

Grandes animais como modelos experimentais em estudos de falhas ósseas críticas: um protocolo para revisão sistemática

Large animals as experimental models of critical size bone defects studies: a protocol for a systematic review

Grandes animales como modelos experimentales en estudios de defectos óseos críticos: un protocolo para revisión sistemática

Recebido: 19/04/2023 | Revisado: 30/04/2023 | Aceitado: 05/05/2023 | Publicado: 10/05/2023

Marilia Nunes Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6689-0363>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: mariliacardoso@usp.br

Anderson Fernando de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8066-4787>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: anderson.fs@usp.br

André Luis do Valle De Zoppa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9852-4843>
Universidade de São Paulo, Brasil
E-mail: alzoppa@usp.br

Resumo

Introdução: modelos animais são essenciais para avaliar a biocompatibilidade, resposta tecidual e função mecânica de materiais ortopédicos utilizados no tratamento de falhas ósseas críticas. Objetivo: apresentar um protocolo de revisão sistemática para identificar e sumarizar a abordagem experimental para ensaios pré-clínicos de falhas ósseas críticas, em grandes animais. Metodologia: o protocolo foi desenvolvido baseado em *Preferred for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) Guidelines*. O levantamento bibliográfico será realizado nas bases de dados PubMed, Scopus, Embase e Google Scholar. Serão considerados estudos pré-clínicos na língua inglesa, portuguesa ou espanhola, que utilizem grandes animais como modelos de falhas ósseas críticas. Os artigos serão analisados por dois revisores, de forma independente. Em caso de divergências, o terceiro revisor será consultado. A revisão sistemática será baseada em *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Guidelines*. Considerações finais: a revisão sistemática proposta faz-se necessária para a padronização de modelos de estudo experimental em falhas ósseas críticas.

Palavras-chave: Implantes Ortopédicos; Biomateriais; Ovinos; Caprinos; Fraturas.

Abstract

Introduction: animal models are essential to evaluate the biocompatibility, tissue response and mechanical function of orthopedic materials used in the treatment of critical size bone defects. Objective: to present a systematic review protocol to identify and summarize the experimental approach for pre-clinical trials of critical size bone defects in large animals. Methods: the protocol was developed based on *Preferred for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) Guidelines*. The bibliographic survey will be carried out in PubMed, Scopus, Embase and Google Scholar databases. Pre-clinical studies in English, Portuguese or Spanish that uses large animal as models of critical size bone defects will be considered. The articles will be analyzed by two reviewers, independently. In case of divergences, the third reviewer will be consulted. The systematic review will be based on *Preferred Reporting Items For Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Guidelines*. Final considerations: The proposed systematic review is necessary for the standardization of experimental studies in critical size bone defects.

Keywords: Orthopedic Implants; Biomaterials; Sheep; Goat; Fractures.

Resumen

Introducción: los modelos animales son fundamentales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta tisular y la función mecánica de los materiales ortopédicos utilizados en el tratamiento de defectos óseos críticos. Objetivo: presentar un protocolo de revisión sistemática para identificar y resumir el enfoque experimental para ensayos preclínicos de defectos óseos críticos en grandes animales. Métodos: el protocolo se desarrolló en base a *Preferred for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) Guidelines*. El levantamiento bibliográfico se

realizará en las bases de datos PubMed, Scopus, Embase y Google Scholar. Se considerarán estudios preclínicos en inglés, portugués y español que utilicen grandes animales como modelos de fallas óseas críticas. Los artículos serán analizados por dos revisores, de manera independiente. En caso de desacuerdos, se consultará al tercer revisor. La revisión sistemática se basará en *Preferred Reporting Items For Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Guidelines*. Consideraciones finales: la revisión sistemática propuesta es necesaria para la estandarización de modelos de estudio experimental em defectos óseos críticos.

Palabras clave: Implantes Ortopédicos; Biomateriales; Ovinos; Caprinos; Fracturas.

1. Introdução

O tratamento de falhas ósseas é um grande desafio na ortopedia (Nauth *et al.*, 2011; Schmitz & Hollinger, 1986). Podem ser secundárias a trauma, infecção, ressecção tumoral ou deformidades de desenvolvimento (Keating *et al.*, 2005; Migliorini *et al.*, 2021). Implicam em hipóxia e deficiência no aporte de nutrientes ósseos (Bornert *et al.*, 2021). Uma falha crítica é definida tecnicamente como aquela que não apresenta resolução durante o período de vida do paciente, mesmo após estabilização cirúrgica (Keating *et al.*, 2005; Schmitz & Hollinger, 1986). A extensão da falha é considerada em perda de comprimento e circunferência do osso envolvido, havendo controvérsias em relação ao tamanho necessário para que seja considerada crítica. Definições gerais encontradas na literatura incluem falhas maiores que 1-2cm, envolvendo mais de 50% da circunferência do osso (Keating *et al.*, 2005).

Modelos animais são essenciais para avaliar a biocompatibilidade, resposta tecidual e função mecânica de um material ortopédico, previamente ao uso clínico. A escolha do modelo animal em estudos experimentais é variável. Há pouca padronização em relação à espécie, tamanho da falha, idade, peso, métodos de estabilização cirúrgica e período de acompanhamento (Pearce *et al.*, 2007; Reichert *et al.*, 2009).

Dentre as espécies animais, cães, ovelhas, cabras, porcos e coelhos são considerados adequados para estudos com falhas ósseas (Pearce *et al.*, 2007; Tagushi & Lopez, 2021). A escolha entre essas espécies depende de vários fatores. Devem ser considerados os custos de aquisição e trato dos animais, tamanho, peso, temperamento, tolerância ao cativeiro, resistência às doenças, uniformidade entre os indivíduos, características biológicas análogas à humanos, tolerância à cirurgia e ambiente. Além disso, a expectativa de vida da espécie deve ser adequada à duração do estudo (Pearce *et al.*, 2007; Schimandle & Boden, 1994).

Para teste de implantes ortopédicos, é necessária a utilização de um modelo que seja reproduzível e no qual as dimensões do implante seja comparável àquela utilizada em humanos (Boot *et al.*, 2022; Sparks *et al.*, 2020; Pearce *et al.*, 2007). Sendo assim, alguns pontos-chave para a condução de estudos pré-clínicos são: uma espécie animal que mimetize a resposta fisiológica humana, escolha de locais anatômicos adequados para a criação das falhas, intervenções e tratamentos que sejam aplicáveis à quadros clínicos reais (Sparks *et al.*, 2020).

Ovinos e caprinos possuem a vantagem de apresentarem peso corporal próximo ao humano, tendo ossos longos de tamanho adequado à fixação de implantes e próteses (Anderson *et al.*, 1999; Boot *et al.*, 2022; Newman *et al.*, 1995; Sparks *et al.*, 2020). O mesmo não acontece com espécies menores como coelhos e cães (Pearce *et al.*, 2007). Além disso, o uso de animais de produção para pesquisa gera uma percepção social menos crítica quando comparada à animais de companhia (Leung *et al.*, 2001).

Biomateriais e terapias celulares estão atualmente disponíveis para o tratamento de falhas ósseas (Hirata *et al.*, 2022; Nauth *et al.*, 2018). A importância do uso de biomateriais naturais e/ou sintéticos para solucionar limitações de implantes ósseos tem se tornado cada vez mais evidente (Hubbell, 1995; Li *et al.*, 2015; Williams, 2009). Tais materiais devem ser estruturalmente similares ao osso, biocompatíveis, bioabsorvíveis, osteocondutores, osteoindutores e de fácil utilização (Bahraminasab, 2020; Li *et al.*, 2015). Antes de serem aplicados em seres humanos, os biomateriais devem ser testados tanto *in*

vitro como *in vivo*. Modelos animais desempenham um papel indispensável na avaliação da efetividade e segurança do uso dos biomateriais como substitutos ósseos (Li *et al.*, 2015).

Esta revisão sistemática tem por objetivo identificar e sumarizar a abordagem experimental para ensaios pré-clínicos de falhas ósseas críticas, em grandes animais utilizados no estudo de regeneração óssea.

2. Metodologia

Protocolo e Registro

Esse protocolo foi desenvolvido baseado em *Preferred for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) Guidelines* (Moher *et al.*; 2015). A revisão sistemática será baseada em *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) Guidelines* (Moher *et al.*; 2009).

Critérios de Elegibilidade

- Tipo de estudo:

- Critério de inclusão: estudos pré-clínicos.

- Critério de exclusão: estudos clínicos, relatos de casos, estudos retrospectivos, revisões narrativas, editoriais, comunicações, capítulos de livros, resumos em anais de eventos, demais publicações sem avaliações por pares ou comitê editorial.

- Intervenções:

- Critério de inclusão: falhas críticas segmentares em ossos longos, preenchidas ou não com biomaterial de qualquer origem e combinação de matérias primas, com ou sem uso de ortobiológicos.

- Critério de exclusão: falhas ósseas não críticas como defeitos circulares, osteotomias simples, corticotomias parciais, ou aquelas realizadas em ossos chatos.

- Animais/População:

- Critério de inclusão: ovinos, caprinos, bovinos, equinos e suínos, adultos de qualquer raça ou sexo.

- Critério de exclusão: qualquer outra espécie animal.

- Tamanho da amostra: sem restrições.

- Língua: inglês, espanhol e português.

- Data de publicação: últimos 10 anos.

- Localização geográfica dos estudos: sem restrições.

Algumas questões serão utilizadas como diretrizes no processo de seleção:

1) O artigo reporta a criação de falha óssea crítica de forma experimental em grandes animais?

2) O título, palavras-chave e resumo contém o PICO utilizado no estudo?

3) Há acesso ao texto completo?

4) O texto completo está disponível em inglês, espanhol ou português?

• Fontes:

Nessa revisão sistemática, quatro bases de dados serão utilizadas para coleta de informações: PubMed, Scopus, Embase e Google Scholar.

Lista das bases de dados:

•PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

•Scopus: <https://www.scopus.com/>

•Embase: <https://www.embase.com/>

•Google Scholar: <https://scholar.google.com/>

Estratégia de busca:

As palavras-chave utilizadas na estratégia de busca serão: *sheep, goat, equine, horse, bovine, pig, large animal, critical size bone defect, experimental, scaffold e biomaterial*. Em cada base de dados, essas palavras-chave e seus sinônimos serão pesquisados da seguinte forma:

•PubMed

(large animal OR sheep OR goat OR equine OR horse OR bovine OR pig) AND critical size bone defect AND experimental AND (scaffold OR biomaterial)

•Scopus

(large AND animal OR sheep OR goat OR equine OR horse OR bovine OR pig) AND critical AND size AND bone AND defect AND experimental AND (scaffold OR biomaterial))

•Embase

('large animal' OR (large AND ('animal'/exp OR animal)) OR 'sheep'/exp OR sheep OR 'goat'/exp OR goat OR 'equine'/exp OR equine OR 'horse'/exp OR horse OR 'bovine'/exp OR bovine OR 'pig'/exp OR pig) AND ('critical size bone defect'/exp OR 'critical size bone defect' OR (critical AND ('size'/exp OR size) AND ('bone'/exp OR bone) AND defect)) AND experimental AND ('scaffold'/exp OR scaffold OR 'biomaterial'/exp OR biomaterial)

•Google scholar

intitle: critical size bone defect AND (sheep OR goat OR equine OR horse OR bovine OR pig) AND experimental

A lista de referências dos artigos incluídos e de artigos de revisão relevantes serão checados e a literatura cinzenta não será pesquisada,

Dados

Todos os artigos encontrados serão baixados para o gerenciador de referências Mendeley e as duplicatas serão removidas.

Processo de Seleção

Um autor realizará a pré-seleção através do título, palavras-chave e resumo de cada artigo. Posteriormente, o texto completo será avaliado por dois autores, de forma independente. Caso necessário, uma terceira opinião será consultada. Um artigo será selecionado caso tenha informações sobre falhas ósseas críticas realizadas de forma experimental em grandes animais, com uso de biomateriais.

Processo de coleta de dados

Os dados dos artigos inclusos serão transferidos para uma tabela no Microsoft Excel pelo primeiro autor.

Síntese dos dados

Os dados que serão coletados dos estudos incluídos estão listados abaixo. Serão organizados em tabelas e incluirão:

- Autor
- Ano
- Local (país)
- Espécie animal e quantidade amostral
- Idade
- Raça
- Tamanho da falha óssea
- Localização da falha óssea
- Tipo de implante utilizado
- Análises realizadas
- Tempo de acompanhamento pós-cirúrgico
- Manejo pós-operatório: tipo e tempo de imobilização externa, alojamento (animal sozinho ou em grupos), acesso a áreas maiores ou restrito em baia.

Emendas

Em caso de desvio de protocolo, o mesmo será reportado na revisão sistemática.

3. Considerações Finais

As informações obtidas pela revisão sistemática oriunda deste protocolo poderão contribuir para que pesquisadores possam identificar o desenho experimental mais adequado para novas pesquisas em regeneração óssea, utilizando falhas críticas em grandes animais. Isso inclui a escolha da espécie animal mais adequada para cada realidade, localização e tamanho do defeito ósseo, modelo de implante metálico e técnica mais eficientes para fixação da falha, além do tempo de acompanhamento pós-operatório. Estas definições são fundamentais para a viabilização da publicação destes dados.

Futuras revisões sistemáticas sumarizando o uso de modelos animais nas etapas iniciais de teste de biomateriais para regeneração óssea, no que se refere a falhas não críticas e teste de biocompatibilidade, além das análises laboratoriais, testes mecânicos dos tecidos biológicos coletados, e de modelos *in vitro* e *in silico* são também necessárias para identificar condutas mais eficientes e atuais, a fim de maximizar as informações obtidas e reduzir o uso de animais.

Referências

- Anderson, M. L. C., Dhert, W. J. A., De Bluijtin, J. D., Dalmeijer, R. A. J., Leeenders, H., Van Blitterswijk, C. A., Verbout, A. J. (1999). Critical Size Defect in The Goat's Os Ilium. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 364, 231-239
- Bahraminasb, M. (2020) Challenges on Optimization of 3D-printed bone scaffolds. *Biomedical Engineering Online*, 19 (69)
- Boot, W., Foster, A. L., Guillaume, O., Eglin, D., Schmid, T., D'Este, M., Zeiter, S., Richards, R. G., Moriarty, T. F. (2022) An Antibiotic-Loaded Hydrogel Demonstrates Efficacy as Prophylaxis and Treatment in a Large Animal Model of Orthopaedic Device Related Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12
- Bornert, F., Clauss, F., Hua, G. Q., Idoux-Gillet, Y., Keller, L., De Grado, G. F. (2021) Mechanistic Illustration: How Newly-Formed Blood Vessels Stopped By The Mineral Blocks of Bone Substitutes Can Be Avoided By Using Innovative Combined Therapeutics. *Biomedicines*, 9 (952)
- Hirata, H., Zhang, N., Ueno, M., Barati, D., Kushioka, J., Shen, H., Tsubosaka, M., Toya, M., Lin, T., Huang, E. (2022). Ageing Attenuates Bone Healing By Mesenchymal Stem Cells in a Microribbon Hydrogel With A Murine Long Bone Critical-Size Defect Model. *Immun. Ageing*, 19 (14)
- Keating, J. F., Simpson, A. H. R. W., Robinson, C. M. (2005) The Management of Fractures With Bone Loss. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 87, 142-150
- Leung, R. S., Siu, W. S., Cheung, N. M., Lui, P. Y., Chow, D. H. K., James, A., Qin, L. (2001) Goats as an Osteopenic Animal Model. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16, (12), p.2348-2355
- Migliorini, F., La Padula, G., Torsiello, E., Spiezia, F., Oliva, F., Maffulli, N. (2021) Strategies for Large Bone Defect Reconstruction After Trauma, Infections or Tumour Excision: Comprehensive Review Of The Literature. *European Journal of Medical Research*, 26 (118)
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G. (2009) Preferred Reporting Items For Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *The BMJ*
- Moher, D., Shamseer, L., Clarke, M., Ghersi, D., Liberati, A., Petticrew, M., Shekelle, P., Stewart, L. A. (2015) Preferred Reporting Items For Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) 2015 Statement. *Systematic Reviews*, 4, (1)
- Nauth, A., Schemitsch, E., Norris, B., Nollin, Z., Watson, J.T. (2018) Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *Journal of Orthopaedic Trauma*, 32 (1), 7-11
- Nauth, A., Mckee, M. D., Einhorn, T. A., Watson, T., Li, P., Schemitsch, E. H. (2011) Managing Bone Defects. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 25(8), 462-466
- Newman, E., Turner, A. S., Wark, J. D. (1995) The Potential of Sheep For The Study of Osteopenia: Current Status and Comparison With Other Animal Models. *Bone*, 16, (4), 277-284
- Reichert, J. C., Saifzadeh, S., Wullschlegler, M. E., Eparidi, D. R., Schutz, M.A., Duda, G. N., Schell, H., Van Griensven, M., Redl, H., Dutmacher, D. W. (2009) The Challenge of Establishing Preclinical Models for Segmental Bone Defect Research. *Biomaterials*, 30, 2144-2163
- Pearce, A. I., Rechards, R. G., Milz, S., Schneider, E., Pearce, S. G. (2007) Animal Models For Implant Biomaterial Research In Bone: A Review. *European Cells and Materials*, 13, 1-10
- Schimandle, J. H. & Boden, S. D. (1994) The Use of Clinical Models to Study Spinal Fusion. *Spine Update*, 19 (17), 1998-2006
- Smitz, J. P. & Hollinger, J. O. (1986) The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 205, 299-308
- Sparks, D. S., Saifzadeh, S., Savi, F. M., Dlaska, C. E., Berner, A., Henkel, J., Reichert, J. C., Wullschlegler, M., Ren, N. J., Cipitria, A., McGovern, J. A., Steck, R., Wagels, M., Woodruff, M. A., Schuetz, M. A., Hutmacher, D. W. A. (2020) Preclinical Large-Animal Model For The Assessment Of Critical-Size Load-Bearing Bone Defect Reconstruction. *Nature Protocols*, 15, 877-924
- Taguchi, T., Lopez, M. J. (2021) An Overview of De Novo Bone Generation In Animal Models. *Journal of Orthopaedic Research*, 39, 7-21
- Williams, D. F. On Nature of Biomaterials. (2009). *Biomaterials*, 30, 5897-5909