suas 3 trocas até as inclusões em blocos de parafina.

Cortes de 5 µm foram obtidos e colocados em lâminas de histologia carregadas (Manco Inc., EUA). A coloração foi realizada com hematoxilina e eosina (HE) nos cortes coronais. Um total de aproximadamente 500 lâminas histológicas foram produzidas com essas 54 amostras.

Um microscópio óptico (Axiovert; Carl Zeiss®, Alemanha) foi usado para explorar as 5 centenas de lâminas e fotografá-las. Uma câmera CCD (AxioCam MRc; Carl Zeiss®, Alemanha) capturou imagens com muitas ampliações diferentes para análise.

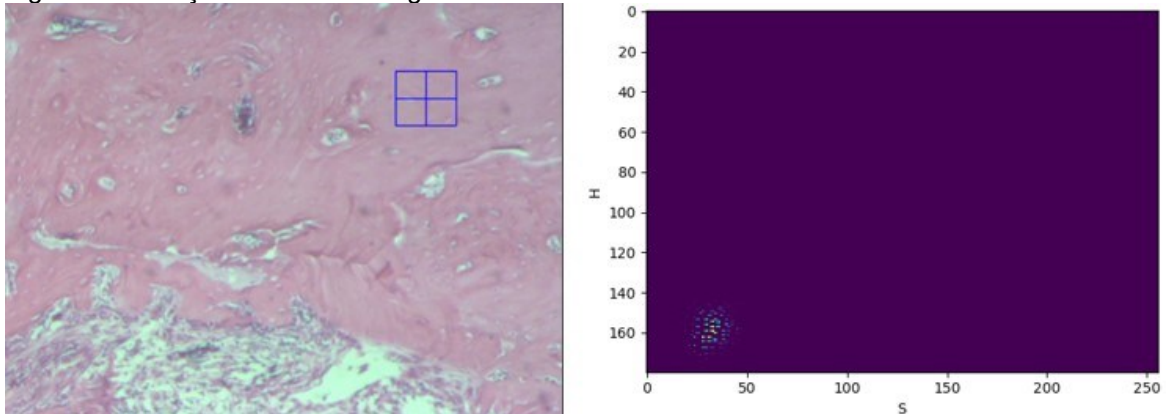
Realizamos as análises nos baseando na nomenclatura vigente da ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) (DEMPSTER et al., 2013).

#### 3.4.1 Software de Leitura

Nosso grupo de estudo desenvolveu um aplicativo na linguagem de programação Python® (v.3.8) para inferir a área preenchida por novo tecido ósseo nas imagens histológicas dos defeitos ósseos críticos das amostras de calvária. O aplicativo usa o pacote python aberto para ler imagens em formato JPG e usa um algoritmo de segmentação de imagem baseado na escala de cores. Depois de capturar a imagem, usamos a função `cv2.COLOR_BGR2HSV()` para converter a imagem para o padrão HSV. O padrão HSV possui 3 canais: H (\* matiz \*) define o tipo de cor que cobre todo o espectro da cor natural. No OpenCV, o valor de H varia de 0 a 179; S é a saturação, também chamada de “pureza”. Os valores variam de 0 a 255 e quanto menor o valor, mais tons de cinza aparecem. Valores altos correspondem à cor “pura”; e o V de \* valor \* ou \* brilho \* que define a cor de brilho e varia de 0 a 255.

A primeira etapa foi selecionar as regiões de interesse (ROIs) correspondentes às áreas de ossificação nas imagens capturadas em microscopia de luz com aumento de 50x. Selecionamos 15 ROIs e encontramos um intervalo entre  $HSV = [155,10,0]$  -  $[179,55, 255]$ . A maioria dos pixels selecionados (ROI) têm valores de  $155 \leq H < 179$  e  $20 \leq S < 50$ .

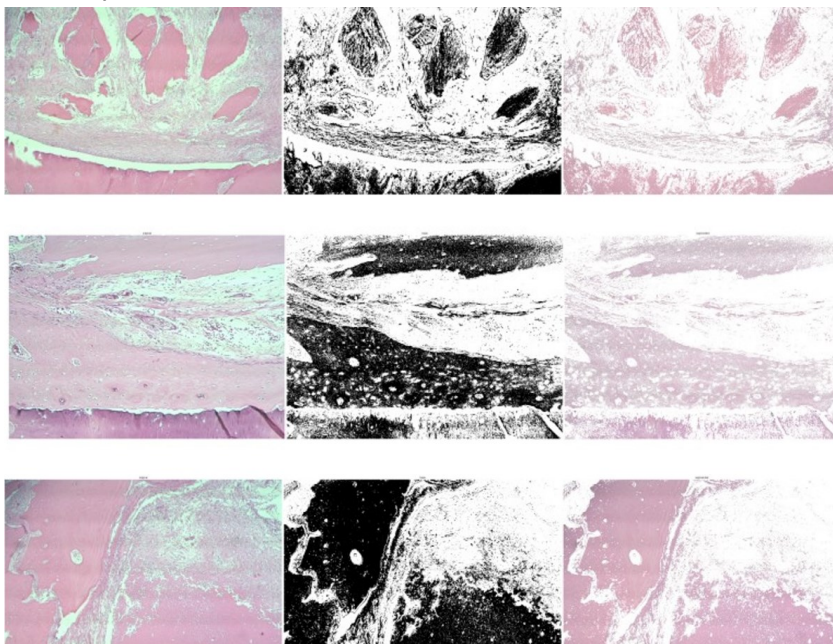
Figura 7 – Seleção do ROI e histograma



Fonte: Elaborado pelo autor

Aplicamos o algoritmo para selecionar as áreas correspondentes e as áreas da imagem fora do intervalo especificado foram convertidas para a cor branco  $RGB = [255,255,255]$ . A porcentagem de áreas de ossificação foi baseada na proporção de pixels não brancos na imagem.

Figura 8 – Algoritmo aplicado evidenciando áreas de osso neoformado



Fonte: Elaborado pelo autor

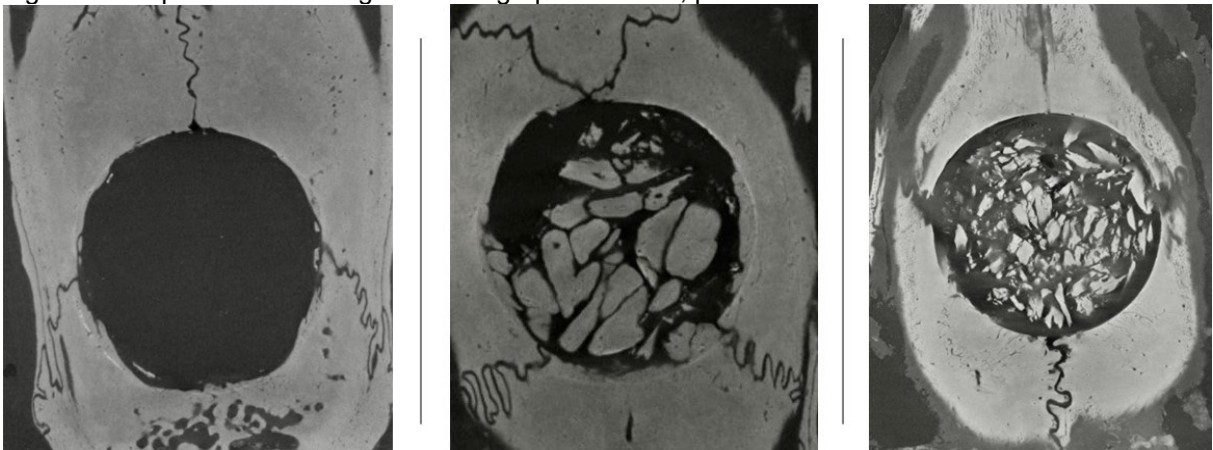
### 3.5 Densitometria óssea

A análise da densitometria óssea (DEXA) foi realizada nas amostras de calvária contendo o defeito ósseo crítico (total de 54 amostras) por medição da absorção de raios-X de dupla energia usando um densitômetro calibrado Lunar® DPX-IQ (Lunar®; software versão 4.7e, GE Healthcare®, Reino Unido). Um ROI de aproximadamente 49 mm<sup>2</sup> foi usada para avaliar a nova formação óssea. A densidade mineral óssea (DMO ou BMD, g/cm<sup>2</sup>) e o conteúdo mineral ósseo (BMC ou CMO, g) foram medidos como protocolo de nosso laboratório.

### 3.6 Microtomografia

As amostras ósseas foram então organizadas e digitalizadas pelo Nano tomógrafo Phoenix v | tome | x s - General Electric®. As imagens de cada espécime foram reconstruídas com software específico (Dataviewer 1.5.1.2 64 bits - SkyScan® Bruker®) e analisadas por CTAn (CTAn v.1.15.4.0 64 bits - SkyScan® Bruker®) para determinar parâmetros morfométricos em regiões selecionadas de interesse (ROI). Todos os parâmetros morfométricos estão de acordo com a nomenclatura atual vigente da American Society of Bone and Mineral Research (BOUXSEIN et al., 2010) Volume ósseo (BV), Volume ósseo percentual (BV/TV), Relação superfície óssea / volume (BS/BV), índice do modelo de estrutura (SMI), Espessura trabecular (Tb.Th), Número trabecular (Tb.N), Separação trabecular (Tb.Sp), Porcentagem de porosidade total (Po tot) e Densidade de conectividade (Conn.Dn).

Figura 9 – Aspecto microtomográfico dos grupos controle, picado e moído.



Fonte: Elaborado pelo autor

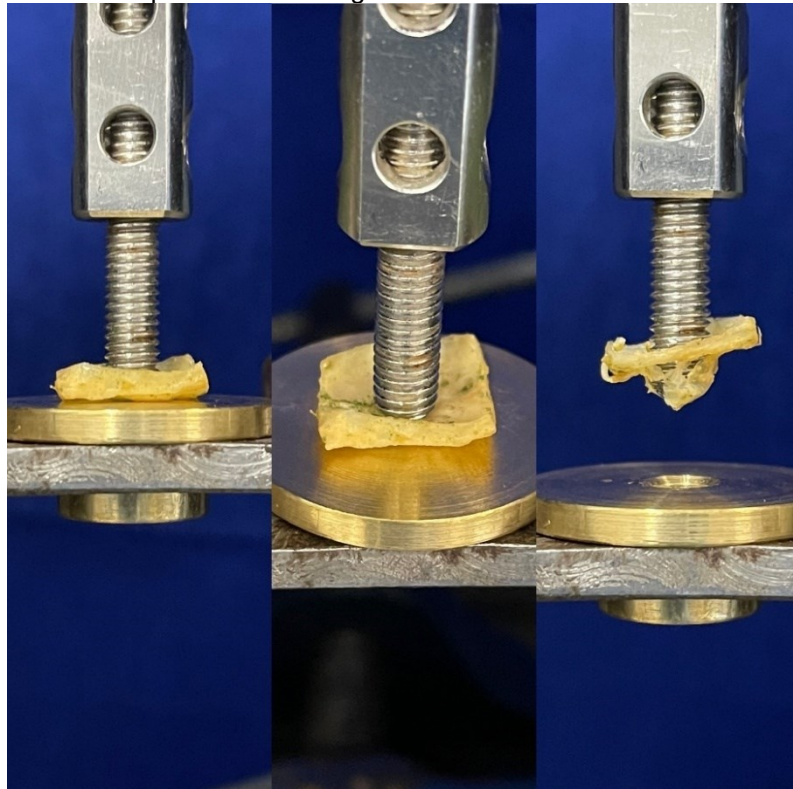
### 3.7 Ensaio mecânico

As 54 amostras de calvária foram levadas para o Laboratório de Bioengenharia (FMRP-USP) para ensaio mecânico. Desenvolvemos um teste, inédito em nosso serviço para estressar mecanicamente as amostras.

Uma máquina de teste universal foi usada para testes de estresse de falhas ósseas críticos com uma célula de carga de 50N (Trd 28 - EMIC DL 10000®). As configurações dos testes foram: velocidade de progressão de 1mm / min, pré-carga de 1N e tempo de acomodação de 30s.

As amostras foram hidratadas com soro fisiológico durante os testes e foram posicionadas em um suporte metálico confeccionado sob medida especificamente para este estudo nas Oficinas de Precisão (PUSP-RP) com orifício circunferencial de 8 mm de diâmetro (centrado e alinhado com o centro da falha óssea). Um empurrador de metal cilíndrico com 7mm de diâmetro (centrado e alinhado com o centro do defeito e com centro do orifício circunferencial de suporte) descendeu gradualmente para entrar em contato com as amostras, pré-carregou e então gradualmente estressou a peça onde foram feitas as osteotomias até o rompimento completo.

Figura 10 – Ensaio mecânico por diferentes ângulos e em detalhes.



Usando o script de software Tesc 3.04, os dados brutos foram filtrados e medidos a força máxima, deformação, rigidez relativa e módulo de elasticidade.

### **3.8 Análise Estatística**

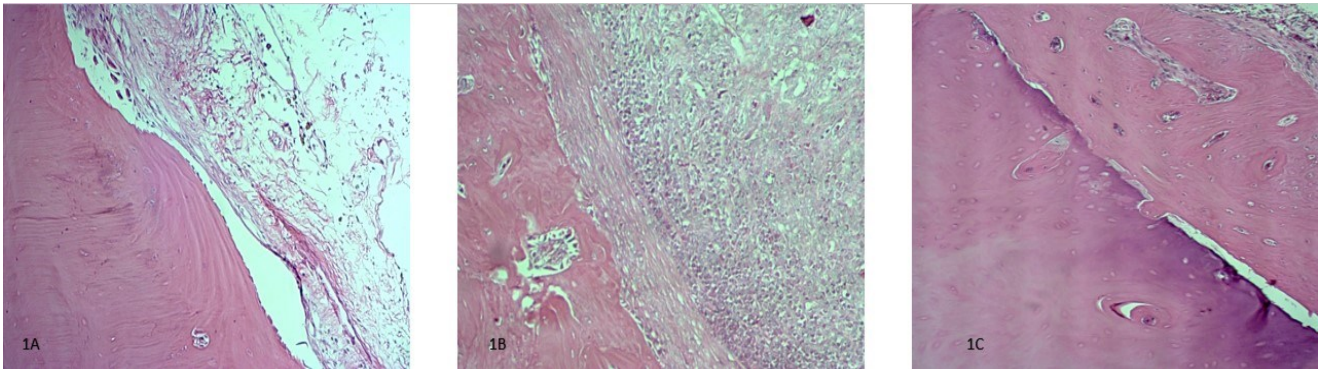
Testes de hipótese foram realizados para analisar a variação na regeneração óssea em diferentes técnicas de enxerto ósseo em comparação com o grupo controle. Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade com base no histograma visual e no teste de Shapiro-Wilks. A estatística descritiva utilizou a mediana e o desvio absoluto da mediana (MAD) como medidas de tendência central e dispersão, respectivamente. Aplicamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do post hoc Dunn para comparação múltipla de Kruskal-Wallis. O índice de correlação de Spearman foi calculado para analisar a relação entre vários parâmetros obtidos por  $\mu$ CT, desitometria óssea e teste mecânico. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R for Linux / GNU versão 4.1.0 e o valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise Histológica

A análise histológica qualitativa evidenciou maior proporção de neoformação óssea nas falhas do grupo picado, seguidos pelos do moído com nenhuma regeneração relevante nos pertencentes ao grupo controle. Na microscopia de campo claro, em qualquer aumento e lâmina, ficamos sugestionados a crer que o grupo picado leva a regeneração óssea mais intensa

Figura 11 – 1A Controle, 1B Moído e 1C Picado (12 semanas pós operatórias)

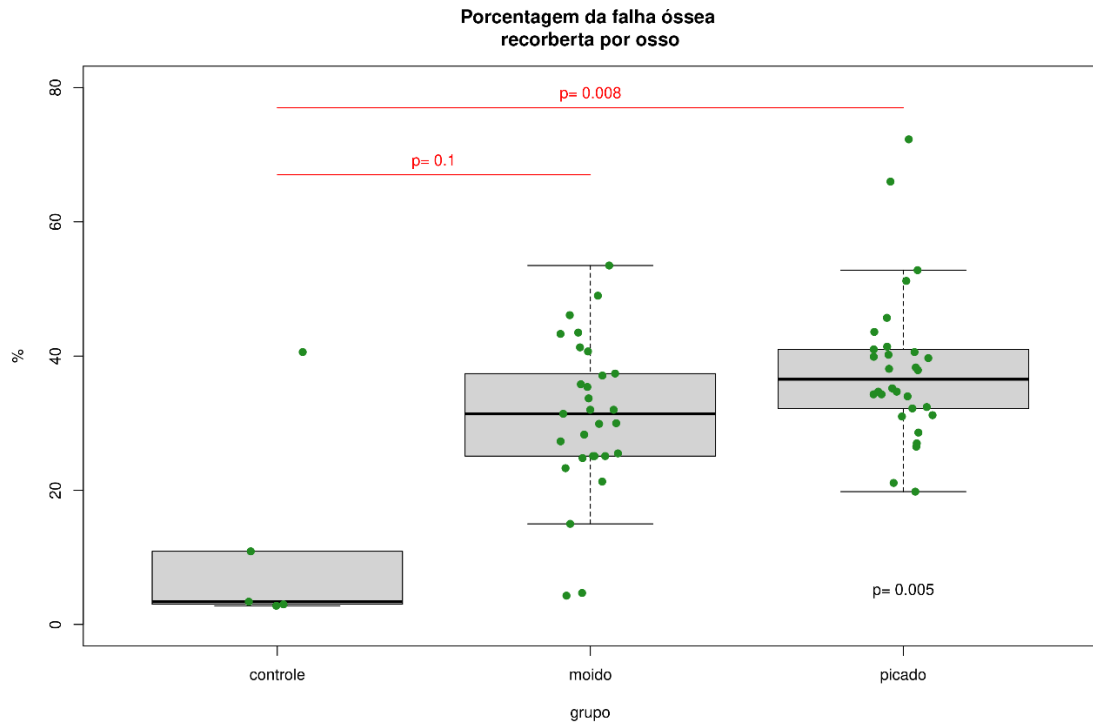


Fonte: Elaborado pelo autor

Em concordância com os achados da análise qualitativa, nossa análise quantitativa comprovou um maior percentual de osso novo formado nos grupos picado e moído quando comparado ao controle ( $p = 0,008$ ). Embora o grupo picado tenha apresentado os maiores percentuais de neoformação óssea, sua diferença com o grupo moído não foi estatisticamente relevante ( $p = 0,1$ )

Apesar da ausência de significância estatística na histomorfometria, a tendência observada de mais osso neoformado no grupo picado dentre todos merece destaque.

Figura 12 – Gráfico da porcentagem de falha óssea recoberta por osso



Fonte: Elaborado pelo autor

## 4.2 Densitometria óssea

Observamos um aumento geral significativo na Densidade Mineral Óssea (DMO), comparando os diferentes períodos de desfecho ( $p < 0,001$ ). Três semanas após o procedimento, a DMO mediana foi de 0,01 no grupo controle (MAD = 0,001), 0,026 (MAD = 0,001) no grupo moído e 0,041 (MAD = 0,0007) no grupo picado ( $p = 0,0004$ ). As diferenças persistiram em 6 e 12 semanas ( $p = 0,0004$  e  $p = 0,0002$ , respectivamente). No grupo controle, a DMO mediana foi 0,0085 (MAD = 0,0007) e 0,03 (MAD = 0,001) em 6 e 12 semanas, respectivamente. No grupo moído, a DMO mediana foi 0,0185 (MAD = 0,0007) e 0,04 (MAD = 0,001), e no grupo picado a DMO mediana foi de 0,031 (MAD = 0,002) e 0,054 (MAD = 0,001) em 6 e 12 semanas, respectivamente. O teste post hoc para comparação par a par demonstrou o incremento na densitometria quando comparados o grupo picado com o controle.

Tabela 1 – Valores de p para a comparação para a par de Dunn

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>	<b>Moído</b>
<b>3 sem.</b>		
Moído	0.05	-
Picado	0.00009	0.05
<b>6 sem.</b>		
Moído	0.05	-
Picado	0.00009	0.05
<b>12 sem.</b>		
Moído	0.047	-
Picado	0.00003	0.047

Fonte: Elaborado pelo autor

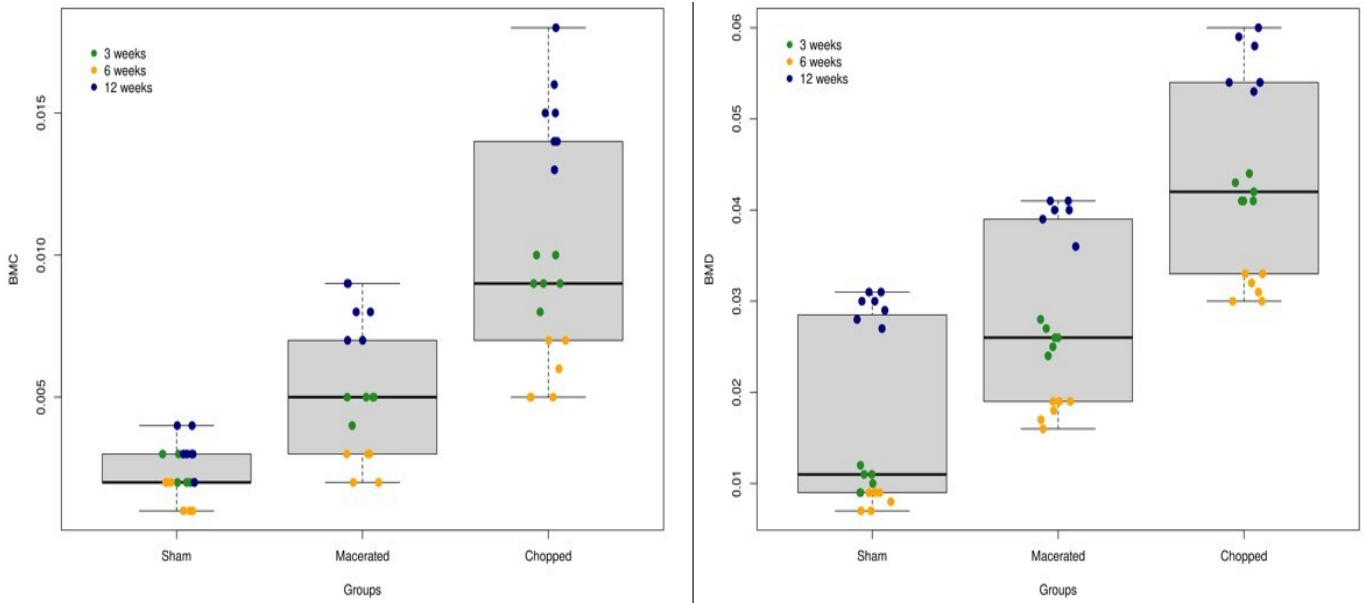
Tabela 2 – Sumário de estatísticas da densitometria

Variável	Semanas	Grupos	Mediana	MAD	Valor de p
CMO	3s				0.000381506512483
		Controle	0.002	0	
		Picado	0.009	0.0007413	
		Moído	0.005	0	
CMO	6s				0.000679911179236
		Controle	0.0015	0.0007413	
		Picado	0.0055	0.0007413	
		Moído	0.003	0	
CMO	12s				0.000192986188648
		Controle	0.003	0	
		Picado	0.015	0.0014826	
		Moído	0.008	0.0014826	
DMO	3s				0.000483675836906
		Controle	0.0105	0.0014826	
		Picado	0.0415	0.0007413	
		Moído	0.026	0.0014826	
DMO	6s				0.000468501725884
		Controle	0.0085	0.0007413	
		Picado	0.0315	0.0022239	
		Moído	0.0185	0.0007413	
DMO	12s				0.000203237635674
		Controle	0.03	0.0014826	
		Picado	0.054	0.0014826	
		Moído	0.04	0.0014826	

Fonte: Elaborado pelo autor



Figura 13 – Gráficos BMC (CMO) e BMD (DMO) nos grupos e tempos



Fonte: Elaborado pelo autor

### 4.3 Microtomografia

Analisamos os parâmetros de  $\mu$ CT entre os grupos experimentais. O BV e o BV / TV estimam o volume de osso regenerado na área crítica do defeito ósseo. Observamos uma regeneração óssea geral significativa nos grupos picado e moído em comparação com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ). O BV mediano no grupo controle em 3, 6 e 12 semanas foi de 1,4 (MAD = 0,2), 3,1 (MAD = 0,35) e 3,3 (MAD = 0,6), respectivamente. No grupo moído, o BV mediano em 3, 6 e 12 semanas foi de 1,3 (MAD = 0,6), 5,4 (MAD = 2,1) e 4,7 (MAD = 2,3)

Analisamos a correlação entre a DMO e os parâmetros microestruturais obtidos por  $\mu$ CT e detectamos uma alta correlação positiva com BV, BV/TV e Tb.N ( $\rho = 0,77$ ,  $\rho = 0,82$  e  $\rho = 0,81$ , respectivamente), e uma forte anticorrelação com separação trabecular e porosidade total ( $\rho = -0,73$  e  $\rho = -0,82$ , respectivamente).

Tabela 3 – Sumário de estatísticas da  $\mu$ CT

Variável	Tempo	Grupo	Mediana	MAD	Valor de p
BV	3S	Controle	3,166115	0,356936	0,002338
		Picado	9,8977	1,5681609	
		Moído	5,39414	2,1424682	
BV	6S	Controle	1,39563	0,2619977	0,0033992
		Picado	6,83119	1,63576	

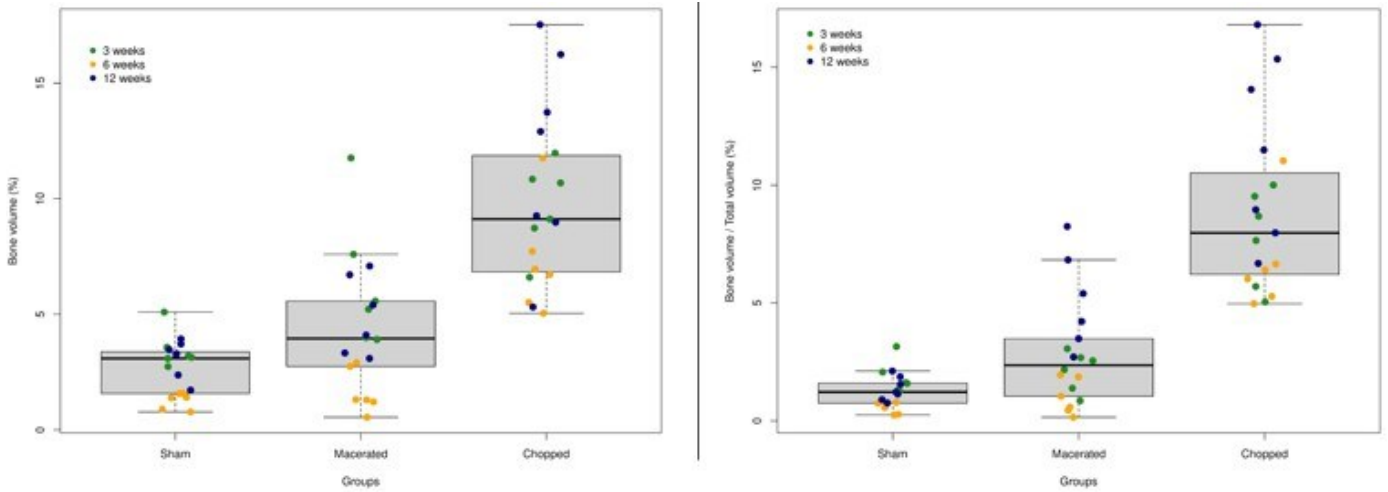
		Moído	1,30313	0,6307796	
BV	12S				0,0013393
		Controle	3,29243	0,6170433	
		Picado	12,90203	5,4014232	
		Moído	4,74866	2,2856874	
BV_TV	3S				0,0030956
		Controle	1,60475	0,4672266	
		Picado	8,1638	2,3709591	
		Moído	2,360649	0,7569726	
BV_TV	6S				0,0029369
		Controle	0,622355	0,2088242	
		Picado	6,21231	1,0150695	
		Moído	0,812585	0,7601513	
BV_TV	12S				0,0003588
		Controle	1,22118	0,4936613	
		Picado	11,49151	5,2106274	
		Moído	4,80795	2,4761051	
BS_BV	3S				0,0029369
		Controle	15,05575	2,7314088	
		Picado	14,35402	0,6243673	
		Moído	23,78984	1,4837787	
BS_BV	6S				0,0016752
		Controle	21,43434	2,8924266	
		Picado	15,01429	1,3562009	
		Moído	24,32235	3,825575	
BS_BV	12S				0,0013795
		Controle	16,58214	1,0060775	
		Picado	10,74758	0,7170743	
		Moído	19,91924	5,6066002	
SMI	3S				0,3657344
		Controle	2,336455	0,6949391	
		Picado	2,272025	0,2065484	
		Moído	2,60934	0,2725019	
SMI	6S				0,096972
		Controle	2,782285	0,1412695	
		Picado	2,37154	0,8946157	
		Moído	3,12213	0,1901435	
SMI	12S				0,0072937
		Controle	2,69875	0,5054332	
		Picado	2,26372	0,4276263	
		Moído	2,65908	0,1270366	
Tb_Th	3S				0,0027539
		Controle	0,27804	0,0279915	
		Picado	0,303625	0,0068126	
		Moído	0,19638	0,0126762	
Tb_Th	6S				0,0033401

		Controle	0,203065	0,0213494	
		Picado	0,28974	0,0335364	
		Moído	0,186185	0,0423727	
Tb_Th	12S				0,0017479
		Controle	0,26466	0,0251004	
		Picado	0,40163	0,0332844	
		Moído	0,22757	0,049467	
Tb_N	3S				0,0012652
		Controle	0,059945	0,0107192	
		Picado	0,26638	0,0818544	
		Moído	0,122595	0,035145	
Tb_N	6S				0,0025523
		Controle	0,02916	0,0121203	
		Picado	0,21446	0,0495485	
		Moído	0,05766	0,0462497	
Tb_N	12S				0,0008805
		Controle	0,04293	0,0279618	
		Picado	0,27641	0,0610238	
		Moído	0,210795	0,0661091	
Tb_Sp	3S				0,0033401
		Controle	3,41913	0,1655471	
		Picado	1,202655	0,0831739	
		Moído	4,250245	2,017359	
Tb_Sp	6S				0,005427
		Controle	3,043925	0,5764052	
		Picado	1,35039	0,3536001	
		Moído	3,48942	1,5489686	
Tb_Sp	12S				0,0057876
		Controle	2,32708	0,2935696	
		Picado	1,3625	0,4850326	
		Moído	1,238055	0,3067351	
Po_tot	3S				0,0030956
		Controle	98,39525	0,4672266	
		Picado	91,8362	2,3709591	
		Moído	97,63928	0,7568599	
Po_tot	6S				0,0029369
		Controle	99,37765	0,2088242	
		Picado	93,78769	1,0150695	
		Moído	99,18742	0,7601513	
Po_tot	12S				0,0003588
		Controle	98,77882	0,4936613	
		Picado	88,50849	5,2106274	
		Moído	95,19205	2,4761051	
Conn_Dn	3S				0,0043202
		Controle	0,43615	0,1866445	
		Picado	2,1469	1,1253898	

		Móido	1,63173	1,0501108	
Conn_Dn	6S				0,0061361
		Controle	0,20744	0,0982223	
		Picado	1,847385	0,7853703	
		Móido	0,86867	0,7994698	
Conn_Dn	12S				0,0066063
		Controle	0,16472	0,0902459	
		Picado	1,46835	1,585359	
		Móido	2,09514	1,110712	

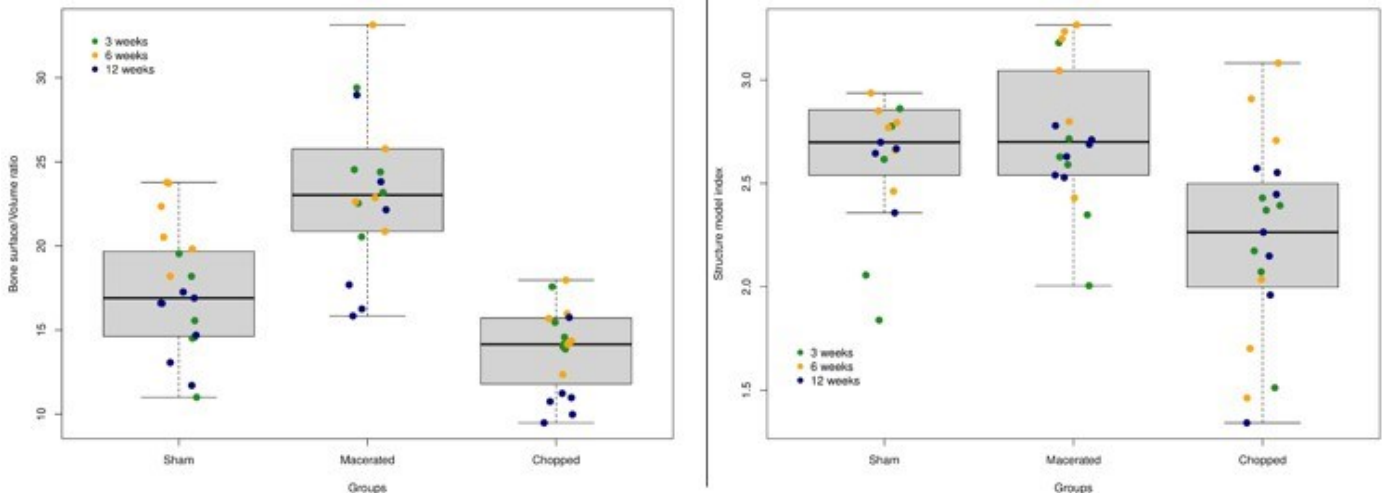
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14 – Volume ósseo (BV) e Volume ósseo pelo Volume total (BV/TV)



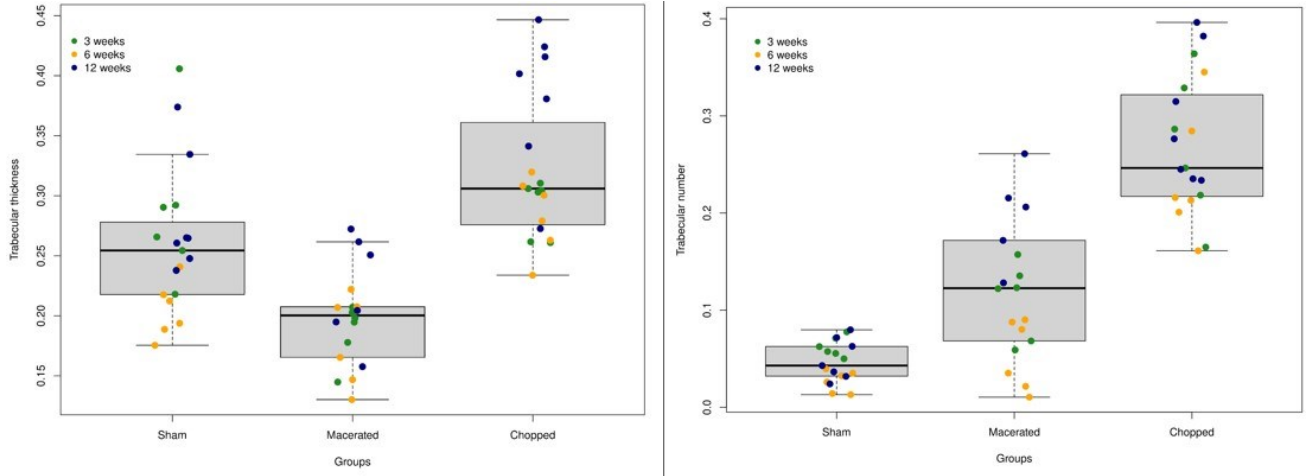
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15 – Superfície óssea pelo Volume ósseo (BS/BV) e Índice modelo estrutural (SMI)



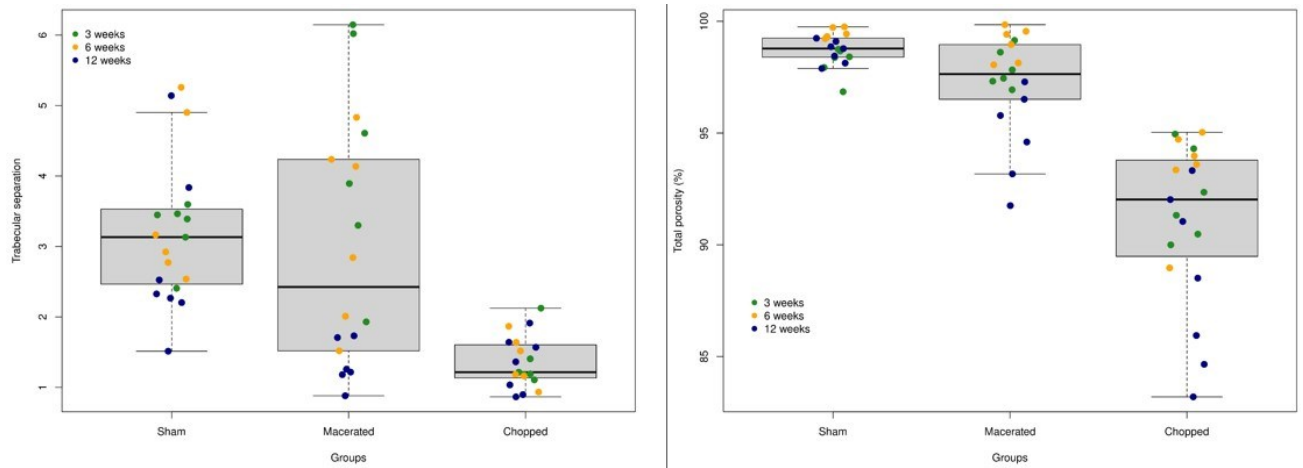
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 16 – Espessura trabecular (Tb.Th) e Número trabecular (Tb.N)



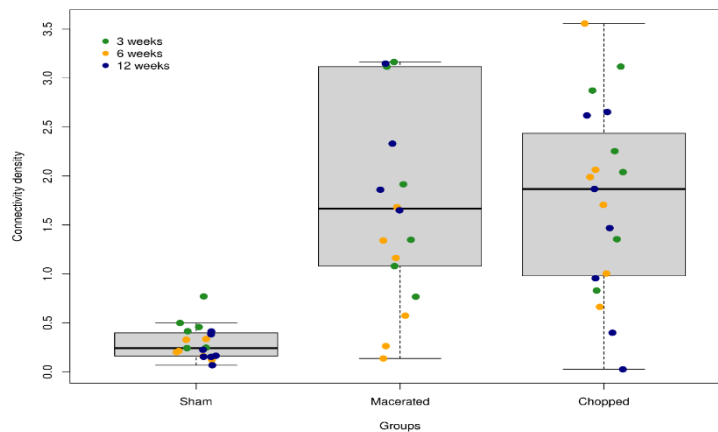
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17 – Separação trabecular (Tb.Sp) e Percentual de porosidade total (Po tot)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 18 Densidade de conexão trabecular (Conn.Dn)



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.4 Ensaio mecânico

A análise biomecânica foi realizada para inferir o comportamento da neoformação óssea sob um teste de estresse. Medimos a força máxima, a deformação, a rigidez relativa e o módulo de elasticidade para cada amostra de calvária. Observamos que as amostras de calvária de ratos submetidos ao enxerto com osso picado foram significativamente mais resistentes ao estresse ( $p < 0,0001$  para todas as variáveis).

A mediana geral (MAD), força máxima, a deformação, a rigidez relativa e o módulo de elasticidade no grupo picado foi 36 (19,9), 2,6 (0,8), 12,5 (5,5) e 39,1 (20,5), respectivamente, em comparação com 10,1 (4), 1,39 (0,3), 6,8 (3) e 6,8 (2,8) em grupo controle e 13,1 (9,2), 1,9 (1), 4,7 (3) e 14,6 (11) em grupos moídos.

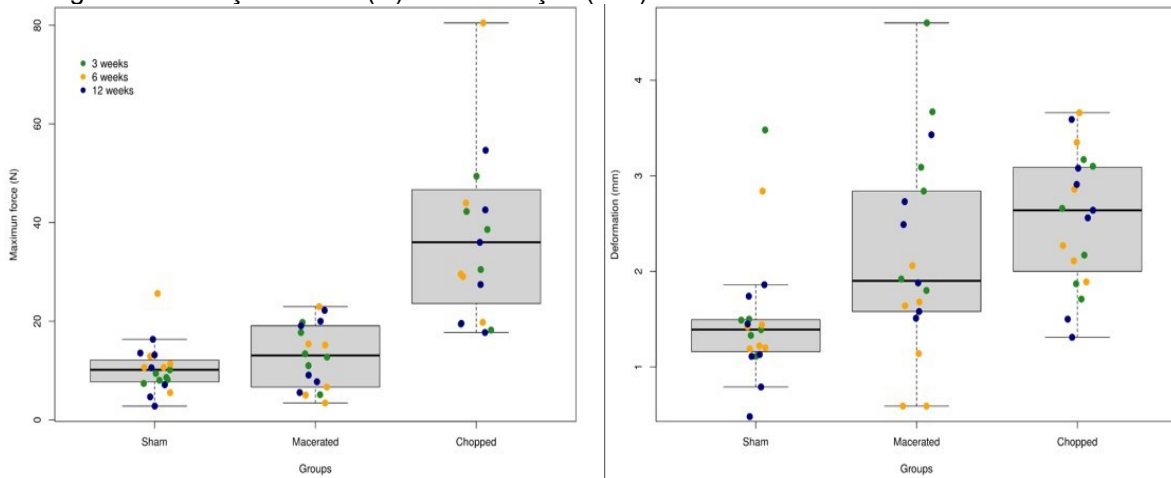
Tabela 4 – Sumário de estatísticas do Ensaio Mecânico

Variável	Tempo	Grupo	Mediana	MAD	Valor de p
Força Máxima	3S				0,002338
		Controle	8,375	1,000755	
		Picado	34,54	16,72373	
		Moído	13,06	4,974123	
Força Máxima	6S				0,006104
		Controle	11	1,660512	
		Picado	36,77	18,33235	
		Moído	10,92	7,679868	
Força Máxima	12S				0,003498
		Controle	10,56	5,100144	
		Picado	35,99	24,35912	
		Moído	14,075	9,095751	
Deformação	3S				0,041776
		Controle	1,44	0,126021	
		Picado	2,415	0,911799	
		Moído	2,965	1,297275	
Deformação	6S				0,010158
		Controle	1,32	0,177912	
		Picado	2,565	0,837669	
		Moído	1,39	0,711648	
Deformação	12S				0,014718
		Controle	1,13	0,504084	
		Picado	2,64	0,652344	
		Moído	2,185	0,852495	
Rigidez relativa	3S				0,020953

		Controle	5,32	1,40847	
		Picado	10,955	5,767314	
		Moído	3,93	2,179422	
Rigidez relativa	6S				0,109004
		Controle	7,68	0,985929	
		Picado	13,135	8,00604	
		Moído	6,11	3,439632	
Rigidez relativa	12S				0,002411
		Controle	8,74	2,920722	
		Picado	12,55	3,573066	
		Moído	3,915	2,216487	
Módulo de Elasticidade	3S				0,004828
		Controle	6,835	1,756881	
		Picado	35,66	15,18924	
		Moído	15,875	5,989704	
Módulo de Elasticidade	6S				0,010632
		Controle	7,83	1,378818	
		Picado	41,62	17,85792	
		Moído	7,74	9,444162	
Módulo de Elasticidade	12S				0,006535
		Controle	5,22	3,78063	
		Picado	48,39	32,2169	
		Moído	15,67	15,7971	

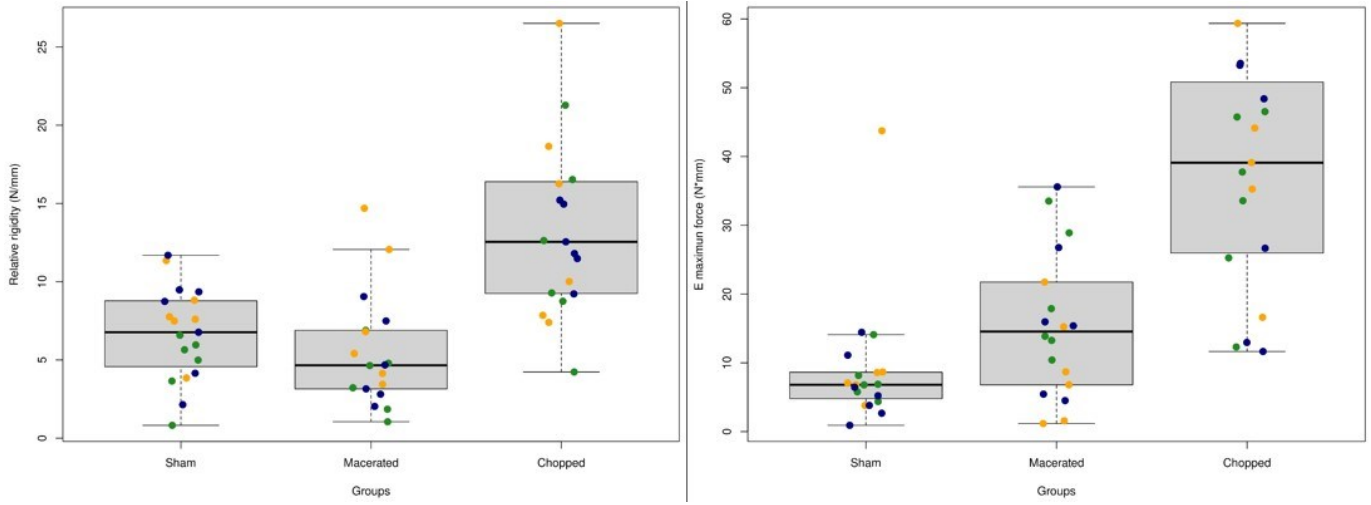
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 19 – Força máxima (N) e Deformação (mm)



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 20 – Rigidez relativa (N/mm) e Módulo de elasticidade (N.mm)



Fonte: Elaborado pelo autor



## 5 DISCUSSÃO

Defeitos ósseos secundários a trauma, infecção, neoplasia ou distúrbios genéticos representam desafios importantes para cirurgiões (CHIARLONE et al., 2020; GUPTA et al., 2021; KLÜTER et al., 2020; MONIR et al., 2021; PARK; LIPORACE; MARWIN, 2017; SIRVEAUX, 2019). Os tratamentos para falhas ósseas críticas invariavelmente resultam em complicações, incluindo infecção, pseudartrose, rigidez articular e deformidade (BOFFANO et al., 2020; NAUTH et al., 2018; PADALHIN et al., 2021; PARK; LIPORACE; MARWIN, 2017). Estes quadros clínicos também estão associados à prolongada convalescência, redução da saúde geral, da qualidade e da expectativa de vida (ILIAENS et al., 2021).

Existem muitas estratégias diferentes para tratar um defeito ósseo, incluindo o enxerto ósseo autólogo tido como *'gold standard'* (padrão ouro) (DIMITRIOU et al., 2011; TOMMASI; PERNI; PROKOPOVICH, 2016).

O sucesso da enxertia óssea é multifatorial: depende da capacidade de remodelação do hospedeiro, varia com o próprio material (SHIN et al., 2013), muda com a técnica cirúrgica utilizada (ROLVIEN et al., 2018) e oscila até mesmo com como o enxerto é limpo e armazenado (BAUER et al., 2011; CABALLÉ-SERRANO et al., 2015).

O enxerto autólogo é o tipo de tratamento mais amplamente utilizado para defeitos ósseos, mas ainda não está claro qual técnica de sua preparação irá induzir a melhor regeneração (ASHMAN; PHILLIPS, 2013; BAUER et al., 2011; CABALLÉ-SERRANO et al., 2015; KHAN et al., [s.d.]; SCHMIDT, 2021).

O primeiro modelo de defeito ósseo de calvária em ratos foi descrito em 1973 por Freeman e Turnbull (FREEMAN; TURNBULL, 1973), mas somente realizado por Takagi e Urist em 1982 (TAKAGI; URIST, 1982).

Sabemos que as dimensões do enxerto influenciam o resultado de um tratamento de defeito ósseo (CHAN et al., 2006; HALLMAN et al., 2021; KALCHTHALER et al., 2020; MARTINEZ-ZELAYA et al., 2021) e a calvária já foi descrita como área doadora (STRONG; MOULTHROP, 2000) mas, até o máximo de nosso conhecimento e revisões, não houve um estudo comparando diferentes preparações de enxerto ósseo autólogo local.

É importante destacar que modelos de defeito ósseo crítico em calvária de rato podem ser usados para o estudo de regeneração óssea e biomateriais antes de considerar animais maiores ou mesmo futuras aplicações clínicas em humanos (MUSCHLER et al., 2010).

Neste estudo animal, comparamos duas técnicas: enxertos ósseos moídos e picados para o tratamento de falhas ósseas críticas. Do nível macroscópico clínico ao nível da microestrutura óssea, passando pela densidade e testes mecânicos, demonstramos a maior efetividade terapêutica do preparo de enxerto ósseo como picado na indução da regeneração óssea.

Detectamos maior massa óssea (densidade e conteúdo) no grupo picado quando comparado aos grupos controle e moído em todos os desfechos temporais aqui analisados: três, seis e doze semanas após a cirurgia do defeito ósseo.

Da mesma forma, nossos testes mecânicos também confirmaram a maior eficácia do enxerto ósseo picado na indução da regeneração óssea com propriedades mais fortes. Como nota, o grupo picado exibiu osso recém-formado com maior força máxima, rigidez e deformação, o que exige cargas mais pesadas antes da falha e conseqüentemente um módulo de elasticidade mais alto.

Histologicamente, nossa análise qualitativa sugere muito maior de formação de osso neoformado e preenchimento de defeito ósseo crítico nas amostras do grupo picado em relação ao grupo moído, o que pode ser confirmado microscopicamente por nossa avaliação de tomografia computadorizada. O grupo picado exibiu um efeito osteogênico notável no aumento dos parâmetros relacionados à formação óssea de volume e fração óssea, densidade de conectividade, espessura e número trabecular, concomitante com diminuições nos parâmetros relacionados à reabsorção; relação superfície / volume óssea, índice do modelo de estrutura, separação trabecular e porosidade.

O modelo animal que desenvolvemos é eficaz, uma vez que nenhuma regeneração óssea espontânea relevante foi detectada em qualquer período de eutanásia examinado no grupo controle.

### **5.1 Limitações do estudo**

Dentre as limitações do nosso estudo, podemos incluir a falta de elucidação dos mecanismos que levam a uma melhor regeneração óssea devido ao preparo do enxerto ósseo picado.

Embora não tenha sido o objetivo de nosso estudo, estudos futuros devem incluir avaliação molecular para expandir nossa capacidade crítica e produção científica de dados, bem como direcionar terapias farmacológicas potentes para exponenciar a capacidade regenerativa óssea do tratamento. Além disso, a comparação entre enxerto ósseo autólogo local, enxerto ósseo autólogo à distância, substitutos ósseos (sintéticos ou não) e adjuvantes de substâncias deve ser mais profundamente investigada nos processos de consolidação óssea, a fim de se aproximar do melhor tratamento possível para defeitos ósseos críticos.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo evidenciaram que diferentes técnicas para preparar e tratar localmente defeitos ósseos podem desempenhar um papel importante na indução da regeneração óssea.

Aqui, desenvolvemos um modelo animal de defeito ósseo que não cicatrizou espontaneamente durante o experimento: uma osteotomia circunferencial de sete milímetros de diâmetro na calvária de rato.

Por outro lado, nossos protocolos de enxertia óssea autóloga local induziram regeneração neste modelo animal. Além disso, a preparação do enxerto ósseo picado exibiu osso neoformado com maior massa, microarquitetura melhorada e melhor integridade mecânica do que o osso neoformado seguido de enxerto ósseo moído.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ANDREWS, B. T. et al. Unrepaired decompressive craniectomy worsens motor performance in a rat traumatic brain injury model. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- ARAÚJO, C. R. G. et al. Evaluation of Bone Regeneration in Rat Calvaria Using Bone Autologous Micrografts and Xenografts: Histological and Histomorphometric Analysis. **Materials**, v. 13, n. 19, p. 4284, 25 set. 2020.
- ASHMAN, O.; PHILLIPS, A. M. Treatment of non-unions with bone defects: Which option and why? **Injury**, v. 44, n. SUPPL.1, jan. 2013.
- AZI, M. L. et al. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 9 nov. 2016.
- BALDWIN, P. et al. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 33, n. 4, p. 203–213, abr. 2019.
- BAUER, J. et al. A Comparison of Five Treatment Protocols for Contaminated Bone Grafts in Reference to Sterility and Cell Viability. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 93, n. 5, p. 439–444, 2 mar. 2011.
- BERENGO, M. et al. Histomorphometric evaluation of bone grafts harvested by different methods. **Minerva stomatologica**, v. 55, n. 4, p. 189–98, abr. 2006.
- BOFFANO, M. et al. A Preliminary Study on the Mechanical Reliability and Regeneration Capability of Artificial Bone Grafts in Oncologic Cases, With and Without Osteosynthesis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1388, 8 maio 2020.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 7 jun. 2010.
- BRASSOLATTI, P. et al. Photobiomodulation on critical bone defects of rat calvaria: a systematic review. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 9, p. 1841–1848, 6 dez. 2018.
- BUSCH, A. et al. Bone Substitutes in Orthopaedic Surgery: Current Status and Future Perspectives. **Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie**, v. 159, n. 03, p. 304–313, 5 jun. 2021.

---

<sup>1</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

- CABALLÉ-SERRANO, J. et al. Bone Conditioned Medium: Preparation and Bioassay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 101, 8 jul. 2015.
- CHAN, C. K. et al. Biomimetic nanocomposites for bone graft applications. **Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 177–188, ago. 2006.
- CHIARLONE, F. et al. Acetabular custom-made implants for severe acetabular bone defect in revision total hip arthroplasty: a systematic review of the literature. **Archives of orthopaedic and trauma surgery**, v. 140, n. 3, p. 415–424, mar. 2020.
- DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 1, p. 2–17, jan. 2013.
- DIALLO, A. M. et al. Osteoformation potential of an allogenic partially demineralized bone matrix in critical-size defects in the rat calvarium. **Materials Science and Engineering: C**, v. 127, p. 112207, ago. 2021.
- DIMITRIOU, R. et al. **Bone regeneration: Current concepts and future directions** **BMC Medicine**, 31 maio 2011.
- FERREIRA, G. R. et al. Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 3, p. 175–180, 2004.
- FREEMAN, E.; TURNBULL, R. S. The value of osseous coagulum as a graft material. **Journal of Periodontal Research**, v. 8, n. 4, p. 229–236, ago. 1973.
- GAO, R. et al. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 1, p. e620–e626, jan. 2018.
- GUPTA, S. et al. Periosteum-Mimicking Tissue-Engineered Composite for Treating Periosteum Damage in Critical-Sized Bone Defects. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 8, p. 3237–3250, 2021.
- HALLMAN, M. et al. Influence of Geometry and Architecture on the *In Vivo* Success of 3D-Printed Scaffolds for Spinal Fusion. **Tissue Engineering Part A**, v. 27, n. 1–2, p. 26–36, 1 jan. 2021.
- HOFMANN, A. et al. Autologous Iliac Bone Graft Compared with Biphasic Hydroxyapatite and Calcium Sulfate Cement for the Treatment of Bone Defects in

- Tibial Plateau Fractures. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 102, n. 3, p. 179–193, 5 fev. 2020.
- ILIAENS, J. et al. Fracture-related infection in long bone fractures: A comprehensive analysis of the economic impact and influence on quality of life. **Injury**, v. 52, n. 11, p. 3344–3349, nov. 2021.
- JIMÉNEZ, G. et al. Models of Disease. In: [s.l: s.n.]. p. 331–350.
- KALCHTHALER, L. et al. The Influence of Different Graft Designs of Intraoral Bone Blocks on Volume Gain in Bone Augmentation Procedures: An In Vitro Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 35, n. 6, nov. 2020.
- KHAN, S. N. et al. The biology of bone grafting. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 13, n. 1, p. 77–86, [s.d.].
- KLÜTER, T. et al. An Ex Vivo Bone Defect Model to Evaluate Bone Substitutes and Associated Bone Regeneration Processes. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 26, n. 1, p. 56–65, 1 jan. 2020.
- KRUYT, M. C. et al. Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, n. 3, p. 544–551, maio 2004.
- LAD, K. A.; MAHESHWARI, A.; SAXENA, B. Repositioning of an anti-depressant drug, agomelatine as therapy for brain injury induced by craniotomy. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 13, n. 4, 31 ago. 2019.
- LUCA, R. E. et al. Osteogenic Potential of Bovine Bone Graft in Combination with Laser Photobiomodulation: An Ex Vivo Demonstrative Study in Wistar Rats by Cross-Linked Studies Based on Synchrotron Microtomography and Histology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 778, 25 jan. 2020.
- LUCATELI, R. L. et al. Doxycycline and Autogenous Bone in Repair of Critical-Size Defects. **Implant Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 461–466, ago. 2018.
- MARTINEZ-ZELAYA, V. R. et al. Trabecular architecture during the healing process of a tibial diaphysis defect. **Acta Biomaterialia**, v. 120, p. 181–193, jan. 2021.
- MOEST, T. et al. Extra-oral defect augmentation using autologous, bovine and equine bone blocks: A preclinical histomorphometrical comparative study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 559–566, maio 2015.
- MONIR, A. et al. Local administration of HMGB-1 promotes bone regeneration on the critical-sized mandibular defects in rabbits. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8950, 26 dez. 2021.

- MYEROFF, C.; ARCHDEACON, M. **Autogenous bone graft: Donor sites and techniques***Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*Journal of Bone and Joint Surgery Inc., , 7 dez. 2011.
- NAUTH, A. et al. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 32, n. 3, p. S7–S11, mar. 2018.
- NETTLETON, K. et al. Molecular Mass-Dependent Resorption and Bone Regeneration of 3D Printed PPF Scaffolds in a Critical-Sized Rat Cranial Defect Model. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 17, p. 1900646, 22 set. 2019.
- PADALHIN, A. et al. Boosting osteogenic potential and bone regeneration by co-cultured cell derived extracellular matrix incorporated porous electrospun scaffold. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 32, n. 6, p. 779–798, 13 abr. 2021.
- PARK, B.; LIPORACE, F.; MARWIN, S. Managing Acetabular Defects in Total Hip Arthroplasty. **Bulletin of the Hospital for Joint Disease (2013)**, v. 75, n. 1, p. 37–46, jan. 2017.
- ROLVIEN, T. et al. **Cellular mechanisms responsible for success and failure of bone substitute materials***International Journal of Molecular Sciences*MDPI AG, , 1 out. 2018.
- SCHEMITSCH, E. H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 31, p. S20–S22, 1 out. 2017.
- SCHMIDT, A. H. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? **Injury**, v. 52, p. S18–S22, jun. 2021.
- SCHMIDT, L. E. et al. Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 21, 13 maio 2019.
- SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 205, p. 299–308, 1986.
- SHIN, S.-I. et al. Effect of a Collagen Membrane Combined With a Porous Titanium Membrane on Exophytic New Bone Formation in a Rabbit Calvarial Model. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 1, p. 110–116, jan. 2013.
- SIRVEAUX, F. Reconstruction techniques after proximal humerus tumour resection. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 105, n. 1, p. S153–S164, fev. 2019.



- SOUZA, E. Q. M. et al. Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 10, n. 4, p. 422–429, out. 2020.
- SPICER, P. P. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1918–1929, 2012.
- STRAUSS, F. et al. Acid bone lysates reduce bone regeneration in rat calvaria defects. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 5, p. 659–665, 10 maio 2021.
- STRONG, E. B.; MOULTHROP, T. Calvarial Bone Graft Harvest: A New Technique. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 123, n. 5, p. 547–552, 1 nov. 2000.
- TAKAGI, K.; URIST, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **Annals of surgery**, v. 196, n. 1, p. 100–9, jul. 1982.
- TAŞDEMİR, U. et al. Autogenous Tooth Bone Graft and Simvastatin Combination Effect on Bone Healing. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 31, n. 8, p. 2350–2354, nov. 2020.
- TOMMASI, G.; PERNI, S.; PROKOPOVICH, P. An Injectable Hydrogel as Bone Graft Material with Added Antimicrobial Properties. **Tissue Engineering Part A**, v. 22, n. 11–12, p. 862–872, jun. 2016.
- WONG, R. A quantitative assessment of the healing of intramembranous and endochondral autogenous bone grafts. **The European Journal of Orthodontics**, v. 21, n. 2, p. 119–126, 1 abr. 1999.

## ANEXOS

## A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da consolidação de falha óssea crítica no crânio de ratos preenchidas com diferentes dimensões e preparos de enxertos e substituto ósseo ao longo do tempo*", registrado com o número do protocolo **120/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino**, envolvendo 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 nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 30 de setembro de 2019.

Colaboradora: Ariane Zamarioli

**Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.**

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/11/2019 a 06/12/2020
Espécie/Linhagem	Rato Wistar-OLD
Nº de animais	108
Peso/Idade	180g / 40 dias
Sexo	Macho
Origem	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2019

**Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**  
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

## B – Artigo submetido para publicação no Journal of Orthopaedic Science

## Journal of Orthopaedic Science

## Evaluation of critical bone defects in a rodent animal model reveals that chopped preparation of autologous bone graft induces better regeneration than maceration

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Evaluation of critical bone defects in a rodent animal model reveals that chopped preparation of autologous bone graft induces better regeneration than maceration
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Corresponding Author:</b>	RIAN SOUZA VIEIRA, M.D. University of Sao Paulo Faculty of Medicine of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto Ribeirao Preto, Sao Paulo BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	University of Sao Paulo Faculty of Medicine of Ribeirao Preto: Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	RIAN SOUZA VIEIRA, M.D.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	RIAN SOUZA VIEIRA, M.D. Renan Ernesto Reis Borges, M.D. Ricardo Cesar Cortes De Bom, M.D. Lucas Vinicius Batista Rocha Lucas Klarosk Ismael Daniel Guimaraes Tiezzi, Ph.D. Antonio Carlos Shimano, Ph.D. Ariane Zamarioli, Ph.D. Helton Luiz Aparecido Defino, Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Although autologous bone grafting is the most widely used treatment for bone defects, the most effective preparation to induce regeneration remains unclear. Therefore, this animal study aimed to investigate and compare different autologous bone grafting techniques as treatment of rat's calvaria critical bone defect.</p> <p>Methods: 122 rats were randomly allocated into three groups: Sham, Macerated and Chopped. The specimens underwent craniotomies at the top center of their calvarias with a 7mm diameter circumferential cutter drill driven by a high-speed electric motor. The critical bone defect produced was treated or not according to the group the specimen was allocated. The rats were euthanized at 3, 6 or 12 weeks after the craniotomies and were analyzed by histomorphometry, bone densitometry, microcomputed tomography (<math>\mu</math>CT), and biomechanical tests.</p> <p>Results: The histomorphometry analysis showed the highest percentage of fulfillment of the critical bone defect in the chopped and macerated group when compared to sham. The densitometry assessment evidenced higher bone mass at all endpoints analysis (<math>p &lt; 0.05</math>) in the chopped group. The <math>\mu</math>CT data exhibited an expressive increase of bone volume (BV) and its fraction per total volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and connectivity density (Conn.D) in the chopped group when compared with the sham and macerated groups. The biomechanical tests exhibited</p>

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

	<p>highest values of deformation, maximum force, and relative stiffness in the chopped group at any time of euthanasia (<math>p &lt; 0.05</math>). Statistically high correlations among biomechanical data, microstructural parameters and bone mass were established.</p> <p>Conclusions: Our experimental work showed that chopped bone grafting preparation exhibited significant better results than macerated in the treatment of a critical bone defect in rat's calvaria.</p>
--	---