



MEDICINA REGENERATIVA: ESTUDO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS ASSOCIADO A BIOCERÂMICA COMO POTENCIALIZADOR DE REGENERAÇÃO ÓSSEA

Antonio Marcos Reissureição Galindo^{1*}, Lediane Pedroso Silva¹, Isadora Yumi Yokoyama Kaminata¹, Lucas Pacheco dos Santos¹, Luiz Gustavo Vilhena Pereira¹, Ana Carolina Amaral Carneiro¹, Luzmarina Hernandez¹

¹Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil.

* antoniomrgalindo@gmail.com

Área Temática: Saúde Humana

Resumo

As biocerâmicas representam um grande avanço na ciência dos biomateriais empregados como substitutos ósseos e podem ser enriquecidas com outras substâncias bioativas, para potencializar seu efeito reparador. O objetivo do presente estudo, é avaliar a regeneração óssea após o enxerto de fosfato de cálcio bifásico (BCP) enriquecido ou não com PRP, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, com o intuito de avaliar se o enriquecimento com o PRP potencializa a formação óssea. Defeitos de tamanho crítico (8mm) foram criados na calvária de ratos *Wistar*. Os defeitos foram preenchidos com BCP ou BCP-PRP. Após a eutanásia dos animais, as amostras foram radiografadas e posteriormente processadas para inclusão em parafina e coloração com H&E. O estudo morfológico demonstrou que em ambos os grupos não houve resposta inflamatória, nem desenvolvimento de fibrose e houve formação óssea por ossificação secundária (intramembranosa e endocondral) para a reparação do defeito. O tempo de observação não foi suficiente para que ocorresse o fechamento do defeito. A associação do PRP com o BCP foi favorável à formação óssea.

Palavras-chave: Regeneração Óssea; Plasma Rico em Plaquetas; Materiais Biocompatíveis.

Introdução

Os defeitos ósseos decorrentes de fraturas, traumas ósseos, osteoporose, dentre outros, despertam a preocupação dos profissionais da saúde por afetar a qualidade de vida das pessoas e representam um elevado custo ao sistema de saúde. Os tratamentos atuais envolvem a medicina regenerativa que se utiliza de materiais que auxiliam no processo de regeneração óssea. Os biomateriais mais comuns são as biocerâmicas à base de fosfato de cálcio (CaP), que incluem: hidroxiapatita (HAp), fosfatos tricálcio α e β (α -TCP, β -TCP), fosfato octacálcico (OCP), fosfato de cálcio amorfo (ACP) e fosfato de cálcio bifásico (BCP), este último é uma combinação de duas diferentes fases CaP (por exemplo HAp e β -TCP) (Tang *et al.*, 2017). As biocerâmicas à base de CaP podem ser enriquecidas com outras substâncias bioativas, para potencializar seu efeito reparador; (Rodriguez *et al.*, 2014). 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 na regeneração óssea se baseia no princípio de que os fatores de crescimento plaquetários atuam diretamente no aumento da proliferação de pré-osteoblastos, e indiretamente, por promover maior angiogênese (Andrade e Dantas, 2007; Wilson *et al.*, 2006). Temos



estudado as propriedades biológicas e físico-químicas de biocerâmicas à base de fosfato de cálcio extraídas de ossos de peixes, associadas ou não a outros materiais (Kiyochi *et al.*, 2020), entre eles, o PRP. O objetivo do presente estudo, é avaliar a regeneração óssea após o enxerto de fosfato de cálcio bifásico (BCP) enriquecido ou não com PRP, em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, com o intuito de avaliar se o enriquecimento com o PRP potencializa a formação óssea. As biocerâmicas serão empregadas na forma calcinada, “*in natura*”.

Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo CEUA/UEM, sob o protocolo nº 6263280422. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, com peso entre 300 e 400 g, provenientes do Biotério Central/UEM. Os animais receberam uma dose preemptiva de fentanila (0,06 mg/kg) via intraperitoneal, seguida de intramuscular com uma associação de xilazina (8 mg/kg), cetamina (80 mg/kg) e acepromazina (1 mg/kg). Após epilação e antissepsia foi realizada uma incisão na pele da base de uma orelha a outra, transcorrendo transversalmente a calota craniana, com aprofundamento até o perióstio. Para a craniotomia foi utilizado um motor elétrico cirúrgico odontológico (Branemarck System ®) associado a uma 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, controle e (2) BCP-PRP, grupo teste (n=8/grupo), na forma granulada. O perióstio foi posicionado 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 45 dias, foram eutanasiados com sobredose de anestésico e as calotas, contendo o enxerto, foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4%, por 48 h. A seguir, foram encaminhadas para a obtenção de imagens em aparelho de Raio-X (Dabi-atlante ®). Posteriormente foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram observadas no 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

O estudo histológico demonstrou que houve formação de tecido ósseo no defeito, em ambos grupos. Neste período não foi detectada a presença de células inflamatórias e nem fibrose. Do ponto de vista quantitativo não foi possível diferenciar a formação óssea entre os grupos BCP e BCP-PRP. A cura dos defeitos se deu por mecanismo secundário, que é a forma mais comum, ou seja, por ossificação intramembranosa e endocondral. Remanescentes cartilagosos são identificados nos cortes pela presença de células hipertróficas e matriz mais basofílica (Figura 1B e 1D). No caso da ossificação intramembranosa, observa-se graus diferenciados de densidade do tecido conjuntivo, em função da deposição das fibras colágenas (Figura 1C e 1D), para a formação do tecido ósseo primário, até a presença de tecido ósseo maduro, mais acidófilo. O crescimento do osso, em ambos os grupos, ocorreu a partir das margens do defeito e também foram observados centros de ossificação nas áreas ocupadas por tecido conjuntivo frouxo, vascularizado entre os biomateriais, que por estarem na forma “*in natura*”, apresentavam formato estrelado como pode ser observado nas imagens em RX

(Figura 1E e F). Dentro dos poros do biomaterial, notou-se a presença de tecido ósseo maduro (Figura 1B e 1D).

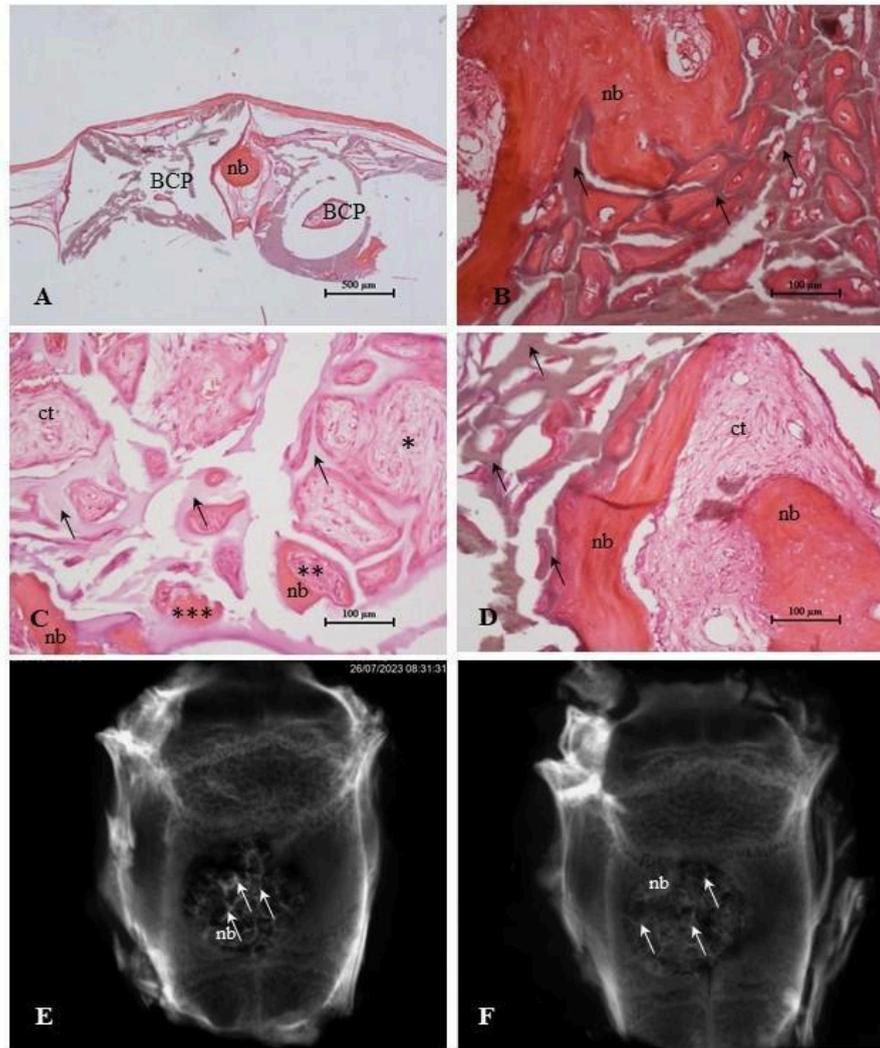


Figura 1 – Fotomicrografia de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos, preenchidos com BCP (A e B) e BCP-PRP (C e D). Imagens radiográficas (E e F), correspondem aos grupos BCP e BCP-PRP, respectivamente. Em A observar formação óssea (nb) circular no centro do defeito, entre dois grânulos de BCP. Em B, os poros dos grânulos estão preenchidos por osso maduro. Em C, os asteriscos (*) indicam a ossificação intramembranosa em curso. (*) indica tecido menos denso, (**) mais denso (***) tecido ósseo (nb). Em D observar osso maduro, lamelar e osteóide (ct). Em E e F, as setas indicam o enxerto ósseo. A-D: coloração hematoxilina e eosina. Em E-F, raios X.

Com relação especificamente ao grupo BCP-PRP, nota-se a presença de hemácias no interior do defeito, e maior organização dos grânulos enxertados, sendo qualitativamente possível observar a maior quantidade de vasos sanguíneos nos defeitos deste grupo. Segundo Andrade e Dantas (2007) o PRP tem potencial para estimular a angiogênese, aumentar a expressão de genes ligados à formação de matriz óssea, como a proteína morfogenética óssea, colágeno I, osteocalcina e osteopontina e tem sido utilizado amplamente em reparos a danos ósseos. As análises de imagens por raio-X nos grupos demonstram a distribuição de biomaterial e pontos de formação óssea na circunferência do defeito na calvária (Figuras 1E e F). No grupo BCP-PRP, ao contrário do grupo BCP, as imagens de RX mostram uma maior organização dos grânulos enxertados no interior do defeito, demonstrando que o PRP promove maior estabilidade do biomaterial permitindo que ele se distribua de



forma homogênea no sítio operado (Carlson e Roach, 2002). Além disso, as imagens mostram pontos hiperdensos (radiopacos), de forma estrelada, que são característicos do formato do biomaterial, mas também presença de pontos de hiperdensidade em diferentes graus, especialmente às margens do defeito e também no centro, indicando formação de osso novo (Figura 1E e 1F).

Conclusões

As biocerâmicas de fosfato de Cálcio são biocompatíveis e bioativas. Neste estudo demonstramos que a associação do PRP com o BCP foi favorável à formação óssea. Mais estudos são necessários para avaliar se a formação óssea foi quantitativamente distinta entre os grupos.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio do CNPq, FINEP e Laboratório de Histotécnica Animal.

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.

CARLSON, N. E.; ROACH JR, R. B. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. **J Am Dent Assoc**, [S. I.], v. 133, n. 10, 2002

KIYOCHI JR, 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.I.], v.2014, p. 1-15, 2014.

TANG, Z. *et al.* Comparison of ectopic bone formation process induced by four calcium phosphate ceramics in mice. **Materials Science And Engineering**, [S.I.], v. 70, p. 1000-1010, 2017.

WILSON, E. *et al.* Estimulação da cicatrização óssea pelo plasma autógeno rico em plaquetas. Estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, [S. I.], v.14, n. 4, p. 208-212, 2006.