

Estudo *in vivo* da reparação óssea guiada pela membrana biológica de poliestireno com colágeno e norbixina

Study in vivo of the bone repair guided by the polystyrene biological membrane with collagen and norbixin

André de Farias Leite^{1*}, Lílian Melo de Miranda Fortaleza¹, Charllyton Luis Sena da Costa¹, Vicente Galber Freitas Viana¹, José Zilton Lima Verde Santos¹, Raurys Alencar de Oliveira¹, Danniell Cabral Leão Ferreira¹, Antônio Luiz Martins Maia Filho¹

¹Universidade Estadual do Piauí, Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade, Teresina, Piauí, Brasil

*Autor correspondente. E-mail: andre.farias.15@hotmail.com

Recebido: 11/09/2019; Aceito: 21/11/2019

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar, *in vivo*, os efeitos de uma membrana de poliestireno com colágeno e norbixina em fraturas no osso da calvaria de ratos aos 15 e 30 dias de tratamento. Foram avaliados as alterações inflamatórias (presença de edema, alterações vasculares e infiltrado inflamatório) e o grau de reparação (processo de fibrose, neovascularização e proliferação fibroblástica) ósseo dos tecidos desenvolvidos em torno do compósito por meio de testes histológicos. Vinte ratos machos, submetidos a fraturas no osso da calvária, envolvendo a sutura sagital, foram divididos em dois grupos, G1 (controle) e G2 (aplicação da membrana), os quais foram avaliados sem e com aplicação da membrana. Após 15 dias de tratamento, o Grupo G2 apresentou um menor infiltrado inflamatório e uma rápida formação de vasos sanguíneos. Já aos 30 dias da aplicação da membrana foi observado a presença de tecido ósseo imaturo e lamelar em ambos os grupos.

Palavras-chave: Cicatrização, biomateriais, colágeno, urucum.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate, *in vivo*, the effects of a polystyrene membrane with collagen and norbixin on rat calvaria bone fractures at 15 and 30 days of treatment. The inflammatory alterations (presence of edema, vascular alterations and inflammatory inflit) and the degree of bone repair (fibrosis process, neovascularization and fibroblastic proliferation) of the tissues developed around the composite were evaluated by histological tests. Twenty male rats submitted to calvary bone fractures involving the sagittal suture were divided into two groups, G1 (control) and G2 (membrane application), which were evaluated without and with membrane application. After 15 days of treatment, Group G2 had a lower inflammatory infiltrate and a rapid formation of blood vessels. At 30 days of membrane application, the presence of immature and lamellar bone tissue was observed in both groups.

Keywords: Wound healing, biocompatible materials, collagen, bixaceae

INTRODUÇÃO

Os acidentes automobilísticos são os principais causadores de fraturas ósseas no mundo, contabilizando cerca de 1,3 milhões de mortes por acidentes de trânsito e, aproximadamente, 50 milhões de pessoas sobrevivem com sequelas em 178 países (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2009). Devido a estes altos índices e as fraturas provocadas por outros fatores, elas passaram a representar um problema de saúde pública com alta incidência de morbi-mortalidade e custo socioeconômico (ZAGO et al., 2009).

O tecido ósseo possui uma enorme capacidade regenerativa e, muitas vezes, ele consegue restaurar sua estrutura óssea perfeitamente. Porém, traumas extensos, infecções, anomalias do desenvolvimento, ressecções oncológicas e patologias podem levar a defeitos ósseos perenes, perdendo o poder de regeneração espontânea. Assim, as necessidades de recuperar a qualidade óssea em áreas que danificaram suas conformações anatômicas, diversos estudos têm procurado desenvolver novos materiais com capacidades de uma boa condução óssea (GUIMARÃES et al., 2011).

Os biomateriais surgiram com a necessidade de melhorar o reparo ósseo. Eles são capazes de interagirem com um organismo vivo, não induzindo reações adversas sistemicamente ou no sítio de implantação (PARETSIS et al., 2017). Dentre esses biomateriais estão às membranas de polímeros, que possuem fácil controle de síntese, origem ilimitada, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de promoverem a regeneração óssea de forma previsível, sem a presença de efeitos colaterais (COSTA et al., 2016).

A Técnica de Regeneração Óssea Guiada (ROG) é um procedimento que tem por objetivo a reposição do volume ósseo e aumentar a eficácia da cicatrização. Ela tem como princípio utilizar uma membrana para fazer uma barreira física, promovendo um ambiente adequado para o organismo utilizar seu potencial máximo de cicatrização dos tecidos lesionados; excluindo células não desejáveis que impedem o reparo normal (PEREIRA et al., 2012).

A norbixina é um composto extraído do urucum (*Bixa Orellana* L.), planta nativa da América Latina, possuindo propriedades hidrofílicas, carotenóides e antioxidantes; sendo amplamente utilizada, como corante nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de tintas (GARCIA et al., 2012; SANTOS et al., 2018).

A avaliação da genotoxicidade dessa membrana feita por meio dos testes de micronucleos e teste de cometa mostraram que ela não possui toxicidade genética e pode ser aplicada *in vivo* (MONTE et al., 2016).

Na literatura existem poucas pesquisas que avaliam os efeitos da norbixina no reparo ósseo. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o processo de reparação do tecido ósseo de ratos guiada pela membrana de poliestireno com colágeno e norbixina, após 15 e 30 dias de tratamento, por meio de testes histológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, *in vivo*, do tipo caso controle, com abordagem qualitativa.

Procedimentos Éticos

O protocolo de pesquisa (Nº 04216/16) foi submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA e pela Universidade Estadual do Piauí, obtendo aprovação de ambos (Anexo A), amparado pela resolução da Lei Nº. 11.794 de Outubro de 2008.

Animais

A amostra foi do tipo probabilística, aleatória, constituída de 20 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) com peso entre 300 e 350g, clinicamente sadios, fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - UESPI. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro e escuro 12h/12h, alojados em gaiolas de polipropileno e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Preparo da membrana

Os componentes da membrana foram dissolvidos em clorofórmio numa relação de 0,20 gramas de poliestireno para 0,05 gramas de norbixina e 0,05 gramas de colágeno. Após 2 horas sob agitação magnética, a mistura foi colocada numa placa de Petri aberta e à temperatura ambiente para que o solvente evaporasse formando a membrana de poliestireno com colágeno e norbixina em capela de exaustão (MONTE et al., 2016).

Preparo dos animais e procedimento de implantação no reparo ósseo

Foi realizado o procedimento cirúrgico de inserção das membranas de poliestireno e colágeno associada à norbixina em defeitos do tecido ósseo da calvária, na altura da sutura sagital Bregma em ratos. Os animais foram divididos em dois grupos, G1 (controle, defeito ósseo e sem membrana) e G2 (defeito ósseo e membrana), no qual cada grupo teve 10 animais, onde 10 foram eutanasiados com 15 dias e os outros 10 com 30 dias de tratamento.

Os animais foram previamente pesados e receberam por via subcutânea, um pré-tratamento com atropina na dose de 0,04 mL para cada 100 gramas de peso corpóreo, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico. Foi administrada droga anestésica por via intramuscular, cloridrato de cetamina 10%, utilizando a dose de 0,1 mL para cada 100 gramas de peso corpóreo e cloridrato de xilazina 2% com dose de 0,1 mL para cada 100 gramas de peso corpóreo. Após a anestesia, cada animal foi posicionado em decúbito dorsal e imobilizado em prancha operatória.

Realizou-se uma incisão de 0,5 cm com tesoura cirúrgica na região occipital seguida de divisão com pinça Kelly e/ou tesoura romba. Logo após a incisão, foi realizado um defeito crítico padrão de 8 mm de diâmetro no osso da calvária, envolvendo a sutura sagital Bregma de cada rato. O defeito foi realizado, usando uma broca trefina acoplada a uma peça de mão de baixa rotação, sob irrigação abundante de soro fisiológico e, posteriormente, foi colocado a membrana de poliestireno com colágeno e norbixina. Após o implante de membrana, as margens da ferida foram suturadas (fio de seda 4-0) para uma perfeita coaptação. No final do procedimento cirúrgico, os animais receberam duas doses de 50 mg/kg de 12 em 12 horas de dipirona para procedimento de analgesia e este tratamento teve a duração do experimento de 15 e 30 dias.

Biópsia e preparo histotécnico

Nos períodos de 15 e 30 dias após a implantação do filme de poliestireno com colágeno e norbixina, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Uma amostra do tecido, contendo o material polimérico, foi removido. As peças passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina. Obtidos os blocos, foram realizados cortes longitudinais com espessura de 05 micrômetros em um micrótomo rotativo, resultando em cortes semi-seriados, que foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina, para estudo histomorfológico sob microscopia de luz.

Na análise histológica foram avaliadas as alterações inflamatórias (presença de edema, alterações vascular e infiltrado inflamatório) e o grau de reparação (processo de fibrose, neovascularização e proliferação fibroblástica) dos tecidos desenvolvidos em torno do compósito de poliestireno, colágeno e norbixina.

RESULTADOS

Nas cortes histológicos dos animais do grupo controle eutanasiados após 15 dias (Fig. 1A) foram observados infiltrados inflamatórios e fibras de colágeno ao longo dos defeitos experimentais, com trabéculas ósseas imaturas não lamelares apenas nas extremidades do defeito cirúrgico. O grupo Membrana (Fig. 1B) após 15 dias apresentou a presença de infiltrado inflamatório em uma quantidade menor quando comparado ao grupo controle, e teve a formação de novos vasos sanguíneos. Porém, a espessura da calvária original não foi restabelecida em nenhum animal dos dois grupos.

No pós-operatório de 30 dias, observou-se um fechamento linear dos defeitos experimentais com presença de tecido ósseo imaturo e lamelar nos grupos Controle (Fig. 1C) e Membrana (Fig. 1D), evidenciando apenas uma leve remodelação.

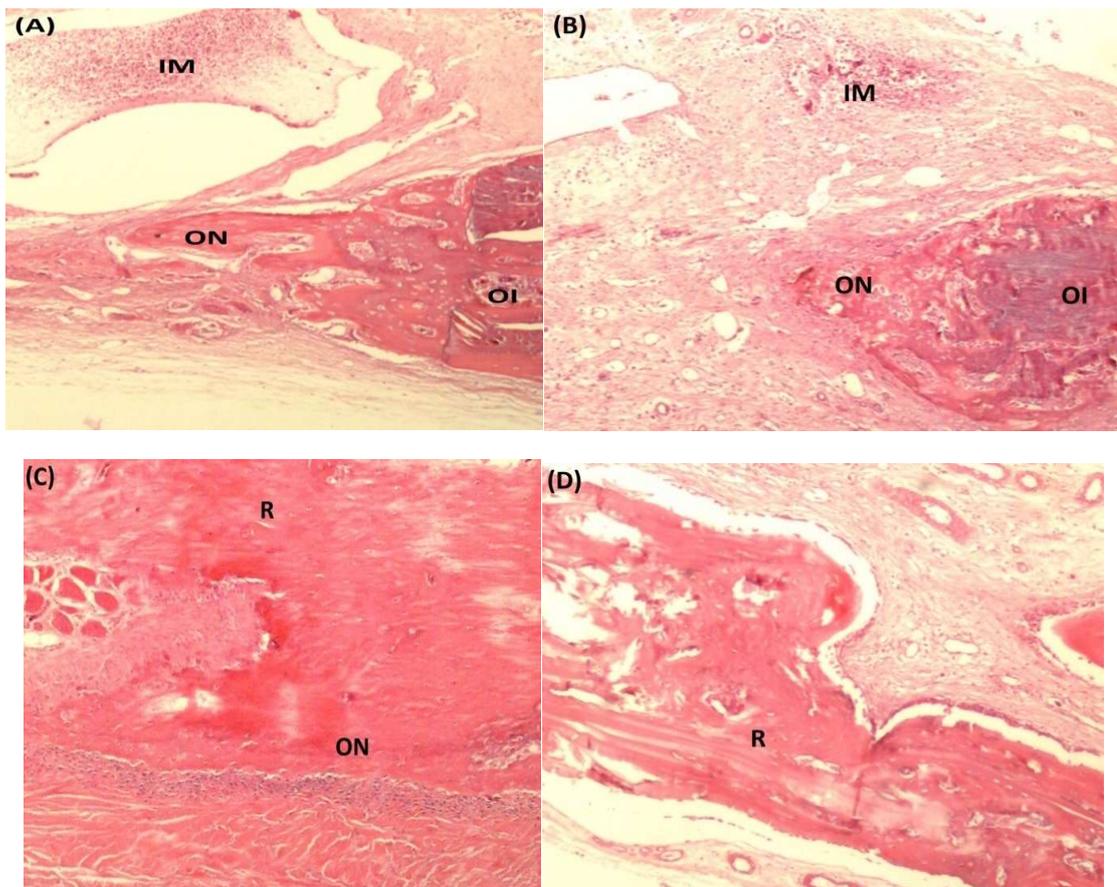


Figura 1. Visão panorâmica da superfície do osso da calvária, na altura da sutura sagital de Bregma, próximo ao defeito ósseo e do local com a membrana nos tempos experimentais de 15 (A-B) e 30 dias (C-D).

Fotomicrografias que mostram a aparência do tecido ósseo no controle (A-C) e Membrana (B-D). (Coloração de hematoxilina e eosina com ampliação de x40). Abreviações: IM – infiltrado inflamatório; OI – osso intacto; ON – osso neoformado; R – remodelação.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado a resposta in vivo do uso de membrana de poliestireno, colágeno e norbixina no processo de reparo ósseo da calvária de ratos por meio da análise histológica.

A utilização do biomaterial na reparação de defeitos ósseos é desejável que a estrutura seja simulada e imitada a do osso biológico, para que ele possa se adaptar às mudanças de estresse em um certo intervalo de tempo,

circular o sangue bem, garantir o crescimento normal e o metabolismo do tecido ósseo, com a finalidade de acelerar a reconstrução óssea (RAHIMZADEH et al., 2012).

O colágeno é o biomaterial de origem natural mais amplamente utilizado, por ser mecanicamente maleável, adaptável, fácil manipulação e com as propriedades de biocompatibilidade, baixa toxicidade, quimiotaxia para fibroblastos, semipermeabilidade e homeostasia; além de ser o principal componente da matriz extracelular, tornando-se um substrato natural para as células (PIRES et al., 2015).

A norbixina é um apocarotenóide extraído de annatto ou urucum (*Bixa orellana* L.), que possui um grande potencial de uso em membranas poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis, por possuir características antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e sem efeitos genotóxicos ou mutagênicos (SOUSA et al., 2016).

O estudo realizado por Monte et al. (2016) mostrou que a membrana de norbixina-poliestireno-colágeno não é citotóxica. Estudo semelhante realizado por Alves et al. (2016), porém com a membrana de polihidroxibutirato-norbixina-etilenoglicol, também mostrou que no grupo experimental não apresentou genotoxicidade por meio de testes de micronúcleo quando comparada ao grupo negativo após 72h do experimento, podendo ser aplicada *in vivo*. Nesta pesquisa, o grupo membrana não evoluiu com áreas de necrose (Fig. 1B e 1D). Dessa forma, a membrana de poliestireno/colágeno/norbixina é segura para aplicação *in vivo* por ser não-citotóxica.

Os resultados nos cortes histológicos obtidos deste estudo demonstram que após os 15 dias de pós-operatório houve uma diminuição do infiltrado inflamatório no grupo membrana quando comparado ao grupo controle (Fig. 1A e 1B), corroborando com o estudo de Capella (2016), no qual foi utilizado o extrato oleoso do urucum para o tratamento de feridas cutâneas, observando a ação pró-inflamatória e acelerando o processo cicatricial com maior formação de crostas e epitelização em menor tempo. Keong et al. (2011) avaliou a atividade antiinflamatória de um extrato aquoso bruto de folhas de *Bixa orellana* L, mostrando que a redução da inflamação na fase aguda é através da inibição da produção de óxido nítrico, um mediador inflamatório produzido pelo endotélio vascular e por macrófagos que causa a supressão da permeabilidade vascular.

Neste estudo, após os 15 dias de pós-operatório, também foi observado uma maior neovascularização no grupo membrana (Fig. 1B), indo de acordo com a pesquisa de Santos et al. (2014), que utilizou o extrato aquoso do urucum para a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, onde foi encontrado um aumento significativo e gradativo de novos vasos sanguíneos após o sétimo dia de pós-operatório.

No entanto, após os 30 dias de pós-operatório, nessa pesquisa foi observado a formação de tecido ósseo imaturo e lamelar tanto no grupo controle quanto no grupo membrana (Fig. 1C e 1D), mostrando o início da remodelação, resultando em uma cicatrização de baixa consolidação, não atingindo o grau esperado. Isso também foi evidenciado no estudo de Capella (2016), que após os 21 dias de tratamento com o urucum para as feridas cutâneas, os grupos que receberam o tratamento tiveram uma menor força de resistência e uma menor força de tensão na cicatrização comparados aos outros grupos da pesquisa tratados com soro fisiológico e vaselina.

Portanto, a membrana de norbixina, poliestireno e colágeno promoveu uma efetiva redução no infiltrado inflamatório e uma rápida neovascularização nos primeiros 15 dias, como também uma leve remodelação óssea nos 30 dias, devido aos efeitos antiinflamatórios presentes nos carotenóides do urucum (VILAR et al., 2014).

CONCLUSÃO

Nas condições apresentadas neste estudo, demonstrou-se que a membrana de norbixina, poliestireno e colágeno foi efetiva na redução da inflamação, na aceleração da neovascularização e iniciou a remodelação do tecido ósseo em ratos.

AGRADECIMENTOS

A todos os contribuintes que participaram no presente estudo e a Universidade Estadual do Piauí (UESPI) pelo fornecimento do local e dos equipamentos necessários para realização desta pesquisa.

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.M.M.; SOUSA, R.C.; MAIA FILHO, A.L.M.; MONTE, S.M.; FERREIRA, D.C.L.; FONSECA, K.M.; CARVALHO, L.F.M.; CARVALHO, T.M.P.; OLIVEIRA, D.S.; VIANA, V.G.F. Avaliação do efeito genotóxico da membrana polihidroxibutirato/norbixina/etilenoglicol. **Revista Univap**, São José dos Campos, v. 22, n. 40, p. 1-6, 2016.
- CAPELLA, S. O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. Em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Minas Gerais, v. 68, n. 1, p. 104-112, 2016
- COSTA, J.B.Z.; SILVA, F.; DULTRA, C.A.; SOUZA, L.F.; SANTOS, M.C.N.E. O uso de membranas biológicas para a regeneração óssea guiada em implantodontia. **Revista Bahiana de Odontologia**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 14-21, 2016.
- GARCIA, C.E.R.; BOLOGNESI, V.J.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G.; COSTA, C.K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, p.1510-1517, 2012.
- KEONG, Y.Y.; ARIFAH, A.K.; SUKARDI, S.; ROSLIDA, A.H.; SOMCHIT, M.N.; ZURAINI, A. *Bixa orellana* Leaves Extract Inhibits Bradykinin-Induced Inflammation through Suppression of Nitric Oxide Production. **Med Princ Pract**, v. 20, p.142-146, 2011.
- MONTE, S.M.; MAIA FILHO, A.L.M.; AMARAL, F.P.M.; FERREIRA, D.C.L.; NASCIMENTO, W.M.; VIANA, F.G.F.; MONTE, Z.L.O.; COSTA, C.L.S.; MOURA NETO, V. Genotoxicity evaluation of polystyrene membrane with collagen and norbixin by micronucleus test and comet assay. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 5, n. 4, p. 7-11, 2016.
- PARETSIS, N.F.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; CORREA, L.; PEPLIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; CORTOPASSI, S.R.G.; ZOPPA, A.L.V. Avaliação histológica e histomorfométrica da regeneração óssea a partir da utilização de biomateriais em tibias de ovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 12, p. 1537-1544, 2017.
- PEREIRA, N.S.; SOUZA, L.R.B.; SOARES, L.C.; SANTOS, I.M.S.P.; ARAÚJO, K.S. Regeneração óssea guiada utilizando membrana reabsorvível fixada com etilcianoacrilato. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 1, p. 39-42, 2012.
- PIRES, A. L. R; BIERHALZ, A. C. K; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

QUIMARÃES, K.B.; VASCONCELOS, B.C.E; LIMEIRA JUNIOR, F.A.; SOUSA, F.B.; ANDRADE, E.S.S.; VASCONCELLOS, R.J.H. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 447-454, jun/ago. 2011.

RAHIMZADEH, R. Value of color doppler ultrasonography and radiography for the assessment of the cancellous bone scaffold coated with nano-hydroxyapatite in repair of radial bone in rabbit. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 148-154, 2012.

SANTOS, E. J.; LOURENZANI, W. L.; LOURENZANI, A. E. B. S. Histórico e ascensão do urucum na microrregião de Dracena – São Paulo. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 29-39, 2018.

SANTOS, J.A.A.; SOUSA, M.F.A.M.; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JUNIOR, F.C.A. Avaliação histomorfológica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014.

SOUSA, R.C.; MAIA FILHO, A.L.M; FERREIRA, D.C.L.; AMARAL, F.P.M.; MONTE, S.M.; FONSECA, K.M.; CARVALHO, L.F.M.; COSTA, C.S.; VIANA, D.S.O.; VIANA, V.G. Assessment of genotoxicity phb/norbixin/ethyleneglycol membrane by micronucleus test and comet assay. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, IOSR-JBB, v. 2, n. 7, p. 34-39, nov/dez. 2016.

VILAR, D.A.; VILAR, M.S.A.; MOURA, T.F.A.L.; RAFFIN, F.N.; OLIVEIRA, M.R.; FRANCO, C.F.O.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review. **The Scientific World Journal**, Rockville, p. 1-11, jun. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global status report on road safety: time for action** world health organization. Geneva: WHO; 2009.

ZAGO, A. P. V; GRASEL, C. E; PADILHA, J. A. Incidência de atendimentos fisioterapêuticos em vítimas de fraturas em um hospital universitário. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 22, n. 4, p. 565-573, out/dez. 2009.