

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCIANO FRANCISCO DA SILVA

**HIDROXIAPATITA CARBONATADA E PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM ENXERTOS ÓSSEOS.**

Alfenas – MG

2016

HIDROXIAPATITA CARBONATADA E PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM ENXERTOS ÓSSEOS.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Inorgânica. Orientador: Prof^a. Dr^a. Mirta Mir Caraballo

Alfenas – MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Luciano Francisco da
Hidroxiapatita carbonatada e plasma rico em plaquetas em
enxertos ósseos / Luciano Francisco da Silva. -- Alfenas/MG, 2016.
55 f.

Orientadora: Mirta Mir Caraballo
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de
Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Hidroxiapatitas. 2. Plasma Rico em Plaquetas. 3. Materiais
Biocompatíveis. I. Caraballo, Mirta Mir. II. Título.

CDD-546

Luciano Francisco da Silva

"Hidroxiapatita carbonatada e plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos"

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Inorgânica.

Aprovado em: 29/4/2016

Profa. Dra. Mirta Mir Caraballo
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. Eduardo Tonon de Almeida
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia
Instituição: UNIFENAS

Assinatura:



RESUMO

Na atualidade, a hidroxiapatita tem sido um dos materiais mais utilizados em implantes ósseos, por apresentar uma composição biológica semelhante aos ossos humanos. Nos últimos anos, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) vem despertando interesse na medicina regenerativa, devido ao grande potencial em acelerar a cicatrização e a regeneração dos tecidos. Neste trabalho temos como objetivo avaliar a influência do PRP na capacidade de osteogênese da HAC, em fraturas críticas induzidas na fíbula de ratos. Foi sintetizada uma amostra da carboapatita nanométrica (HAC), similar ao osso humano em composição e cristalinidade, e misturada com PRP, obtido de um rato doador, para ser implantada na fíbula de ratos. A amostra de HAC foi caracterizada por análise térmica (TG), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV), análise elementar (CHN) e difração de raio x (DRX). Os resultados mostraram que a amostra de HAC obtida apresentou uma fase única com aproximadamente 6% de carbonato, e tamanho médio dos cristalitos de 61,80 Å. Foram comparados os resultados dos implantes, com 20, 40, 60 e 80 dias após cirurgia, onde as fraturas de tamanho crítico foram preenchidas com HAC ou HAC+PRP. Como ratos controle, foram utilizados implantes de tubo vazio ou só a fratura de tamanho crítico. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o PRP não influenciou significativamente na transformação de HAC em tecido ósseo.

Palavras chave: Carboapatita Nanométrica. Plasma Rico em Plaquetas. Enxertos.

ABSTRACT

In recent years, hydroxyapatite has been one of the most used materials for bone implants, because of their biological characteristics similar to the human bone. Currently, Platelet Rich Plasma (PRP) has aroused interest in regenerative medicine, because of the potential to accelerate tissue regeneration. In this work, we propose to evaluate the influence of PRP in osteogenesis capacity of HAC in critical induced fractures in rats. The nanocarboapatite (HAC) sample was synthesized similar in composition and crystallinity to human bone, and mixed with the PRP to be implanted in the fibula from rats. The sample HAC was characterized by thermal analysis (TG), vibrational spectroscopy in the infrared region (IR), elemental analysis (CHN) and X-Ray Diffraction (XRD). The results showed that the sample HAC obtained exhibited a single phase with about 6% carbonate, and a average crystallite size of 61.80 Å. The results of the implants 20, 40, 60 and 80 days after surgery showed that there was fractures in critical size bony growth for all samples. As control rats were used implant empty tube or a simple fracture critical size. The results of this study show that PRP did not significantly influence the transformation of HAC in bone tissue.

Keywords: Nanocarboapatite. Platelet rich plasma. Grafts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Punção cardíaca.....	21
Figura 2 -	Separação entre plasma e hemácias.....	22
Figura 3 -	Grupos avaliados durante o experimento: grupo controle (fratura de tamanho crítico e tubo vazio), grupos com enxerto de HAC, HAC + PRP, HAC + cremofor, HAC + PRP + cremofor.....	25
Figura 4 -	Rato depilado e assepiado para início da cirurgia.....	27
Figura 5 -	Curva termogravimétrica obtida para amostra HAC.....	30
Figura 6 -	Espectro de absorção na região do infravermelho para HAC com seus respectivos grupos inorgânicos identificados.....	32
Figura 7 -	Difratograma resultante do refinamento da amostra HAC utilizando o programa FullProf.....	34
Figura 8 -	Animal do grupo HAC+PRP. Radiografia mostrando o deslocamento do implante 20 dias após a cirurgia.....	36
Figura 9 -	Radiografia do grupo controle, demonstrando a não formação de tecido ósseo em animais com 40 dias de pós operatório.....	37
Figura 10 -	Radiografia realizada em animais com 20 dias de pós operatório....	38
Figura 11 -	Radiografia realizada em animais com 40 dias de pós operatório....	39
Figura 12 -	Reabsorção da extremidade inferior da fíbula.....	40
Figura 13 -	Implante com processo inflamatório em animal do grupo HAC +PRP+ crem.....	42
Figura 14 -	Micrografia realizada com 40 dias demonstrando a má formação do tecido ósseo.....	43
Figura 15 -	Micrografia de animais sacrificados com 40 dias.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Testes realizados para obtenção de PRP com velocidade e tempo de centrifugação.....	21
Tabela 2 - Número de animais operados com seu devido implante e o tempo esperado para realização das radiografias e do sacrifício.....	28
Tabela 3 - Bandas de absorção no FTIR dos grupos que compõe a amostra HAC.....	31
Tabela 4 - Resultado da análise elementar para a amostra HAC apresentando os teores de carbono fornecido pelo aparelho, o teor de carbono teórico da amostra e a média dos valores experimentais.....	33
Tabela 5 - Resultado do refinamento obtido pelo programa Fullprof.....	33
Tabela 6 - Resultados obtidos pelas radiografias realizadas nos grupos controles e nos grupos com enxertos após 20, 30 e 40 dias pós-operatório.....	35
Tabela 7 - Microscopia obtida para os animais dos grupos HAC+PRP.....	41

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURA

ΔT	- Variação de tempo
ATR	- Attenuated Total Reflectance
cm	- Centímetros
crem	- Cremofor
CHN	- Análise elementar
DRX	- Difração de raio x
IV	- Infravermelho
HA	- Hidroxiapatita
HAC	- Hidroxiapita Carbonatada
FTC	- Fratura de tamanho crítico
FTIR	- Fourier Transform Infrared Spectrometry
HGF	- Fator de crescimento hepatócitos
mg	- Miligramas
mL	- Mililitros
mm	- Milímetros
MM	- Massa molar
kg	- Kilograma
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PPP	- Plasma Pobre em Plaquetas
PRP	- Plasma Rico em Plaquetas
rpm	- Rotações por minutos
RX	- Raio x
s	- Segundos
TG	- Termogravimetria
TGF-β1	- Fator de crescimento transformador tipo beta1
TbV	- Tubo vazio
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
vol	- Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	APATITAS	14
2.1.1	Hidroxiapatita (HA)	14
2.1.2	Hidroxiapatita carbonatada (HAC)	15
2.2	PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP).....	16
2.3	ENXERTOS COMBINADOS COM PRP.....	17
2.3.1	HA + PRP	17
2.3.2	Implantes e/ou Enxertos com PRP	18
3	JUSTIFICATIVA	20
4	OBJETIVOS	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA (HAC)	22
5.2	OBTENÇÃO DO PRP.....	22
5.3	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	24
5.3.1	Análise térmica (TG)	25
5.3.2	Espectroscopia vibracional na região do infra vermelho (IV)	25
5.3.3	Análise elementar (CHN)	25
5.3.4	Difração de Raio X (DRX)	26
5.4	APLICAÇÃO EM RATOS	26
5.4.1	Experimentos realizados com animais	27
5.5	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	28
5.6	RADIOGRAFIAS	29
5.7	MICROSCOPIA	30
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:.....	32
6.1.1	Análise térmica (TG)	32
6.1.2	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)	33
6.1.3	Análise elementar (CHN)	33
6.1.4	Difração de raio x (DRX)	34
6.1.5	Radiografias	35

6.1.6	Microscopia	41
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

Desenvolver um substituto ósseo que se assemelhe aos ossos humanos tem sido uma árdua tarefa e hoje resulta em um dos maiores desafios na pesquisa de biomateriais [1]. Pensando nisso, surgiram estudos a respeito da Hidroxiapatita carbonatada (HAC), principal constituinte inorgânico dos ossos e dos dentes e que se apresenta como um biomaterial muito semelhante ao tecido ósseo humano [2]. Quando comparada com HA, a HAC apresenta dentre outras vantagens, melhor biocompatibilidade, maior osteocondução e melhor e proliferação celular [3]. As carboapatitas nanométricas desempenham um papel importante na biomineralização e são usadas como biomateriais ativos em aplicações ortopédicas [4].

Tentando-se melhorar a qualidade dos diversos enxertos e/ou preenchimentos ósseos, muitos materiais vêm sendo estudados ao longo dos anos. A hidroxiapatita (HA) tem sido estudada devido a sua semelhança com os ossos humanos (constituídos por 70% de apatita nanométrica) e por apresentar boa biocompatibilidade e osteointegração [5], [6].

Estudando-se possíveis combinações para se melhorar os enxertos e/ou implantes, chegou-se à Hidroxiapatita Carbonatada e ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O PRP, por apresentar grande capacidade regenerativa, tem sido alvo de inúmeros estudos em diversas áreas de cirurgia. Atualmente na área odontológica se pesquisa seus benefícios na cirurgia reconstrutiva oral, maxilofacial e principalmente na implantodontia, associados ao enxerto ósseo. Deve-se ressaltar que o uso do PRP não está restrito ao emprego em implantes ósseos, muitos estudos abordam sua aplicação na regeneração de tecidos moles, lesões músculo-esqueléticas e até mesmo no desenvolvimento da engenharia de tecidos [7].

O PRP vem sendo utilizado para induzir o aumento dos fatores de crescimento e outras moléculas bioativas nos tecidos lesionados, na tentativa de otimizar a cicatrização local. Há tempos já vem sendo usado em odontologia e cirurgia plástica onde a segurança e eficácia deste produto têm sido bem estabelecida [8].

Considerando que grande parte do tecido ósseo é formado por apatita nanométrica, e sabendo-se que o PRP estimula os fatores de crescimento nos

tecidos, testou-se a vantagem de se utilizar uma mistura HAC+PRP em enxertos ósseos com objetivo de estudar a influência do PRP na regeneração óssea. Para realização dos testes provocou-se uma fratura de tamanho crítico na pata esquerda de ratos e foi colocado um enxerto com HAC ou HAC+PRP.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 APATITAS

A apatita é um mineral que apresenta a fórmula geral $[A(1)_2][A(2)_3(BO_4)_3X]$ ou $A_{10}(BO_4)_6X_2$ onde A pode ser substituído por Ca^{2+} , Na^+ , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} . O BO_4 pode ser substituído por PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} e VO_4^{3-} e o X geralmente por F^- , OH^- ou Cl^- [9]. Nos sítios A, B e X podem-se incorporar diferentes íons, alterando as propriedades finais do composto [10]. Por esse motivo, tais minerais tem sido muito utilizados na linha de desenvolvimento de novos materiais.

As apatitas naturais podem ser encontradas e exploradas em diversas regiões do Brasil como Araxá, Salitre, Serra Negra e Tapira (Minas Gerais), Catalão (Goiás), Jacupiranga (SP), Anitápolis (SC), Angico dos dias (BA) e Maicuru (PA) [9].

2.1.1 Hidroxiapatita (HA)

É conhecido que as hidroxiapatitas, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, possuem diversas aplicações na área da medicina pelo fato de sua composição se aproximar da composição óssea representando de 30 a 70% de toda massa óssea [11]. Por esse motivo uma das elevadas contribuições destes materiais está em sua aplicação em enxertos ósseos, implantes dentários e/ou como transportadores de drogas dentro do organismo [6], [12], [13].

A hidroxiapatita, na forma estequiométrica $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, é formada para razão molar Ca/P = 1,67, resultando no fosfato de cálcio mais estável e menos solúvel da família. Porém, composições apresentando boa estabilidade podem ter esta razão estendida até aproximadamente 1,5 [12].

A temperatura de síntese da hidroxiapatita influencia diretamente na cristalinidade do material obtido, por exemplo, as sintetizadas em altas temperaturas apresentam cristais maiores que as sintetizadas a baixas temperaturas [14].

Na tentativa de esclarecer o papel da hidroxiapatita no crescimento ósseo, grânulos cerâmicos densos e porosos de HA foram implantados em cães. O objetivo foi analisar se ela apresentava-se também como um suporte ao osso em crescimento ou se possuía apenas uma função ativa. Demonstrou-se então que os implantes de cerâmica porosa influenciavam de maneira ativa a osteogênese [15].

Três diferentes materiais (esponja de colágeno, cristais de HA e uma mistura de colágeno com cristais de HA) foram comparados quanto a fatores que induzem a uma melhor calcificação da matriz implantada e sua interação com células do osso. Observou-se que a combinação entre colágeno e HA produziram uma matriz calcificada que muito se assemelha ao tecido ósseo [16].

Estudos sobre HA com poros interligados por polarização elétrica demonstraram que a HA fracamente interligada proporcionou um maior desenvolvimento ósseo quando comparada a HA interligada fortemente. Isso se deve a facilidade de penetração das células osteogênicas no interior de seus poros. Também constatou-se que a polarização das hidroxiapatitas em implantes se comporta como um acelerador do crescimento ósseo, devido ao aumento na osteocondutividade [17].

2.1.2 Hidroxiapatita carbonatada (HAC)

A fórmula química da hidroxiapatita contendo carbonato (HAC) é formalmente representada por $\text{Ca}_{10-x/2}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x][(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y]$, mantendo-se sua eletroneutralidade [18]. É conhecido que o íon CO_3^{2-} pode substituir dois sítios na HA, sendo no sítio do íon OH^- e/ou no sítio do PO_4^{2-} , denominados de sítio A e B, respectivamente. A substituição desses íons causa alterações notáveis em sua estrutura fazendo com que a HAC se torne um biomaterial mais eficaz que a HA apresentando menor cristalinidade, aumento da solubilidade e mudanças na morfologia dos cristalitos [19].

Estudos comprovam que a HAC vem se mostrando como a melhor alternativa para implantes ósseos biorreabsorvíveis [13]. Testes realizados mostraram que a HAC apresenta maior biocompatibilidade e osteocondução quando

comparada com a HA empregada como controle [1]. A HAC apresenta maior reabsorção que a HA, o que lhe confere uma melhor aplicação em enxertos [5].

Com hidroxiapatita carbonatada, foram produzidos materiais porosos por meio de impregnação de esponjas de celulose com o pó de HAC, chegando a uma estrutura semelhante a morfologia do osso, a qual favorece o crescimento ósseo [1].

Stigter e colaboradores, relatam sobre implantes de Titânio recobertos por HAC em conjunto com antibióticos, objetivando-se prevenir infecções pós cirúrgicas e facilitar a integração implante-osso. Foi observado que antibióticos contendo grupos carboxílicos se incorporaram melhor aos revestimentos de HAC, provocando uma liberação mais lenta na região cirúrgica e conseqüentemente maior eficiência no tratamento, devido ao tempo prolongado de ação do mesmo [20].

Em osteotomias corretivas do rádio, a HAC substituiu com eficiência enxertos ósseos da crista íliaca (osso do quadril), eliminando o dano causado à área doadora comprovando-se a eficácia deste material como biocimento quando utilizados simultaneamente com materiais de fixação no apoio do osso [21].

2.2 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP), é um dos componentes do sangue que pode ser obtido do próprio paciente. As plaquetas podem ser separadas dos componentes do sangue pelo princípio da separação celular. Atualmente utiliza-se o método da centrifugação diferencial e os componentes não utilizados na preparação do PRP podem ser devolvidos ao mesmo doador [22]. No processo de obtenção do PRP é realizada uma punção venosa no paciente para retirar o sangue (Vide Anexo A) [22].

O PRP é um recurso terapêutico que tem despertado interesse da medicina regenerativa, devido ao grande potencial em acelerar a cicatrização e a regeneração do tecido ósseo. Os polipetídeos, fatores de crescimento contidos no PRP, atuam na comunicação intercelular, controlando o destino da célula e tendo como principal função, auxiliar o ciclo celular [7]. Dentre os mais importantes na reparação dos tecidos, devemos destacar o fator de crescimento transformador tipo

beta1 (TGF- β 1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento epitelial e o fator de crescimento fibroblástico, entre outros [23].

O conjunto de plaquetas autólogas que formam o PRP são utilizadas para acelerar a recuperação da lesão, imitando as formas naturais de cura e acelerando a recuperação do tecido em si. A recuperação vai desde a remoção de células mortas e produção de novas células na região afetada até a produção de novas estruturas vasculares [23].

A principal razão para a utilização do PRP na regeneração, deriva da hipótese que ele irá aumentar a concentração local dos fatores de crescimento e irá fazer da fibrina uma estrutura de suporte para o desenvolvimento do tecido endógeno [7].

De La Mata, estudando a aplicação do PRP, constata a eficiência do mesmo em tratamentos de recuperação óssea e em cirurgias de implantes ortodônticos, porém, afirma não haver estudos suficientes quanto a sua eficiência para outros tipos de tratamentos clínicos [24]. Pacientes tratados com PRP, após a cirurgia de extração do terceiro molar, apresentaram uma recuperação menos agressiva e mais rápida em relação ao grupo controle, demonstrando a eficácia da aplicação do gel de PRP [25].

Apesar dos estudos realizados, ainda existem controversas sobre a eficácia do PRP, todavia uma revisão da literatura demonstrou que isso se deve a uma série de fatores que vão desde seu emprego incorreto até mesmo sua produção inadequada, os quais atuam portanto como um falso PRP [26].

2.3 ENXERTOS COMBINADOS COM PRP

2.3.1 HA + PRP

Silva e colaboradores, em seus estudos acompanharam a reabilitação de cães submetidos a processos cirúrgicos no rádio [27]. Foram realizados implantes com HA sintética no rádio esquerdo e com a combinação HA + PRP no rádio direito.

Na experiência se evidenciou uma melhor formação do calo ósseo no período pós-operatório entre 15 e 60 dias no grupo tratado com a combinação HA + PRP [27].

No tratamento para defeitos ósseos periodontais, foi realizado um estudo abrangendo a combinação HA + PRP, como grupo de teste, e uma combinação de HA + solução salina, utilizada como grupo controle. Após 12 semanas, apesar dos resultados apontarem para melhoras clínicas em ambos os grupos, pode-se notar que o grupo de teste, HA + PRP, apresentou mudanças estatísticas significantes dos parâmetros clínicos em relação ao grupo controle [28].

Buscando-se evidenciar as propriedades regenerativas do PRP, utilizou-se em cirurgias de levantamento de sinu (seio maxilar), em mini-porcos, uma combinação de HA + PRP de um lado, e apenas HA de outro. Foi constatado crescimento ósseo no lado enxertado com HA nas primeiras semanas, porém, após 12 semanas, o lado contendo PRP apresentou um crescimento consideravelmente maior [29].

2.3.2 Implantes e/ou Enxertos com PRP

Quando o PRP é adicionado ao material de enxerto, age como um adesivo biológico natural, unindo as partículas e facilitando a manipulação durante a cirurgia de enxerto [30]. Barbosa e colaboradores, através de enxertos realizados em falhas geradas por processos cirúrgicos na tíbia de cães, analisaram a recuperação destes por meio de lesões tratadas com: a) enxerto ósseo, b) (PRP) + enxerto ósseo autógeno e c) apenas PRP. Na ocasião constatou-se que o enxerto ósseo autógeno associado ao PRP apresentou áreas com radiodensidade mais uniformes e semelhante ao osso receptor quando comparado aos demais enxertos, demonstrando assim, maior incorporação do material enxertado [31].

Devido a semelhança com os humanos quanto a regeneração óssea, utilizou-se como cobaias mini-porcos para avaliar a combinação de enxerto esponjoso autólogo na cicatrização de defeitos ósseos em estado crítico. O grupo controle foi tratado com enxerto esponjoso autólogo, e o grupo teste, foi tratado com enxerto autólogo esponjoso combinado com PRP. Na ocasião constatou-se que o grupo de teste apresentou regeneração óssea significativamente melhor [32].

Com o intuito de melhorar as cirurgias corretivas do ligamento cruzado anterior, testou-se enxertos combinados com PRP em cirurgias reconstrutivas do ligamento. Comprovou-se que o PRP promoveu a revascularização e reinervação na área tratada após a cirurgia reconstrutiva [33].

Scaranto [34] em sua monografia de especialização em periodontia, avaliou a utilização do PRP em cirurgias orais e a sua capacidade de possibilitar uma osteogênese mais rápida. Se concluiu que o uso do PRP associada aos enxertos ósseos particulados visa uma formação óssea mais rápida, facilitando a instalação mais precoce dos implantes [34]. Uma melhor estabilidade na fixação dos implantes se nota quando se utiliza implantes odontológicos com diâmetro maiores, e principalmente quando se irriga a região com PRP durante o processo cirúrgico [35].

No tratamento cirúrgico da sinusite frontal crônica, avaliou-se a possibilidade em se usar uma combinação entre PRP e fragmentos ósseos autólogos na calota craniana. Uma mistura composta por 40% de enxerto ósseo e 60% de PRP demonstrou-se como um procedimento seguro e com resultados satisfatórios na regeneração [36].

Um estudo para quantificar o efeito do PRP em enxertos de osso autógeno da maxilar sinusal em coelhos, apresentou uma diferença significativa no grupo tratado com PRP entre 2 e 4 semanas quando comparado ao grupo tratado com enxerto ósseo sem PRP [37].

3 JUSTIFICATIVA

O custo elevado e a dificuldade na realização de implantes vêm abrindo campo para a pesquisa em novos materiais que possam aumentar a eficiência, reduzir os custos e beneficiar os pacientes na recuperação pós-cirúrgica, como é caso da HAC e do PRP. Neste sentido os cirurgiões estão constantemente procurando maneiras de melhorar os implantes, seja com osso autógeno, ou seja na busca por métodos alternativos [26], [30].

Alguns materiais já vinham sendo usados há tempos nas cirurgias de enxertos, como é o caso do tecido adiposo autógeno. Porém, esse tipo de implante apresenta desvantagens como o longo tempo gasto na cirurgia e o risco de serem reabsorvidos. Visando evitar estes tipos de problemas, tem-se estudado o uso de outros materiais exógenos, como é o caso da HA [36]. Muitos trabalhos já foram realizados utilizando-se a HA na forma cristalina apresentando duas fases. Porém, a HAC nanométrica, que mais se assemelha a composição natural dos ossos, ainda não vem sendo comercializada.

O PRP, por ser de natureza autóloga, tem sido uma das alternativas mais atraentes como agente regenerativo, pois não apresenta riscos de alergias ou reações de rejeição, além de não acrescentar custos significativos às cirurgias de implantes [32]. O PRP também proporciona uma fonte rica e de fácil obtenção para um diversificado grupo de fatores de crescimento celular, o qual tem sido utilizado como suporte estrutural na regeneração dos tecidos [36], [37].

Neste trabalho utilizou-se nos implantes uma amostra sintética de Hidroxiapatita Carbonatada nanométrica. A introdução do carbonato nas amostras induz alterações estruturais e morfológicas na estrutura, se comparada com a Hidroxiapatita estequiométrica (HA) atualmente utilizada em diversos enxertos. Tais alterações trazem amplos benefícios quando comparada a HA, como por exemplo a diminuição no tamanho dos cristalitos, assemelhando-se aos do osso humano, e aumentando a sua solubilidade. Desta forma resulta em uma HAC próxima em composição e cristalinidade com a parte inorgânica do osso humano, facilitando sua absorção pelo organismo.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a influência do PRP na capacidade de osteogênese da HAC em fraturas críticas induzidas na fíbula de ratos. Como objetivos específicos temos:

- a) Sintetizar HAC nanométrica com 6% de carbonato;
- b) Caracterizar a HAC;
- c) Obter o PRP;
- d) Implantar o material obtido em ratos, e verificar a influência do PRP na HAC.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA CARBONATADA (HAC)

A HAC (com 6% de carbonato) foi obtida por precipitação utilizando soluções aquosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, e $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. A variação de temperatura e o pH foram rigorosamente controlados, sempre mantendo-se o pH básico. Após a adição, a suspensão ficou em agitação e o precipitado foi lavado e filtrado [19].

O processo de obtenção deste material foi depositado na patente BR 10 2015 011732 9 [38].

5.2 OBTENÇÃO DO PRP

Na realização das cirurgias foram utilizados ratos doadores e foram coletados as quantidades de sangue descritas na tabela 1. Os animais foram anestesiados com medicação idêntica e em mesma proporção descritas para o procedimento cirúrgico (tópico 5.5). A coleta foi realizada por punção direta no coração do animal, utilizando-se uma seringa de 10,0 mL com agulha 25 x 7 mm como se vê na figura 1. Foram utilizados 17 animais durante as tentativas de obtenção do PRP para adequar ao melhor procedimento. As velocidades de centrifugação assim como os resultados obtidos durante os testes encontram-se resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Testes realizados para obtenção de PRP com velocidade e tempo de centrifugação.

Qtde de animais	Centrifugação		Observações
	rpm	Tempo(min.)	
1	2000	10	Não ocorreu separação celular
1	2100	12	Não ocorreu separação celular
3	2400	10	Separação celular sem formação de PRP
1	2400	15	Não ocorreu separação celular
1	2500	10	Não ocorreu separação celular
7	2800	10	Separação celular sem formação de PRP
2	3000	10	Obtenção de PRP
1	3800	10	Separação celular sem formação de PRP

Fonte: Do autor.



Figura 1 - Punção cardíaca.

Fonte: Do autor.

Logo após a punção, o sangue foi transferido para um Tubo Falcon, com tampa, sem anti-coagulante. Na série centrifugada a 3000 rpm durante 10 min., ocorreu a separação das células vermelhas vistas na camada inferior, do plasma pobre em plaquetas (PPP) na camada superior e do plasma rico em plaquetas (PRP) na camada intermediária como se observa na figura 2.

A porção intermediária correspondente ao PRP foi retirada e acrescentada ao tubo junta com a HAC utilizado no enxerto.



Figura 2 - Separação entre plasma e hemácias.
Fonte: Do autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para a caracterização da HAC obtida, foram realizadas medidas de análise térmica (TG), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV), difração de raios X (DRX) e análise elementar (CHN) com o objetivo de caracterizar e avaliar a qualidade do material. Todo o trabalho foi realizado nas instalações da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

5.3.1 Análise térmica (TG)

Para obtenção da curva termogravimétrica foi utilizado o equipamento EXSTAR SII TG/DTA 7300, utilizando cadinho de alumina com aproximadamente 20,594 mg de amostra. A medida foi realizada a uma razão de aquecimento de 10 °C/min iniciando-se em temperatura ambiente (aproximadamente 27 °C) até 1100 °C, empregando-se gás nitrogênio a um fluxo de 50 mL/min.

5.3.2 Espectroscopia vibracional na região do infra vermelho (IV)

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma ferramenta importante na avaliação qualitativa e até mesmo semiquantitativa para identificação dos grupos inorgânicos presentes na amostra. Os resultados são obtidos através das bandas de absorção relativas às frequências de ligações dos átomos que compõe a amostra.

Para se obter os espectros vibracionais utilizou-se o espectrômetro Thermo Scientific IS 50 FT – IR, com contato direto da amostras sobre o cristal (feixe de infravermelho), com resolução de 4 cm^{-1} e varredura entre 4000 e 400 cm^{-1} .

5.3.3 Análise elementar (CHN)

A obtenção dos teores de carbono foi realizada com equipamento da Leco Instrumentos LTDA, modelo Truspec CHNS–O. A amostra foi analisada em triplicata, aquecida em forno até 1085 °C, utilizando-se as seguintes massas em mg: 1,5920; 1,5770; 1,5740. Utilizou-se como padrão uma amostra de Hidroxiapatita estequiométrica.

5.3.4 Difração de Raio X (DRX)

Nas medidas de difração foi utilizado o difratômetro Rigaku ULTIMA IV. A varredura foi realizada em ângulo de 2θ em um intervalo entre 10° e 90° graus com passo de $0,02^\circ$ e tempo de 2 s por passo. A radiação utilizada foi de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e o padrão utilizado para obter os parâmetros instrumentais foi hexaborato de lantânio. A amostra em pó, foi refinada utilizando-se o método de Le Bail, por meio do programa Fullprof [39].

5.4 APLICAÇÃO EM RATOS

Na realização deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos adultos (acima de 60 dias de vida), com média de 260 g para os utilizados em cirurgias de enxertos, e com média de 280 g para os animais utilizados na punção sanguínea. Todos foram obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL MG). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados nas instalações da própria Universidade.

Os animais foram alimentados com ração própria para roedores e receberam água filtrada. Todos os animais receberam comida e a água a vontade. No pós-operatório foram todos mantidos em caixas individuais de polipropileno, autoclaváveis e em ambiente com temperatura e humidade controladas. A temperatura foi mantida em torno de 22°C e a humidade média foi de 50 % (com variação de $\pm 6\%$). Obedeceu-se o ciclo claro-escuro de 12 horas.

O trabalho foi realizado observando-se todos os cuidados necessários que se propõe a minimizar o sofrimento dos animais, seguindo a Lei 11.794 de Outubro de 2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas (vide anexo A e B).

Todas as cirurgias foram realizadas com o animal totalmente anestesiado e a eutanásia, como recomendado pela resolução 714 de Junho de 2002 do

Conselho Federal de Medicina Veterinária, foi realizada por sobredose de anestésico ou exsanguinação com sedação prévia.

5.4.1 Experimentos realizados com animais

Para os testes foi feita a remoção cirúrgica de uma parte do osso, de tamanho crítico (retirada de aproximadamente 0,5 cm), na fíbula esquerda do animal. Os animais foram divididos em:

- a) grupo controle: 5 ratos com fratura de tamanho crítico (FTC) e 5 ratos com tubo vazio (TbV);
- b) grupo experimental: 5 ratos com enxerto de HAC, 9 ratos com enxertos de HAC+PRP, 3 ratos com HAC+crem e 3 ratos com HAC+PRP+cremofofor.

A figura 3 apresenta um resumo dos grupos de animais pesquisados.

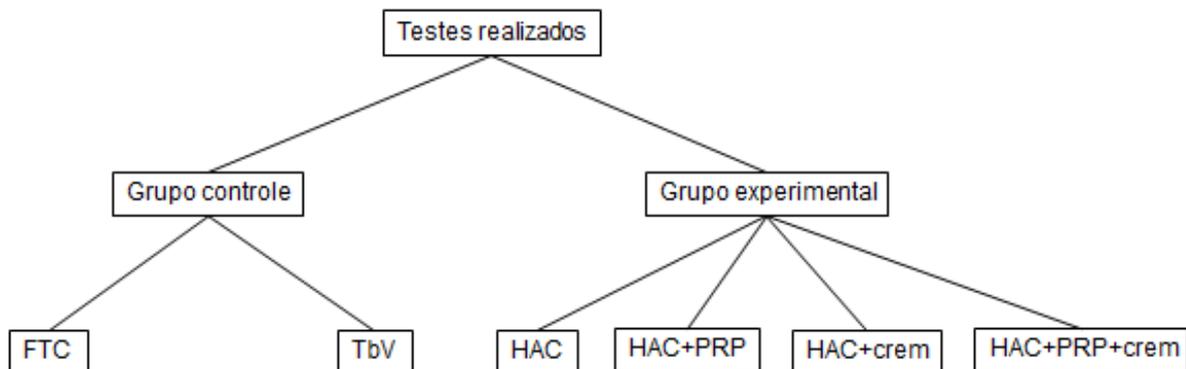


Figura 3 - Grupos avaliados durante o experimento: grupo controle (fratura de tamanho crítico e tubo vazio), grupos com enxerto de HAC, HAC + PRP, HAC + cremofofor, HAC+ PRP+cremofofor.

Fonte: Do autor

Para o grupo controle, nos ratos com fratura de tamanho crítico, retirou-se aproximadamente 0,5 cm da fíbula e suturou-se a incisão. Nos ratos com tubo vazio implantou-se aproximadamente 1,0 cm de tubo vazio. Para o grupo de ratos com enxertos de HAC implantou-se um tubo preenchido completamente com HAC em pó previamente esterelizada. No grupo HAC+crem implantou-se um tubo com uma mistura de HAC e cremofofor, no grupo HAC+PRP+crem foi utilizado um tubo contendo HAC, PRP e cremofofor. Em todos os animais utilizou-se o mesmo tipo de

tubo esterilizado, que como mostrado no grupo controle, não influencia no processo de desenvolvimento do tecido ósseo.

Pelo fato da HAC ser uma material hidrofóbico e não se misturar bem com o PRP, durante os experimentos optou-se por testar uma mistura utilizando o solvente orgânico Cremofor. O Cremofor é um agente solubilizador e emulsificador muito utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia. Este tem sido muito utilizado em preparações de emulsão de óleo em água e produzindo emulsões estáveis [40]. Em todos os casos em que a mistura foi utilizada obteve-se uma pasta consistente de fácil manuseio e que preencheu melhor o tubo utilizado no implante. Notou-se que em todos os implantes onde o cremofor foi utilizado ocorreu formação de tecido ósseo sem afetar o processo de osteogenese.

5.5 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na UNIFAL – MG. Os animais foram pesados e anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura 1:1 de Dopalen (cloridrato de ketamina) e Anasedan (cloridrato de xilazina) na dose 1,0 mg/kg, utilizando uma seringa de 1,0 mL com agulha número 13 x 4,5 mm.

No procedimento cirúrgico foi feita uma incisão de aproximadamente 2,0 cm de comprimento na pata esquerda como é mostrado na figura 4, e seccionou-se a região central da fíbula retirando-se aproximadamente 0,5 cm de osso. A incisão foi feita utilizando-se lâmina de aço carbônico nº 11 até a exposição da fíbula. O corte da fíbula foi feito utilizando-se tesoura cirúrgica reta de ponta fina.



Figura 4 - Rato depilado e assepciado para início da cirurgia.
Fonte: autor.

Para o enxerto foi utilizado um tubo preenchido de acordo com o grupo a que pertenciam. No pós operatório os animais foram mantidos em caixas individuais para evitar o contato entre eles. Não foi administrado nenhum tipo de medicamento, os animais foram acompanhados diariamente e a higienização das caixas, alimentação e troca de água foram feitas regularmente.

Os animais participantes do experimento foram anestesiados de acordo com protocolo já descrito e submetidos a eutanásia depois de 40 ou 60 dias de pós operatório

5.6 RADIOGRAFIAS

Todos os animais foram radiografados de maneira padronizada para se analisar o desenvolvimento do tecido ósseo na fratura. Utilizou-se aparelho de RX posicionado sempre a uma distância de aproximadamente 20 cm da pata do animal.

A tabela 2 apresenta o número de animais operados e a variação de tempo, em dias, até a realização das radiografias e do sacrifício.

Tabela 2 - Número de animais operados com seu devido implante e o tempo esperado para realização das radiografias e do sacrifício.

Qtd. ratos	Implante	RX₁ Dias [Quantidade de animais]	RX₂ Dias [Quantidade de animais]	Sacrifício Dias [Quantidade de animais]
5	FTC	-	40[5]	40[5]
5	TbV	-	40[5]	40[5]
5	HAC	20[5]	40[5]	40[5]
3	HAC+crem	-	40[3]	40[3]
9	HAC+PRP	20[8] 30[1]	- -	60[5] 80[3] 200[1]
3	HAC+PRP+crem	-	40[3]	40[3]

Fonte: Do autor.

Na tabela 2 observa-se que todos os animais do grupo controle foram radiografados com 40 dias, e que no grupo experimental o tempo de realização das radiografias variou de acordo com o tipo de implante, tendo-se animais radiografados com 20, 30 e 40 dias.

5.7 MICROSCOPIA

O objetivo é identificar a espécie de tecido encontrada dentro do implante e comprovar ou não se houve crescimento de tecido ósseo. No processo de confecção das lâminas as amostras retiradas dos implantes foram fixadas em paraformoldeído a 4% em tampão fosfato, em seguida foram encaminhadas para o processamento, passando pela desidratação com álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Na sequência, os blocos foram cortados em micrótomo rotativo e submetidos à coloração com azul de toluidina e fucsina básica.

As imagens foram geradas com aumento de 10 ou 40 vezes. Com a identificação do tecido encontrado dentro dos implantes após a análise das micrografias, confirmou-se a ocorrência de osteogênese nos implantes em questão.

O objetivo da microscopia é comprovar o que já havia ficado evidente nas radiografias.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA:

6.1.1 Análise térmica (TG)

A análise da curva termogravimétrica obtida (figura 5) confirma que a amostra perde água não estrutural entre 100 e 200 °C. É possível identificar que ocorre uma perda de massa entre os valores de 700 a 800 °C, que pode ser atribuído à saída do carbonato no sítio do fosfato [41]. Esta transformação sugere que o CO_3^{2-} pode ter substituído o PO_4^{3-} como esperado. Até 1100 °C não foi observada a total decomposição da HAC.

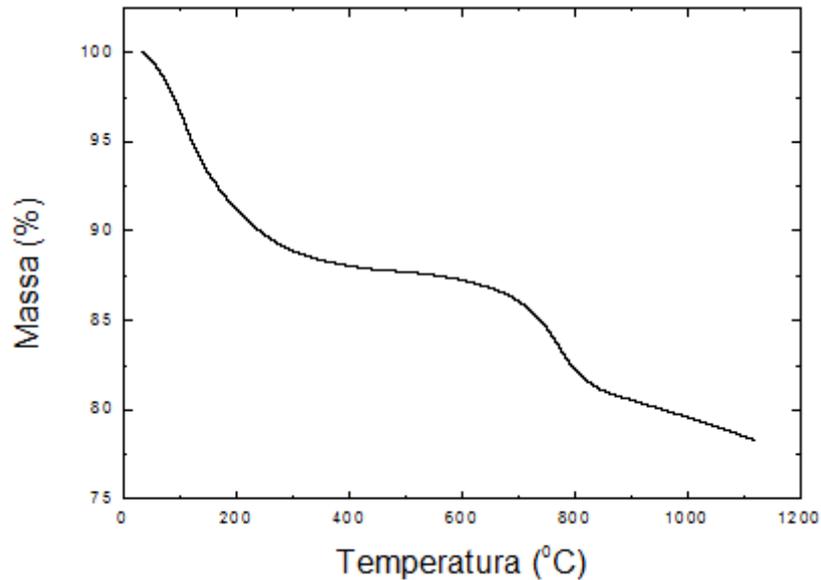


Figura 5 - Curva termogravimétrica obtida para amostra HAC
Fonte: Do autor.

6.1.2 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV)

A análise dos espectros foram feitas de acordo com as bandas de absorção obtidas na literatura resumidas na tabela 3 [42].

Tabela 3 - Bandas de absorção no FTIR dos grupos que compõe a amostra HAC.

Região de absorção (cm ⁻¹)	Designação
3580	ν_5 estiramento OH de hidroxila
3400	ν_5 estiramento OH de H ₂ O
1645	deformação H-O-H de H ₂ O
1470 – 1420	ν_1 estiramento simétrico de CO ₃ ²⁻
1128	ν_6 estiramento PO ₃ ⁴⁻
1100, 1093, 1047	ν_3 estiramento assimétrico de PO ₄ ³⁻ ou ν_6 estiramento PO ₃ em HPO ₄ ²⁻
965	ν_1 estiramento simétrico PO ₄
918	ν_3 estiramento P-OH em HPO ₄
884	ν_2 estiramento antissimétrico de CO ₃ ²⁻
650	Vibrações OH de hidroxila
616, 581	ν_4 Deformação O – P – O em PO ₄ ³⁻ ou em HPO ₄ ²⁻
535	ν_7 Estiramento P – OH em HPO ₄ ²⁻

Fonte: Oliveira, S. V. et.al. (2010).

A figura 6 mostra o resultado da espectroscopia vibracional na região do infravermelho obtido para a amostra HAC com as respectivas bandas de absorção identificadas. A banda de absorção na região próxima a 3500 cm⁻¹ corresponde ao estiramento assimétrico ν_5 de OH da hidroxila e a banda próxima a 1750 cm⁻¹ foi atribuída aos estiramento assimétrico de OH correspondente ao H₂O.

A banda próxima a 1400 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento simétrico ν_1 do CO₃²⁻ substituído no sítio do fosfato e a banda de absorção próxima a 880 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento antissimétrico ν_2 do grupo CO₃²⁻ no sítio da hidroxila. As bandas próximas a 1000 cm⁻¹ e 550 cm⁻¹ foram atribuídas ao grupo PO₄³⁻.

6.1.3 Análise elementar (CHN)

Assumindo que todo o carbonato inserido esteja no sítio do PO_4^{3-} , sugere-se que a fórmula molecular da amostra analisada seja $\text{Ca}_{9,08}(\text{PO}_4)_{5,08}(\text{CO}_3)_{0,92}(\text{OH})_{1,08}$. A mesma apresenta um teor calculado em 1,201 % de carbono, correspondente aos 6 % de carbonato em sua composição. Os resultados da análise elementar apresentaram, de acordo com a média dos valores em triplicata, um teor de aproximadamente 1,044 % de carbono, sendo um valor dentro do esperado para uma HAC com 6% de carbonato. A tabela 4 apresenta os valores em porcentagem de carbono obtidos da análise elementar, assim como a média obtida entre os valores.

Tabela 4 - Resultado da análise elementar para a amostra HAC apresentando os teores de carbono fornecido pelo aparelho, o teor de carbono teórico da amostra e a média dos valores experimentais.

*MM amostra	% C teórico	% C experimental	% médio experimental de C
919,95 g/mol	1,201	1,065 1,023 1,044	1,044

* MM: Massa Molar.

Fonte: Do autor.

De acordo com a estequiometria, a amostra com o teor de carbono obtido experimentalmente, apresenta aproximadamente 5,22 % de carbonato em sua composição, aproximando-se dos 6% desejado para a amostra HAC. Destaca-se que a temperatura atingida no forno do equipamento não foi suficiente para decompor toda a amostra.

6.1.4 Difração de raio x (DRX)

Do resultado do refinamento, se obteve o tamanho médio aparente dos cristalitos, o grupo espacial ao qual pertence a amostra, os parâmetros de cela e os fatores de concordância, indicativos da qualidade do refinamento. Na tabela 5 mostra-se um resumo destes valores obtidos do refinamento.

Tabela 5 – Resultado do refinamento obtido pelo programa Fullprof.

Grupo espacial	Tamanho do cristal (Å)	Chi ²	R _P (%)	R _{WP} (%)	Parâmetros de cela (Å)	
					a,b	c
P6 ₃ /m	61,80	1,66	8,06	10,60	9,418 ± 0,002	6,913 ± 0,002

Fonte: Do autor

A figura 7 apresenta o difratograma resultante do refinamento da amostra pelo programa Fullprof [38].

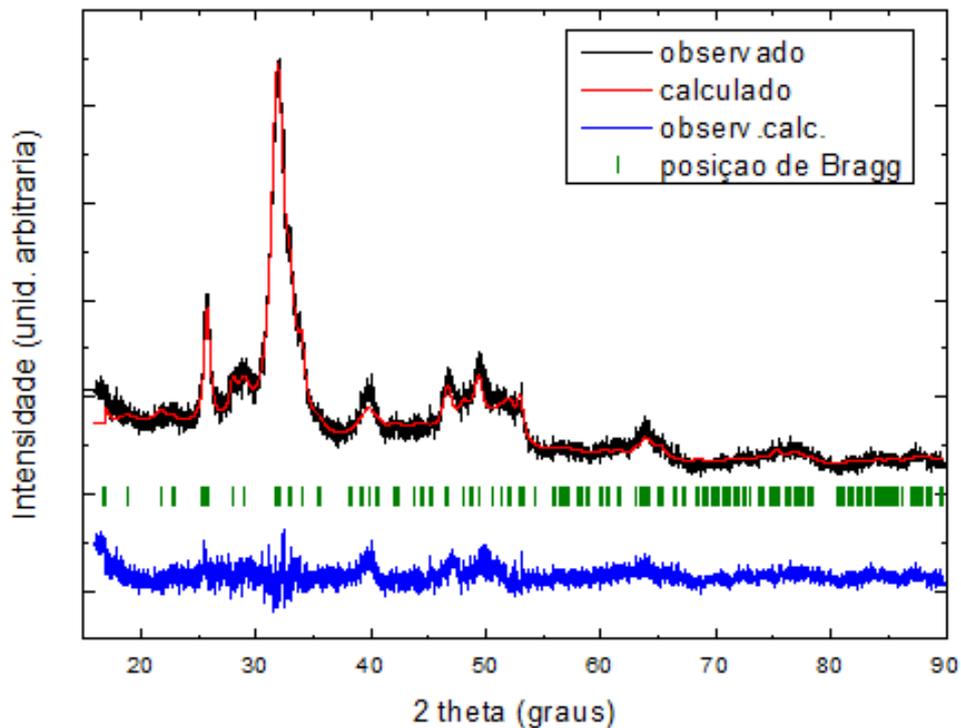


Figura 7 - Difratograma resultante do refinamento da amostra HAC utilizando o programa FullProf.

Fonte: Do autor

6.1.5 Radiografias:

Foram avaliadas radiografias nos períodos de 20, 30 e 40 dias do pós operatório tentando-se identificar em cada um dos grupos a presença de tecido ósseo recém formado. Para esta avaliação os animais foram divididos nos grupos A, B e C, onde :

A = ausência de tecido ósseo

B = formação de tecido

C = tecido ósseo

Na tabela 5 pode-se ver um resumo do resultado obtido no crescimento ósseo dos animais estudados com suas respectivas classificações. Os números entre colchetes correspondem a quantidade de animais em cada caso.

Tabela 6 – Resultados obtidos pelas radiografias realizadas nos grupos controles e nos grupos com enxertos após 20, 30 e 40 dias pós operatório.

Tipo de Implante	RX Dias [Quantidade de animais]	Classificação [Quantidade de animais]
FTC	40 [5]	A [5]
TbV	40 [5]	A [5]
HAC	20 [4] 40 [5]	B [4] C [5]
HAC + crem	40 [3]	C [3]
HAC+PRP	20 [3] 30 [1]	A [1], B [2], C [1]
HAC + PRP + crem	40 [3]	A [1], C [2]

Fonte: Do autor.

Para o grupo controle (fratura e tubo vazio), as radiografias avaliadas com 40 dias de pós operatório, não apresentaram nenhuma espécie de formação de tecido ósseo, sendo ambos classificados como A.

O grupo HAC apresentou 4 radiografias classificadas como B, atribuídas ao curto período de tempo para a absorção da HAC (RX de 20 dias), e 5 radiografias com classificação C (RX de 40 dias).

O grupo HAC + PRP apresentou 1 radiografia com classificação A (RX de 20 dias), que foi atribuído ao deslocamento do implante logo após a cirurgia, conforme mostra a figura 8, 2 radiografias classificadas como B (RX de 20 dias) e 1 classificada como C (RX de 30 dias).

O grupo HAC + crem apresentou 1 radiografia classificada como A, atribuída a um processo inflamatório ocorrido durante a regeneração do tecido, conforme mostrou a microscopia do tecido (figura 13) e 2 radiografias com classificação C.

No grupo HAC + PRP + crem todas as radiografias são pertencentes ao grupo C sendo constatado uma boa formação do tecido ósseo em todos os implantes.



Figura 8 - Animal do grupo HAC+PRP.
Radiografia mostrando o deslocamento do implante 20 dias após a cirurgia.
Fonte: Do autor.

Considerando-se a classificação B, na qual visualiza-se pouco crescimento de tecido ósseo, a transformação da HAC em tecido ósseo pode ser observada em 5 animais do grupo HAC em 3 animais do grupo HAC + PRP, em 2 animais do grupo HAC + crem e em 3 animais do grupo HAC + PRP + crem. Com exceção do grupo controle, onde não se nota desenvolvimento de tecido ósseo, em todos os outros a visualização da formação do tecido ósseo é melhor observada nas radiografias com 40 dias em detrimento das radiografias de 20 dias. O que se entende, é que 20 dias, não é tempo suficiente para que ocorra osteointegração ou reabsorção da HAC, porém não se pode afirmar que não ocorre formação de tecido ósseo.

Nas radiografias do grupo controle, só fratura e tubo vazio, com 40 dias de pós operatório, é possível observar a ausência de tecido ósseo (figura 9).

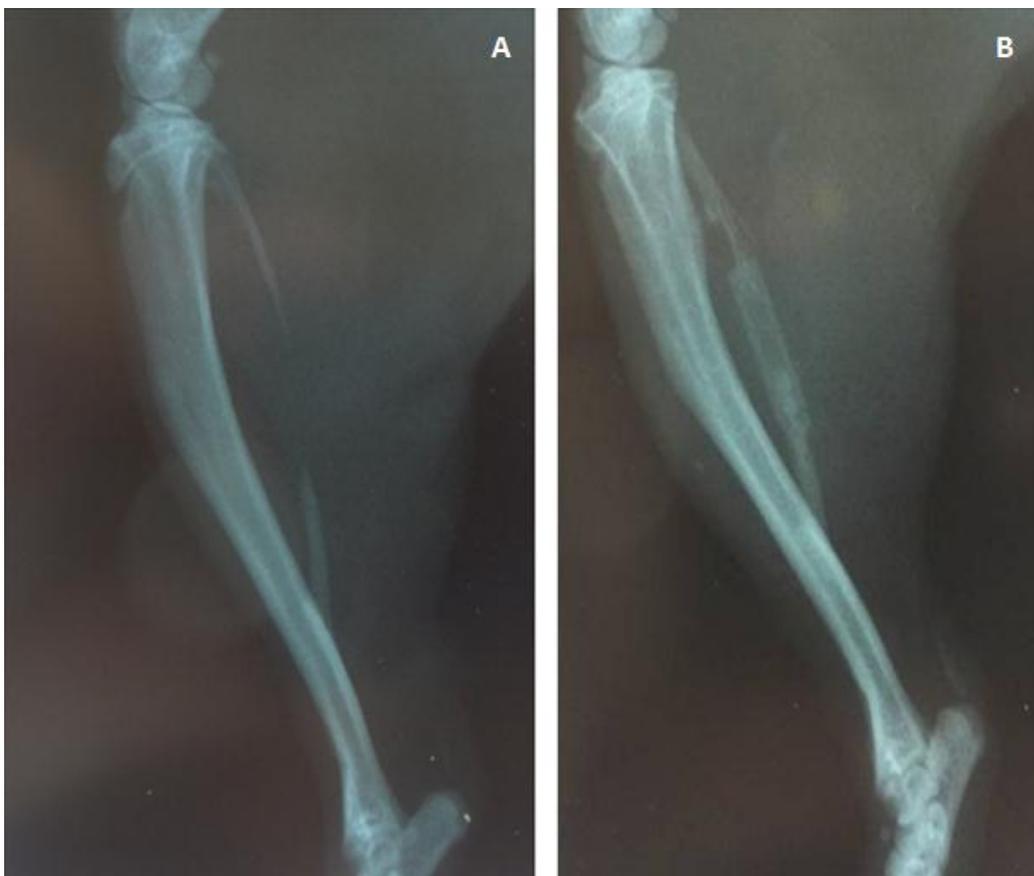


Figura 9 - Radiografia do grupo controle, demonstrando a não formação de tecido ósseo em animais com 40 dias de pós operatório. A = FTC; B = TbV

Fonte: Do autor.

Nas radiografias realizadas com 20 dias de pós operatório, nota-se uma região com baixa formação óssea, como se pode observar na figura 10, que trás radiografias de animais com enxertos de HAC, HAC + crem e HAC + PRP. Nas radiografias realizadas com 40 dias, é possível observar uma região com maior formação óssea dentro dos implantes, como pode ser observado na figura 11 em animais com enxertos de HAC, HAC + PRP + crem e HAC + crem.

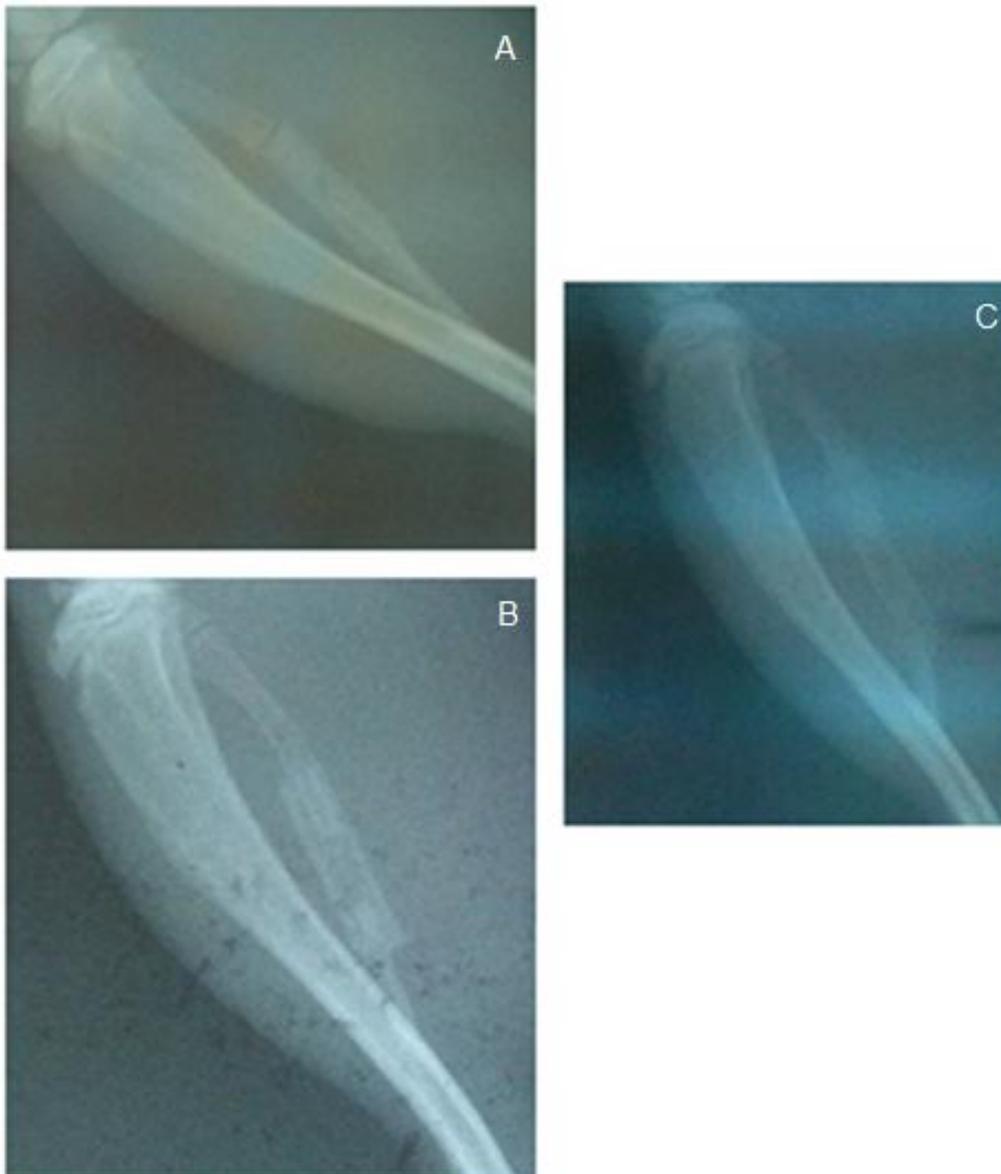


Figura 10 – Radiografia realizada em animais com 20 dias de pós operatório.

A: HAC; B: HAC + Cremophor; C: HAC + PRP.

Fonte: Do autor.



Figura 11 - Radiografia realizada em animais com 40 dias de pós operatório.
A: HAC; B: HAC + PRP + Cremophor; C: HAC + Cremophor

Fonte: Do autor.

A análise feita nas radiografias evidenciou o desenvolvimento de tecido ósseo nos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. Nos animais do grupo fratura de tamanho crítico, ocorreu uma aparente diminuição das extremidades do osso seccionado. Na figura 12 obtida após o sacrifício de um dos animais com 140 dias é possível perceber a total reabsorção do osso na extremidade inferior da fíbula.

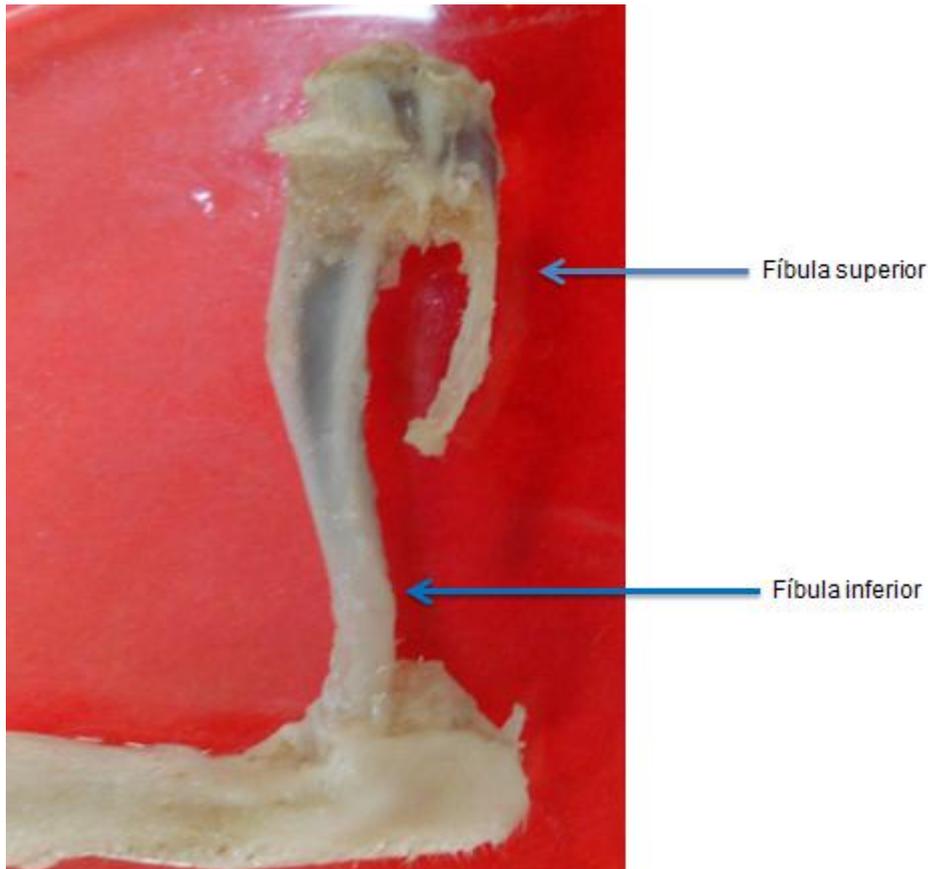


Figura 12 - Reabsorção da extremidade inferior da fíbula. Animal com 140 dias de pós operatório.

Fonte: Do autor.

6.1.6 Microscopia:

A tabela 6 apresenta um resumo do resultado obtido da microscopia, após o sacrifício. As observações foram feitas seguindo a classificação:

F = formação de tecido ósseo;

NF = pouca formação de tecido ósseo.

Tabela 7 – Microscopia obtida para os animais dos grupos HA e HAC+PRP

Implante	Tempo (em dias) microscopia	Observações
HAC	40	F
HAC+PRP	200	F
	60	NF
	60	F
	80	F
	80	F
HAC+PRP+crem	40	F
	40	F
	40	NF
HAC+crem	40	F
	40	F
	40	F

Fonte: Do autor.

De acordo com o resultado, todos os implantes contendo HAC independente de estarem associados ao PRP ou conterem Cremofor em suas misturas, apresentaram boa formação de tecido ósseo, exceto um animal do grupo HAC + PRP + crem, sacrificado com 40 dias, que apresentou um processo inflamatório durante formação do tecido ósseo (figura 13) e um animal do grupo HAC + PRP, sacrificado com 60 dias, cuja mistura HAC + PRP, foi feita com excesso de PRP (Figura 14).

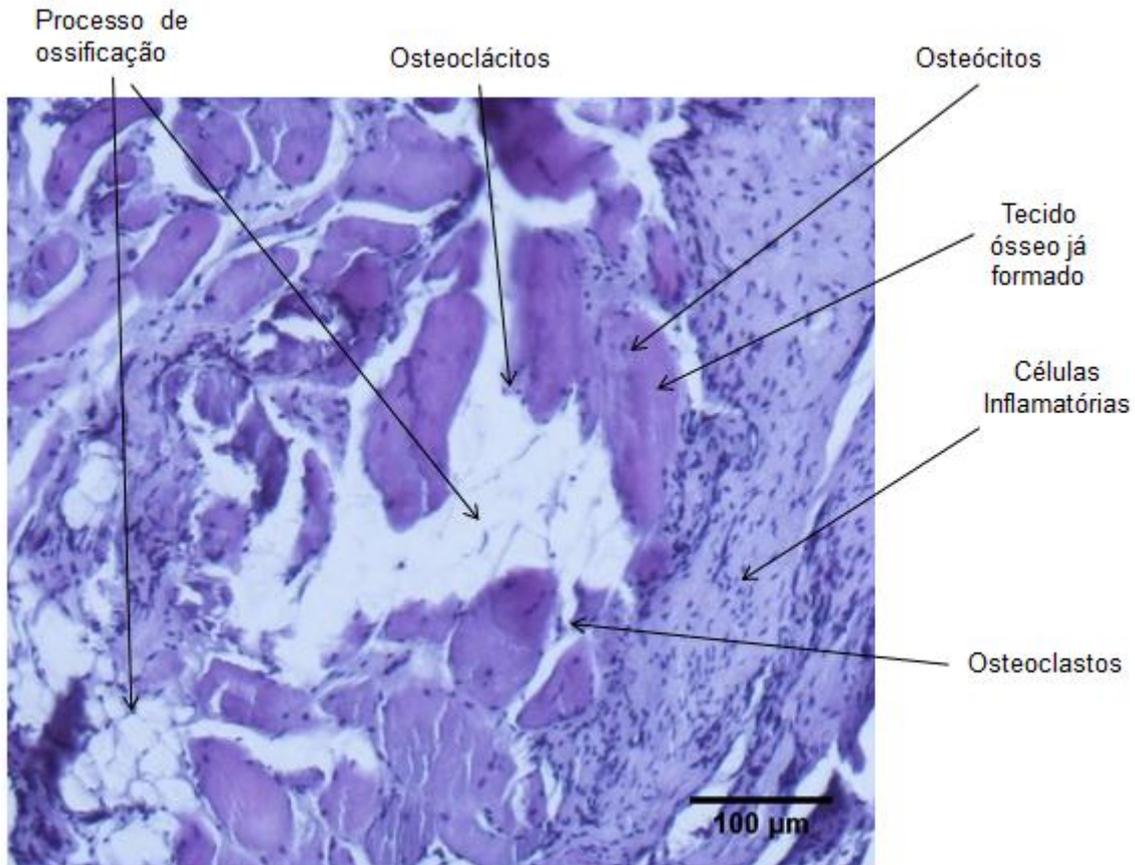


Figura 13 - Implante de 40 dias com processo inflamatório em animal do grupo HAC+PRP+crem mostrando células formadoras de tecido ósseo (osteoblastos, osteoclátos e osteócitos), e células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos)

Fonte: Do autor.

Na figura 13 observa-se uma má formação do tecido ósseo, durante a regeneração (processo inflamatório), onde se observa células escuras, conhecidas por macrófagos, linfócitos, neutrófilos e mastócitos. Pode-se perceber a presença de regiões onde o tecido ósseo já se formou completamente e regiões onde estaria ocorrendo a reabsorção da HAC pelas células formadoras de tecido ósseo (processo de ossificação).

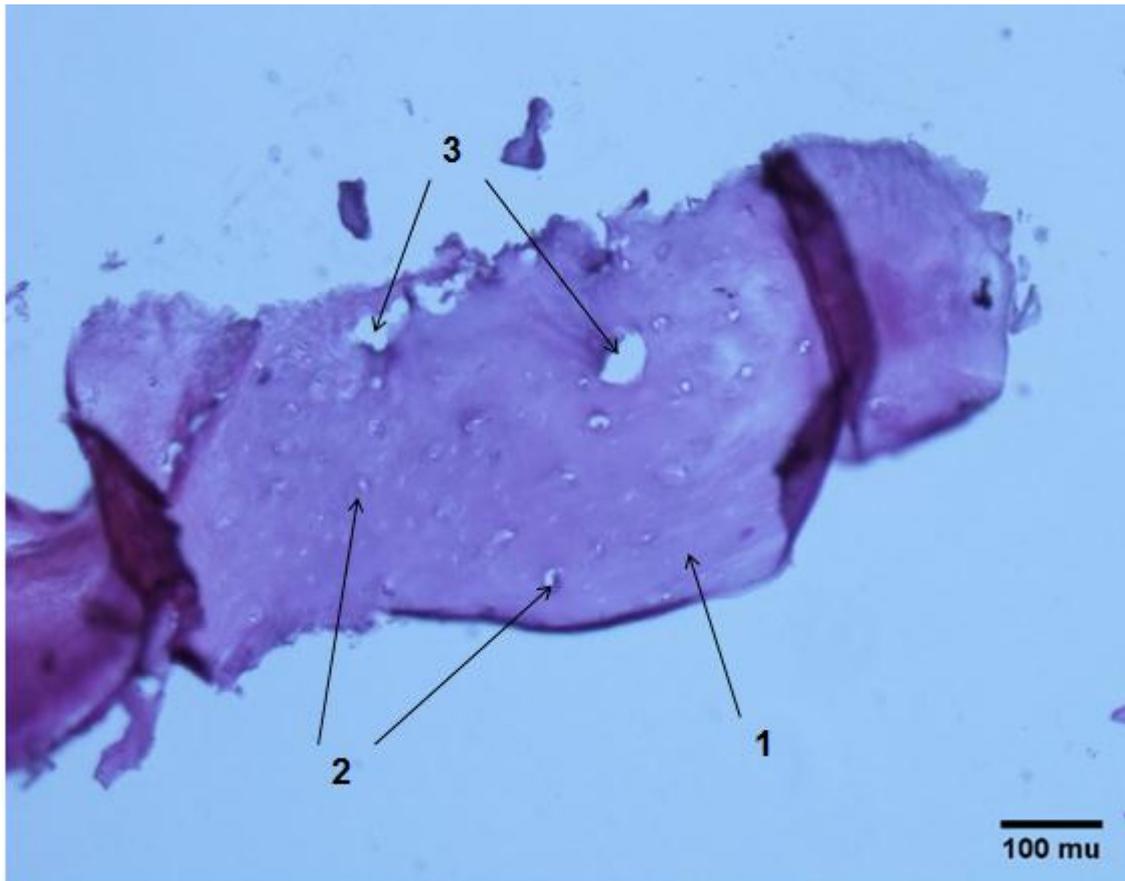


Figura 14 - Micrografia realizada com 40 dias demonstrando a má formação do tecido ósseo.
1 = tecido ósseo formado, 2 = osteócitos, 3 = ausência de tecido.
Fonte: Do autor.

Na figura 14 pode-se ver a micrografia de um animal com enxerto de HAC + PRP, com 60 dias de pós de operatório, onde a mistura se procedeu com um excesso de PRP. Na imagem identifica-se uma pequena região onde ocorreu osteogênese e pode-se notar algumas células formadoras de tecido ósseo (osteócitos). Na imagem também é possível identificar uma enorme região onde não ocorreu nenhuma formação de tecido.

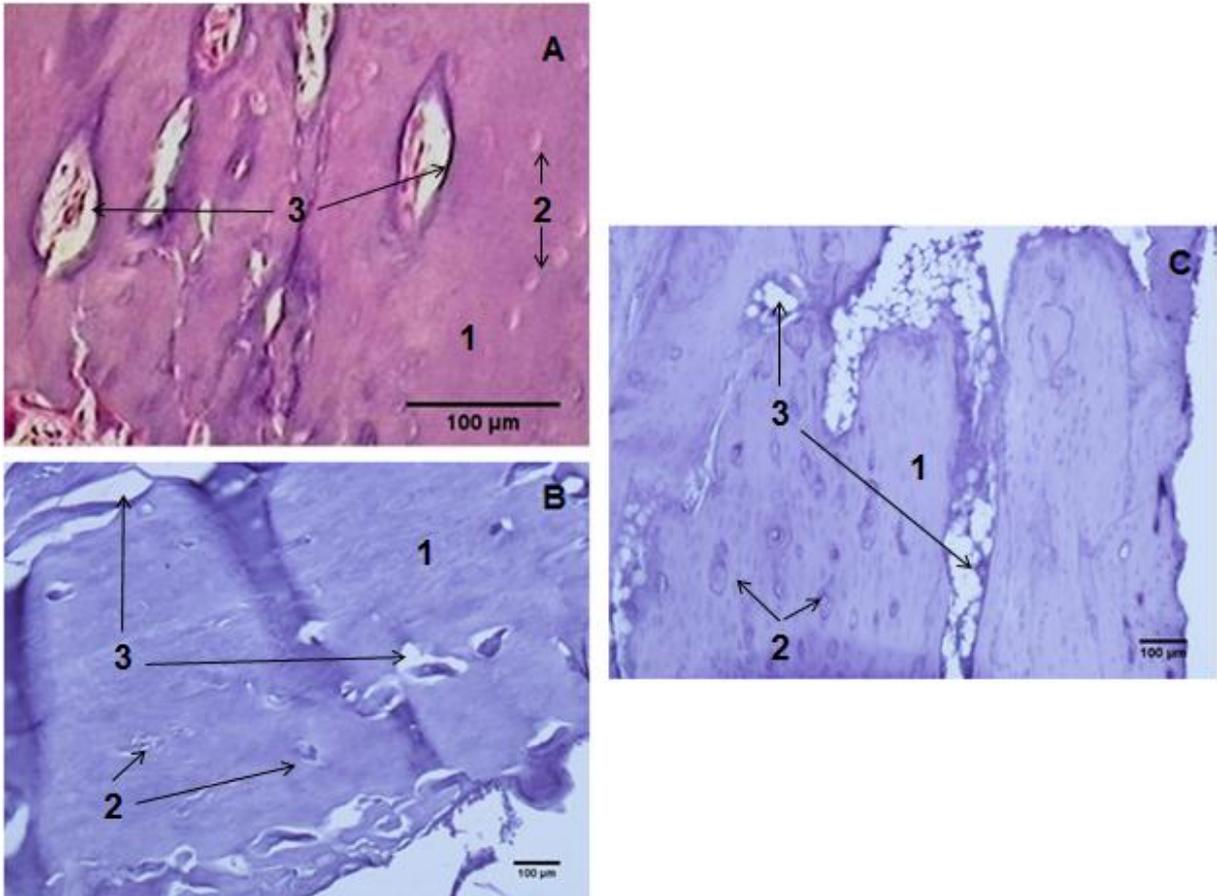


Figura 15 - Micrografia de animais sacrificados com 40 dias.
 A = HAC; B = HAC + crem; C = HAC + PRP + crem.
 1 = tecido ósso formado; 2 = osteócitos; 3 = tecido ainda em formação
 Fonte: Do autor.

Na figura 15 pode-se observar a formação de tecido ósseo em animais com enxertos de HAC. Em todas as micrografias observa-se uma vasta área com tecido ósseo já formado, assim como a presença de células responsáveis pela formação do tecido ósseo (osteócitos), além de regiões com vestígio de HAC onde o material está em processo de reabsorção e ossificação.

Este trabalho apresenta o processo de osteogênese ou regeneração óssea em fraturas de tamanho crítico tratadas com HAC e HAC+PRP. As fraturas foram analisadas no pós - operatório com 20, 30 e 40 dias por meio de radiografias e 40, 60, e 80 dias por avaliação histológica.

Todo tipo de fratura, seja ela por trauma ou por cirurgia, causa uma reposta de reparo no organismo. A reparação de fraturas é um grande desafio na atualidade na área da medicina e também na odontologia onde uma diversidade de

biomateriais vem sendo estudados na busca pela otimização desses reparos ou regenerações.

O Plasma Rico em Plaquetas já tem sido muito utilizado na tentativa de acelerar o reparo tanto de tecidos moles quanto de ósseos em lesões. O processo de cicatrização é ajudado por vários mediadores dentre os quais se destacam os fatores de crescimento. A introdução das plaquetas em uma lesão e a consequente liberação dos fatores de crescimento promovem a migração de uma variedade de células para a região lesionada. Os mediadores favorecem a angiogênese e em consequência tem-se a remodelação de tecidos influenciando muito no processo de reparo.

O emprego do Plasma Rico em Plaquetas no auxílio à regeneração é bastante descrito na literatura, principalmente na área Odontológica e em cirurgias bucomaxilofaciais.

Neste estudo, uma fratura criada por intervenção cirúrgica de tamanho crítico comparado ao porte do animal, e portanto de difícil regeneração, foi tratada com HAC ou HAC+PRP, tendo por objetivo avaliar o efeito do PRP na regeneração óssea em enxertos de HAC. A escolha da fíbula se deu devida a facilidade de se obter uma fratura de tamanho crítico sem causar grandes danos ao animal e facilitar o estudo do implante.

Neste trabalho constatou-se que o PRP não influenciou no tempo de transformação da HAC em tecido ósseo quando comparado a HAC sozinha, o que esta de acordo com trabalhos já realizados sobre PRP em enxertos exógenos [27].

Nas radiografias com pós-operatório de 20 dias foi visualizado um tubo uniformemente opaco, devido a presença de HAC dentro do implante, a qual, é em composição, muito semelhante ao osso. Nas radiografias com 40 dias já se percebe dentro do implante a presença de um estreito filete opaco, o qual se é atribuído à formação inicial do tecido ósseo através da HAC que esta sendo consumida pelo organismo e sendo utilizada para a formação do tecido ósseo. Em todos os enxertos a HAC se mostrou como um material osteocondutor com grande biocompatibilidade, não apresentando em nossos testes nenhuma espécie de efeito colateral.

Observou-se que o comportamento do grupo controle não foi semelhante ao grupo HAC e HAC+PRP comparando-se o tempo decorrido após o procedimento cirúrgico no tocante à regeneração óssea. A análise das radiografias sugere que

ocorreu crescimento ósseo no grupo tratado com HAC + PRP e também no grupo tratado apenas com HAC.

A análise visual também sugere que no grupo onde se realizou apenas fratura não ocorreu osteogênese e notou-se que as extremidades dos ossos apresentaram uma redução em tamanho e espessura, fato atribuído a reabsorção do osso pelo próprio organismo. No grupo controle tubo vazio, as imagens sugerem que não houve mudança significativa nas extremidades dos ossos e também que não apresentaram qualquer tipo de regeneração óssea.

A microscopia é um complemento ao RX para se comprovar a existência de tecido ósseo dentro dos implantes, pois a semelhança em composição entre HAC e o osso, pode causar interpretação errônea por parte do analisador das radiografias devido a presença da HAC ainda não incorporada pelo organismo.

Em todas as micrografias constatou-se a presença de tecido ósseo, com exceção de um animal com excesso de PRP, o que provavelmente lhe ocasionou a saída de HAC do implante, e um outro animal que apresentou em suas micrografias células em processo inflamatório.

Pelos resultados da análise radiológica e histológica, pode-se verificar que no grupo experimental ocorreu crescimento do tecido ósseo, porém não é possível afirmar que o grupo com PRP apresentou alguma vantagem no crescimento do tecido ósseo.

Neste trabalho não foi realizada uma análise estatística, porém alguns trabalhos do gênero já realizados, confirmam que o PRP em conjunto com outros enxertos exógenos não influencia na aceleração ou qualidade do reparo nas fraturas após um certo período tempo [43], [44], [45], [46].

A presente linha de investigação gera muitas perspectivas quanto ao desenvolvimento de novas formas de tratamento e desenvolvimento de novos biomateriais.

7 CONCLUSÃO

Foi sintetizada uma amostra de HAC nanométrica e caracterizada por TG, IV, CHN e DRX. De acordo com o resultado obtido pelas técnicas de CHN, a HAC obtida apresentou aproximadamente 6% de carbonato na sua composição. Os resultados obtidos por DRX mostraram uma fase única apresentando um tamanho médio de cristalitos de 61,80 Å. Foi obtido o PRP de um rato doador, e misturado com a HAC para ser utilizada nos enxertos em ratos

A avaliação do crescimento ósseo através de radiografias e microscopia permitiu acompanhar e comprovar o processo de osteoindução da hidroxiapatita carbonatada nanométrica.

Constatou-se que 20, 40, 60 e 80 dias após a cirurgia o PRP não influenciou significativamente no tempo de transformação da HAC em tecido ósseo. Todos os grupos com implantes de HAC ou HAC + PRP apresentaram regeneração do tecido ósseo, mostrando uma osteogênese de forma similar. Os grupos controle, só fratura e tubo vazio, não apresentaram nenhum crescimento ósseo.

Trabalhos futuros:

Para trabalhos futuro sugerimos fazer microscopias que permitam realizar cálculos estatísticos, para a contagem do número de células obtidas em cada caso. Também resultaria interessante, realizar um controle na alimentação (água e ração) dos animais para verificar se o PRP introduzido na HAC influencia nestes parâmetros.

REFERÊNCIAS

- [1] MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Production of ultra-fine bioresorbable carbonated hydroxyapatite. **Acta Biomater.**, v. 2, n. 2, p. 201–6, mar. 2006.
- [2] SONG, X. et al. Tuned Morphological Electrospun Hydroxyapatite Nanofibers via pH. **J. Bionic Eng.**, v. 9, n. 4, p. 478–483, dez. 2012.
- [3] E. LANDI. et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. **J. Eur. Ceram. Soc.**, v. 23, n. 15, p. 2931–2937, jan. 2003.
- [4] GUO, Y. J. et al. Hollow carbonated hydroxyapatite microspheres with mesoporous structure: Hydrothermal fabrication and drug delivery property. **Mater. Sci. Eng.** v. 33, n. 6, p. 3166–3172, 2013.
- [5] RAKMAE, S. et al. Effect of silane coupling agent treated bovine bone based carbonated hydroxyapatite on in vitro degradation behavior and bioactivity of PLA composites. **Mater. Sci. Eng.** v. 32, n. 6, p. 1428–1436, 2012.
- [6] REY, C. et al. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. **Mater. Sci. Eng.** v. 27, n. 2, p. 198–205, 2007.
- [7] ANITUA, E., ALKHRAISAT, M. H., ORIVE, G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. **J. Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 29–38, jan. 2012.
- [8] ARNOCZKY, S. P., DELOS, D. S., RODEO, A. What Is Platelet-Rich Plasma?. **Oper. Tech. Sports Med.**, v. 19, n. 3, p. 142–148, set. 2011.
- [9] DUTRA, M. L., FORMOSO, C.V., Considerações sobre elementos de terras raras em apatitas, **Geochim. Brasil**, v. 9, n 2. p. 185–199, 1995.
- [10] WHITE, T. J., ZHILI, D. Research papers Structural derivation and crystal chemistry of apatites research papers. **Acta Crystallogr.**, B59, p. 1– 16, 2003.
- [11] EANES, E. D. Crystal growth of mineral phases in skeletal tissues. **Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.**, v. 3, n. 1, p. 3–15, 1980.
- [12] LACERDA, K. A. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia.

Metarlugia e Materials, v. 59, n. 2, p. 217–223, 2006.

- [13] SHU, C. Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanofibers by mechanochemical methods. **Ceram. Int.**, v. 31, n. 1, p. 135–138, jan. 2005.
- [14] MAVROPOULOS, E. et al. The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substituted hydroxyapatite surface. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 24, p. 1271-1283, nov. 2012.
- [15] YAMASAKI, H., SAKAI, H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. **Biomaterials**, v. 13, n. 5, p. 308–312, jan. 1992.
- [16] SERRE, C. M. In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. **Biomaterials**, v. 14, n. 2, p. 97–106, jan. 1993.
- [17] WANG, W. Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization. **Acta Biomater.**, v. 5, n. 8, p. 3132–3140, out. 2009.
- [18] SUETSUGU, Y. et al. Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single-Crystal X-Ray Diffraction Method. **J. Solid. State Chem.**, v. 155, n. 2, p. 292–297, dez. 2000.
- [19] MOREIRA, E. L. et al. Análise por difração de raio-x de uma hidroxiapatita carbonatada usando o método de Rietveld. **Revista Matéria**, v. 12, n. 3, p. 494–502, 2007.
- [20] STIGTER, M. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. **J. Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 127–37, set. 2004.
- [21] LUCHETTI, R. Corrective osteotomy of malunited distal radius fractures using carbonated hydroxyapatite as an alternative to autogenous bone grafting. **The J. Hand Surg.**, v. 29, n. 5, p. 825–34, set. 2004.
- [22] MARX, R. E. et al. Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 85, n. 6, p. 638–646, june 1998.
- [23] ANITUA, E. et al. Platelet-Rich Plasma: Preparation and Formulation, **Oper. Tech. Orthop.**, v. 22, n. 1, p. 25–32, mar. 2012.

- [24] DE LA MATA, J. Platelet Rich Plasma. A New Treatment Tool for the Rheumatologist?. **Reumatol. Clínica**, v. 9, n. 3, p. 166–171, maio 2013.
- [25] ANTONELLO, G. D. M. et al. Evaluation of the effects of the use of platelet-rich plasma (PRP) on alveolar bone repair following extraction of impacted third molars: prospective study. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, v. 41, n. 4, p. e70–5, jun. 2013.
- [26] MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, n. 4, p. 489–496, abr. 2004.
- [27] SILVA, S. B. D. et al. Plasma rico em plaquetas combinado a hidroxiapatita na formação do calo ósseo em fraturas induzidas experimentalmente no rádio de cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1045–1051, 2007.
- [28] OKUDA, K. et al. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. **J. Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 890–8, june 2005.
- [29] FÜRST, G. et al. Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 14, n. 4, p. 500–8, ago. 2003.
- [30] FREYMILLER, E. G., AGHALOO, T. L. Platelet-rich plasma: ready or not?. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 62, n. 4, p. 484–488, abr. 2004.
- [31] LAETICIA, A. et al. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1335–1340, ago. 2008.
- [32] HAKIMI, M. et al. Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. **J. Injury**, v. 41, n. 7, p. 717–723, jul. 2010.
- [33] XIE, X. et al. Platelet-rich plasma enhances autograft revascularization and reinnervation in a dog model of anterior cruciate ligament reconstruction. **The Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 214–222, jul. 2013.
- [34] SCARANTO, M. K. **Plasma rico em plaquetas**. 2002. 26f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Periodontia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

- [35] QUESADA-GARCÍA, M. P. et al. Dental implant stability is influenced by implant diameter and localization and by the use of plasma rich in growth factors. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 70, n. 12, p. 2761–2767, dez. 2012.
- [36] SCAFATI, C. T. et al. Chronic frontal sinus disease: combined use of platelet-rich plasma and calvarial bone grafts for sinus obliteration in aggressive and secondary cases. **Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.**, v. 111, n. 4, p. 216–220, set. 2010.
- [37] BUTTERFIELD, K. J. et al. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 63, n. 3, p. 370–6, mar. 2005.
- [38] BR 10 2015 011732 9, Carboapatita nanométrica com Especificidade para Regeneração Óssea, **Titulares: UNIFAL-MG e FAPEMIG**, Maio 2015
- [39] RODRIGUEZ-CARVAJAL, J. FULLPROF: A program for Rietveld refinement and pattern matching analysis. SATELLITE MEETING ON POWDER DIFFRACTION OF THE XV CONGRESS OF THE IUCR., V. 127, 1990, Toulouse, France:[sn], 1990.
- [40] BUSSO, C., CASTRO-PRADO, A. A. Cremophor EL stimulates mitotic recombination in uvvH//uvvH diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 76, n. 1, p. 49–55, 2004.
- [41] IVANOVA, T. I. et al. Crystal Structure of Calcium-Deficient Carbonated Hydroxyapatite. Thermal Decomposition. **J. Solid State Chem.**, v. 160, n. 2, p. 340–349, set. 2001.
- [42] OLIVEIRA, S. V. et al. Análise no infravermelho da hidroxiapatita. In. CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 11p, 2010, Campina Grande, 2010.
- [43] GERARD, D. et al. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 64, n. 3, p. 443–451, 2006.
- [44] GRAGEDA, E. et al. Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. **J. Oral Implantol.**, v. 31, n. 1, p. 2–17, 2005.
- [45] JAKSE, N. et al. Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental

study on sheep. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 14, n. 5, p. 578–583, aug. 2003.

- [46] ROLDÁN, J. C. et al. Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7". **Bone**, v. 34, p. 80–90, may 2004.

ANEXOS**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais – CEUA**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de fevereiro de 2014.

Profª. Mirta Mir Caraballo

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 551/2014, intitulado “Aplicação de hidroxiapatita carbonatada e plasma rico em plaquetas em enxertos ósseos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais – CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG
 Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação
 Fone/Fax: (35) 3299-1067 . E-mail: copesq.ic@unifal-mg.edu.br



Relação de **protocolo** e respectivo **certificado de aprovação** emitido pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – (CEUA), entregue pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - (PRPPG) ao Biotério no dia **11 de fevereiro de 2014**.

Professor/Pesquisador:	Registro nº:
1 – Profa. Dra. Mirta Mir Caraballo Projeto de Mestrado em Química Período: 02/12/2013 a 15/01/2015 Aluno: Luciano Francisco da Silva	551/2014

Recebi uma via em 11 / 02 / 2014

