

IMPACTO DE DIFERENTES PREENCHEDORES SOBRE A REGENERAÇÃO ÓSSEA NA CALVÁRIA DE RATOS

Antonio Marcos Reissureição Galindo (PIBIC/CNPq/UEM), Lediane Pedroso Silva (PBF/UEM), Isadora Yumi Yokoyama Kaminata (UEM), Antonio Paulo Felice Rodrigues Leite (UEM), Henrique Lança Fuzeti (UEM), Luzmarina Hernandez (Orientador). 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; defeito de tamanho crítico; biocerâmicas.

RESUMO

As cerâmicas de fosfato de cálcio bifásico (BCPs) obtidas de ossos de peixes, são bioativas, biocompatíveis, osteoindutoras, osteocondutoras, representando um promissor biomaterial para atuar como substituto ósseo. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de estudo histológico, o processo de regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, após o enxerto com BCP ou BCP-PRP, na forma granulada, usando como controle positivo o Bio-Oss considerado padrão ouro na regeneração óssea. Defeitos de tamanho crítico (8mm) foram criados na calvária de ratos *Wistar*. Os defeitos foram preenchidos com BCP, BCP-PRP e Bio-Oss. Após a eutanásia dos animais, as amostras foram processadas para inclusão em parafina e coloração com H&E e Tricrômico de Masson. Não houve resposta inflamatória em nenhum dos grupos e ao longo dos tempos foi possível identificar o processo de ossificação intramembranosa em curso. Conclui-se que os grupos BCP e BCP-PRP apresentaram semelhanças no processo de regeneração óssea quando comparados ao grupo Bio-Oss.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biomateriais representa hoje, uma área diretamente relacionada com a saúde e bem-estar das pessoas. Os enxertos ósseos podem ser heterólogos em relação à espécie e, neste caso, encontram-se os ossos bovinos desproteinizados (Garrido; Sampaio, 2010) e sua forma comercial: Bio-Oss, considerado padrão ouro dentre essa classe de enxertos. As cerâmicas a base de fosfato de cálcio (BCP), extraídas de ossos de peixes, de origem natural e com baixo

custo. Na sua forma pura é um material biocompatível e osteoindutor e a atividade osteogênica pode ser potencializada pela adição de substâncias como o plasma rico em plaquetas (PRP), tornando-o um material promissor para atuar como substituto ósseo (Kiyochi Junior, *et al.*, 2020; Wilson *et al.*, 2006).

O plasma rico em plaquetas, é um concentrado de plaquetas com mais de 300 moléculas biologicamente ativas que influenciam o processo de regeneração tecidual (Rodriguez *et al.*, 2014). O uso do PRP na regeneração óssea está pautado na presença de fatores de crescimento plaquetários que atuam diretamente no aumento da proliferação de pré-osteoblastos, e indiretamente, por promover maior angiogênese (Wilson *et al.*, 2006). O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de estudo histológico, o processo de regeneração óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, após o enxerto com BCP ou BCP enriquecido com PRP, usando como controle positivo o Bio-Oss.

MATERIAIS E MÉTODOS

Protocolo de aprovação no CEUA/UEM: nº 6263280422. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 300 e 400g, proveniente do BIT/UEM. Os animais foram anestesiados (fentanila 0,06 mg/kg (IP) e uma associação de xilazina, 8 mg/kg, Cetamina 80 mg/kg e acepromazina, 1 mg/kg (IM). Seguiu a epilação e antissepsia e incisão na pele da base de uma orelha a outra, transcorrendo transversalmente a calota craniana, com aprofundamento até o periósteo. Para a craniotomia foi utilizado um motor elétrico cirúrgico odontológico (Branemarck System ®) associado a broca trefina de 8 mm (Neodent ®), para a confecção de um defeito de tamanho crítico na calvária de cada animal. Após a remoção do fragmento ósseo, o defeito foi preenchido com (1) BCP e (2) BCP-PRP, grupos testes e (3) Bio-Oss controle positivo (n=8/grupo), na forma granulada. O periósteo foi reposicionado sobre o defeito e, juntamente com a pele, suturado com fio de sutura agulhado de nylon 5-0. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos, em Biotério setorial, sob condições normais de temperatura e água e alimentação *ad libitum*. Após 15, 45 e 90 dias, foram eutanasiados com sobredose de anestésico e as calotas, contendo o enxerto, foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4%, por 48 horas. A seguir, foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson. As lâminas histológicas foram observadas em microscópio Nikon Eclipse ® para estudo morfológico. O PRP foi obtido no momento do experimento, a partir de animais da mesma espécie, de acordo com Wilson *et al.* (2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 ilustra os principais achados histopatológicos observados ao microscópio. A descrição dos resultados e a discussão encontram-se na legenda.

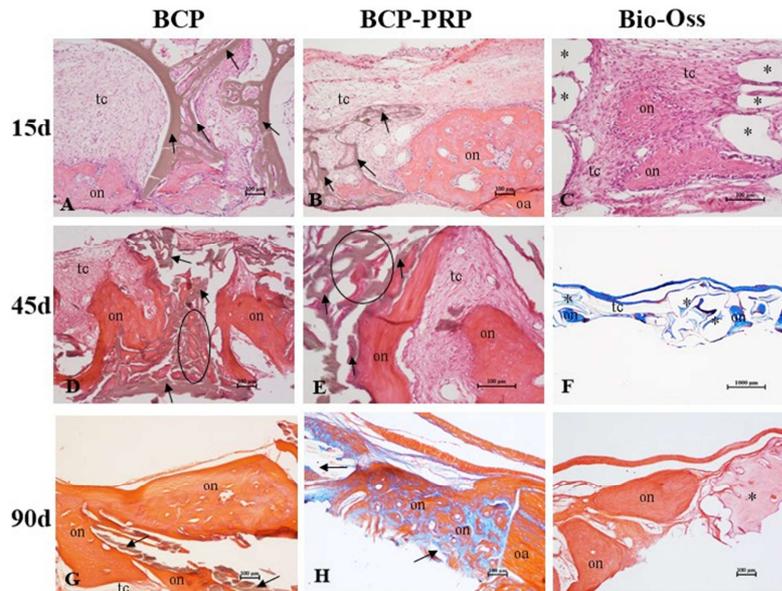


Figura 1 – Fotomicrografia de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos após enxerto BCP (A, D e G), BCP-PRP (B, E e H) e Bio-Oss (C, F e I) aos 15, 45 e 90 dias após o enxerto. As setas indicam BCP ou BCP-PRP e os asteriscos indicam o Bio-Oss. Aos 15 dias observa-se a presença de tecido conjuntivo frouxo (tc), vascularizado preenchendo todos os espaços entre os biomateriais, e a formação de osso novo (on). O crescimento do osso novo (on) ocorreu a partir do osso antigo (oa), nas margens do defeito e também foram observados centros de ossificação intramembranosa, nas áreas ocupadas por tecido conjuntivo frouxo. Esta característica de formação óssea no meio do tecido conjuntivo denota o potencial osteoindutor destes materiais (BCP, BCP-PRP e Bio-Oss) (Silva *et al.*, 2023). Aos 15 dias, nos defeitos preenchidos com Bio-Oss, o osso em desenvolvimento apresenta uma matriz mais basofílica, com maior densidade de células osteogênicas hipertróficas, em seu entorno, enquanto nos grupos BCP e BCP-PRP o osso novo apresenta característica de osso mais maduro, com matriz mais acidófila e matriz envolvente mais frouxa. Aos 45 dias, houve um aumento na quantidade de osso novo envolvendo as biocerâmicas (BCP e BCP-PRP), que “*in natura*” apresentaram formato estrelado. Este crescimento ósseo ao redor do material ilustra o potencial osteocondutor destes materiais (Kiyochi Junior, *et al.*, 2020). Nos grupos BCP e BCP-PRP observa-se os espaços (poros) dos materiais preenchidos com tecido ósseo, destacados pelos círculos. No grupo Bio-Oss a formação óssea somente foi observada entre os grânulos. Aos 90 dias, embora nenhum dos defeitos tenha se apresentado completamente fechado, foi possível observar o aumento na vascularização, especialmente nos grupos BCP-PRP e na formação de osso novo no tecido conjuntivo, ao redor dos vasos sanguíneos. Não houve desenvolvimento de resposta inflamatória em nenhum dos grupos estudados, demonstrando a biocompatibilidade dos materiais (Silva *et al.*, 2023). Em A-E, G e I: coloração hematoxilina e eosina. Em F e H: coloração tricrômico de Masson.

CONCLUSÕES

Neste estudo descritivo foi possível concluir que o BCP, enriquecido ou não com PRP, foi biocompatível, osteoindutor e osteocondutor. Mostrou as mesmas propriedades favoráveis, para a regeneração óssea, quando comparado ao Bio-Oss, empregado atualmente como padrão ouro para realização de enxertos ósseos. São necessários estudos quantitativos para avaliar quantitativamente o osso neoformado.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIB. À FINEP e à Fundação Araucária pelos recursos financeiros. À minha orientadora, aos colegas e profissionais do laboratório de histotécnica animal que colaboraram com os procedimentos técnicos. Ao professor Wilson Weinand (*in memoriam*) pela idealização do projeto e desenvolvimento dos materiais.

REFERÊNCIAS

GARRIDO, C. A.; SAMPAIO, T. C. F. V. S. Uso da biocerâmica no preenchimento de falhas ósseas. *Revista Brasileira de Ortopedia*, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 433-438, 2010.

KIYOCHI JUNIOR, H. J. *et al.* In vivo evaluation of interactions between biphasic calcium phosphate (BCP)-niobium pentoxide (Nb₂O₅) 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. *et al.* Platelet-Rich Plasma in Bone Regeneration: Engineering the Delivery for Improved Clinical Efficacy. **BioMed Research International**, [S.l.], v.2014, p. 1-15, 2014.

SILVA, C. G. da *et al.* Alveolar regeneration induced by calcium phosphate ceramics after dental avulsion: study in young rats. **Materials Chemistry and Physics**, [S. l.], v. 295, n. 1, p. 127082, 2023.

WILSON, E. M. K. *et al.* 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.