

## ESTUDO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO NA CALVÁRIA DE RATOS APÓS ENXERTO DE GRÂNULOS DE BCP ASSOCIADOS COM PRP

Antonio Marcos Reissureição Galindo (PIBIC/FA/UEM), Lediane Pedroso Silva (PBF/UEM), Alfredo Franco Queiroz (DOD/UEM), Isadora Yumi Yokoyama Kaminata (UEM), Luiz Gustavo Vilhena Pereira (UEM), Ana Carolina Amaral Carneiro (UEM), Luzmarina Hernandez (Orientadora). E-mail: lhernandes@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

### Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Morfologia

**Palavras-chave:** osteogênese; cerâmicas a base de fosfato de cálcio; plasma rico em plaquetas.

### RESUMO

As biocerâmicas, a base de fosfato de cálcio, representam um promissor biomaterial para ser empregado como substituto ósseo. A adição de outras substâncias, como o plasma rico em plaquetas, intensifica os efeitos regenerativos destas biocerâmicas devido ao seu conteúdo rico em moléculas ativadoras ligadas à formação de tecido ósseo. O objetivo do estudo foi de avaliar, morfológicamente, a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, após enxerto com BCP puro e BCP enriquecido com plasma rico em plaquetas (PRP). Para o estudo *in vivo*, foram utilizados ossos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na sua forma natural, preparados por calcinação. Os ossos foram enxertados em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar. Após 15 dias os animais foram eutanasiados, e as amostras coletadas para estudo histológico da regeneração óssea, e radiografadas em Raios X e microtomografia 3D por raio-X (Micro-CT), para análise de crescimento ósseo. Em ambos os grupos, o estudo histológico e a análise de imagem mostraram que houve crescimento ósseo principalmente a partir das bordas do defeito, mas em menor quantidade próximos e no interior dos biomateriais. Também foram observadas nucleações isoladas, no interior do tecido conjuntivo. Concluiu-se que não houve diferença evidente no crescimento ósseo entre os grupos BCP e BCP-PR.

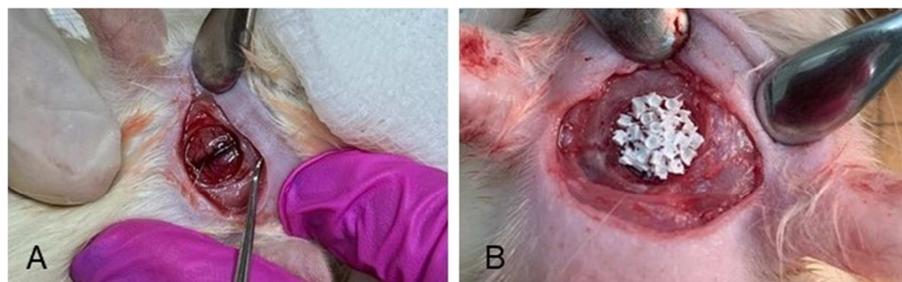
### INTRODUÇÃO

As biocerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) obtidas de ossos de peixe quando empregadas como implantes ou enxertos ósseos são biocompatíveis, bioativas, osteocondutoras sendo ainda capazes de osteointegrar-se ao tecido vivo (Kiyochi *et al.*, 2020). Os BCPs podem ser enriquecidas com outras substâncias para potencializar seu efeito reparador, como a Proteína Morfogenética Óssea (BMP), fatores de crescimento e outras substâncias bioativas (Santos *et al.*, 2005).

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é um concentrado de plaquetas que contém mais de 300 moléculas biologicamente ativas que podem influenciar o processo de regeneração tecidual (Rodriguez *et al.*, 2014). A utilização do PRP no processo de regeneração óssea é baseada no princípio que os fatores de crescimento plaquetários atuam diretamente, no aumento da proliferação de pré-osteoblastos, e indiretamente, por promover maior angiogênese. Ensaios clínicos, pesquisas com animais e com cultura de células avaliaram a eficácia do PRP, associado a enxertos ósseos, como potencializador do reparo tecidual, indicando benefícios desse concentrado de fatores de crescimento (Andrade *et al.*, 2007). O objetivo deste estudo foi avaliar, morfológicamente, a regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, após enxerto com BCP enriquecidos com plasma rico em plaquetas (PRP).

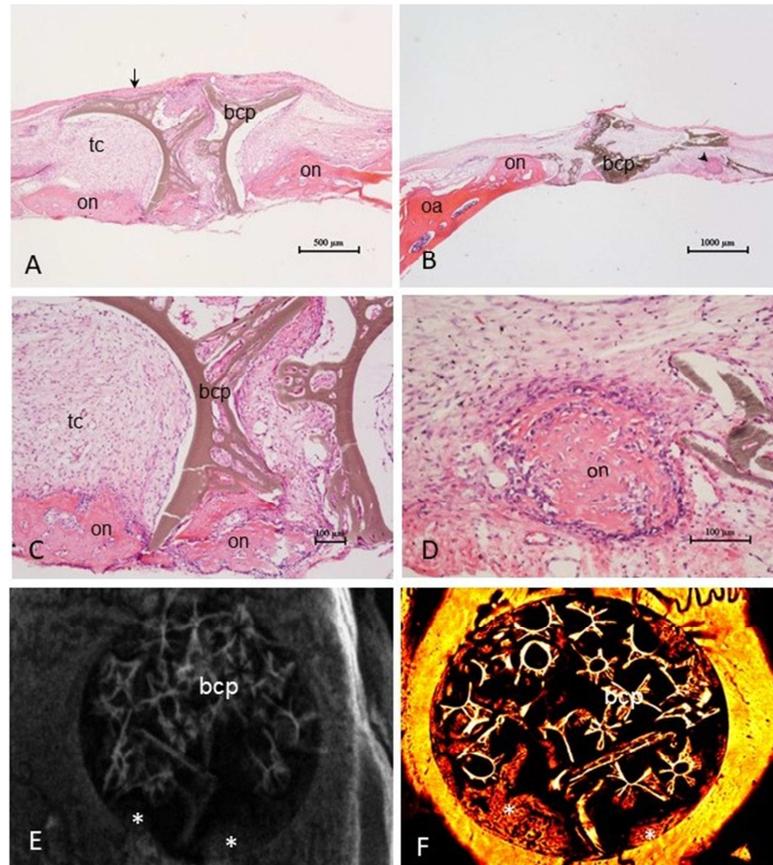
## MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo de aprovação no CEUA/UEM: 6263280422. Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 300 e 400g, provenientes do BIT/UEM. Sob analgesia preemptiva, via IP, com fentanila (0,06 mg/kg) e anestesia via IM com uma associação de xilazina (8 mg/kg), cetamina (80 mg/kg) e acepromazina (1 mg/kg), foi realizada epilação manual da região da cabeça, seguida de antissepsia com iodo tópico, e incisão na pele da base de uma orelha a outra, transcorrendo transversalmente a calota craniana, com aprofundamento até o periósteo para a obtenção de um defeito ósseo de tamanho crítico de 8mm de diâmetro na calvária dos ratos (Figura 1A). Nos defeitos foram realizados enxertos com (1) BCP-controle e (2) BCP-PRP (n=8/grupo) na forma granulada (Figura 1B). O periósteo foi reposicionado, e juntamente com a pele, suturado com fio de sutura 5-0. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em Biotério sob condições normais de temperatura e água e alimentação *ad libitum*. Após 15 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico e as calotas, contendo o enxerto, foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4%, por 48 hs. A seguir, foram encaminhadas para a obtenção de imagens por aparelho de Raio-X (Dabi-atlante ®) e por microtomografia 3D por raio-X (Micro-CT). Posteriormente foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina e coloração em H&E. Os cortes foram observados em microscópio Nikon Eclipse ®. O PRP foi obtido no momento do experimento, a partir de animais da mesma espécie de acordo com (Wilson, 2006).



**Figura 1 -** (A) Fotografia ilustrando um defeito de tamanho crítico de 8mm de diâmetro. Em (B) o defeito foi preenchido com BCP na forma natural, dos ossos de peixe calcinados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 2 -** Fotomicrografia de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, preenchidos com BCP (A e C) e BCP-PRP (B e D). Em todos os defeitos, os espaços foram preenchidos por tecido conjuntivo (tc) frouxo, vascularizado. O crescimento de osso novo (on), em ambos os grupos ocorreu principalmente a partir das bordas dos defeitos. Em (A) é possível observar o BCP na sua forma natural. A seta indica o perióstio. Em (B), numa vista panorâmica (grupo BCP-PRP) observar o crescimento a partir da margem e a cabeça de seta que indica uma nucleação que pode ser observada em maior aumento em (D). Em (C) é possível observar o crescimento ósseo na superfície do biomaterial enxertado. Em (E) e (F), imagens ilustrativas, obtidas por RX e  $\mu$ CT, respectivamente, do mesmo animal (imagem especular), cujo defeito foi preenchido com BCP. Os asteriscos correspondem a áreas de crescimento ósseo, evidentemente mais visíveis por  $\mu$ CT. oa= osso antigo; on= osso novo; tc= tecido conjuntivo; bcp= fosfato de cálcio bifásico. Coloração= hematoxilina e eosina (A a D).

A Figura 2 ilustra e descreve os achados histopatológicos representativos dos grupos estudados. A quantidade de PRP dosado foi em média 1 milhão/ $\mu$ L. Nossos resultados mostraram que num período de 15 dias não foi possível observar qualitativamente uma maior formação óssea nos defeitos cujo enxerto foi enriquecido com PRP. Entretanto a literatura afirma que PRP aumenta a expressão de genes ligados a formação de matriz óssea, como: proteína morfogenética óssea,

colágeno I, osteocalcina e osteopontina e tem sido utilizado amplamente em reparos a danos ósseos (Andrade *et al.*, 2007). É possível que a potencialização da osteogênese, provocada pelo PRP, venha a ser observada após períodos de tempo maiores do que 15 dias. Por outro lado, já é de conhecimento, que o BCP empregado neste estudo, com 36% de  $\beta$ -TCP (comunicação pessoal) tem potencial osteoindutor, o que explica o desenvolvimento ósseo nas nucleações e adjacente ao biomaterial, em ambos os grupos. Também não foi observado o desenvolvimento de fibrose em nenhum dos animais. Uma leve resposta inflamatória aguda foi identificada apenas na região do periósteo superficial, o que poderia ser atribuído ao procedimento cirúrgico. As imagens obtidas por  $\mu$ CT revelam com maior acuidade, em comparação ao RX convencional, a formação óssea em vários pontos do defeito, seja nas bordas, ou sobre o biomaterial. Os resultados indicam que análises da regeneração óssea após maiores tempos de observação são necessários para elucidar o papel do PRP associado ao BCP, em defeitos de tamanho crítico na calvária.

## CONCLUSÕES

Os resultados morfológicos da regeneração óssea 15 dias após o enxerto de BCP ou BCP-PRP em defeitos de tamanho crítico, foram semelhantes.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa PIBIC. À minha orientadora e colegas que colaboraram com os procedimentos técnicos.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. G. S.; DANTAS, B.D. Efeitos biológicos do plasma rico em plaquetas. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 6, 2007.

KIYOCHI JR, H. J.; BAESSO, M. L.; HERNANDES, L. et al. *In vivo* evaluation of interactions between biphasic calcium phosphate (BCP)-niobium pentoxide (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) nanocomposite and tissues using a rat critical-size calvarial defect model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [Illinois], v. 31, 2020.

RODRIGUEZ, I.A. KALAF, G.L.B. SELL, S.A. Platelet-Rich Plasma in Bone Regeneration: Engineering the Delivery for Improved Clinical Efficacy. **BioMed Research International**. v.2014, Article ID 392398, 2014.

WILSON, E. M. K.; BARBIERI, C. H. B.; MAZZER, N. Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, [s. l.], v.14, n. 4, p. 208-212, 2006.