ESTUDO MORFOLÓGICO DA REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICO APÓS IMPLANTE COM BCP ASSOCIADO A CURCUMINA.

Leonardo Niero Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jéssica Naiara Gimenez Noronha (Mestrado – PBF/UEM), Cecília Valente Rodrigues Truite (Doutorado – PBF/UEM), Luzmarina Hernandes (Orientador)
E-mail: luzhernandes@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas Subárea: Morfologia

Palavras-chave: biomateriais, osteoindução, enxerto.

Resumo

Cerâmicas de fosfato de cálcio são tradicionalmente usadas como *scaffolds* para o reparo de defeitos ósseos devido a sua similaridade com a fase inorgânica da matriz óssea. Estudos indicam que os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs), compostos por hidroxiapatita (HA) associada a β-fosfato tricálcico (β-TCP), além de biocompatíveis e bioativos, apresentam ação osteocondutora e osteoindutora, tornando-os materiais amplamente usados como substitutos ósseos. Deste modo, busca-se avaliar a combinação entre BCPs e outros compostos, com a finalidade de potencializar os efeitos regenerativos destes fosfatos. Em concordância, o presente estudo tem por objetivo analisar a eficácia da curcumina em promover a osteorregeneração quando incorporada aos BCPs, por meio de seus efeitos já conhecidos, como: atenuação do processo inflamatório local, inibição de osteoclastos e da reabsorção óssea. Para isto, foram utilizados ratos Wistar que, após cirurgia para produção de defeito de tamanho crítico na calvária, receberam implantes de: BCPs (controle) ou BCPs associado a curcumina. Após 45 dias, os animais foram eutanizados e suas calvárias coletadas para fixação e processamento histológico para determinar se a associação do BCP a curcumina ampliou a eficácia da regeneração óssea no sítio lesado. Os resultados demonstraram que não houve a regeneração completa dos defeitos nos dois grupos. Alguns poros apresentaram-se completamente preenchidos por osso maduro, outros parcialmente. Muitos apresentavam-se preenchidos apenas por tecido conjuntivo vascularizado e houve ainda poros preenchidos por cartilagem hialina. Não se observou diferença aparente entre os grupos controle e curcumina, evidenciando que a curcumina não influenciou a deposição de tecido ósseo.

Introdução

A estrutura de suporte mais especializada do corpo é o tecido ósseo, sendo conhecido pela sua rigidez, dureza e poder de regeneração e reparo. Quando lesado, o tecido ósseo possui a capacidade de se regenerar, restabelecendo sua arquitetura e propriedades mecânicas. No entanto, a regeneração é limitada. Assim, quando o tecido ósseo não consegue ser reparado espontaneamente, uma

alternativa viável para o restabelecimento da estrutura do local danificado é a utilização de biomateriais, como por exemplo aqueles a base de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatita e os fosfatos de cálcio bifásicos (BCPs)[2]. Estudos tem demonstrado que, em modelo de tamanho crítico na calvária de ratos, a regeneração óssea ocorreu em velocidade maior nos 30 primeiros dias após a colocação de implantes de BCP, sugerindo que, para períodos mais longos, pode haver a necessidade de outros fatores estimulantes da regeneração[2].
A curcumina, obtida a partir da herbácea *Curcuma longa* é um polifenol hidrofóbico de cor amarelo-alaranjado com atividade anti-inflamatória[4] e possível atividade inibitória da reabsorção óssea[3]. Com base na literatura, é possível supor que a curcumina pode atuar como um estimulador da regeneração óssea a longo prazo via inibição da osteoclastogênese[3]. Para testar esta hipótese, foram desenvolvidos arcabouços de BCP, na forma de discos, a fim de serem associados com a curcumina, agindo como meio de inoculação do fármaco diretamente no local de ação, bem como suporte mecânico para a deposição óssea.

Materiais e métodos

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá e aprovados sob o parecer nº 3379090218. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos adultos. Durante todo o período experimental os animais receberam água e ração *ad libitum.*
Aplicou-se anestesia intramuscular, a fim de realizar a epilação manual da cabeça, seguida por uma antissepsia com iodo. Em seguida, os animais foram imobilizados para a confecção de um defeito de tamanho crítico (DTC) 8mm de diâmetro na calvária. A seguir, nos defeitos ósseos, foram implantados *scaffolds* de BCP ou BCP com curcumina. Para a obtenção do BCP foram utilizados ossos de peixe do gênero *Tilapia* subfamília *Pseudocrenilabrinae*. Dos ossos, obtém-se hidroxiapatita (HA) e beta-fosfato tricálcico (β-TCP). Os compostos foram processados e transformados em discos de 8mm de diâmetro e 2 a 3mm de espessura, com poros de diâmetro entre 150 e 250 µm. Parte dos *scaffolds* foram impregnados com curcumina via submersão em solução alcoólica com o composto. Após o implante da biocerâmica, o retalho foi suturado e no sítio cirúrgico foi realizada antissepsia com iodo. Após 45 dias da etapa cirúrgica, os animais foram submetidos a eutanásia. Amostras das calvárias foram coletadas e fixadas em paraformaldeído, lavadas e armazenadas em álcool 70% para processamento histológico, obtendo lâminas que posteriormente foram coradas utilizando a técnica H&E (hematoxilina e eosina) para posterior análise dos sítios de regeneração sob o ponto de vista morfológico e comparação com implantes de BCP puro.

Resultados e Discussão

O estudo morfológico dos implantes após 45 dias de observação mostrou que ambos os materiais favoreceram a proliferação e migração de células e vasos para o interior do *scaffold*, sem diferenças entre eles. Porém, o tempo não foi suficiente para o total preenchimento dos poros. Houve o desenvolvimento de tecido

conjuntivo, tecido ósseo imaturo e ósseo lamelar (maduro) no interior dos poros. Uma possível hipótese para a não efetividade da curcumina em promover o crescimento ósseo é a maneira com a qual a mesma foi infundida no sítio lesado. Por ser um composto hidrofóbico e apresentar capacidade quelante(1) a curcumina possui tendência em se aderir à hidroxiapatita, sugerindo que houve uma redução da solubilidade dos íons prejudicando a osteogênese que na presença dos implantes é induzida pelos íons Ca^{+2} e PO_4^-existentes nos fluidos corporais. Estes íons se acumulam na superfície do implante e formam uma camada que se integra às proteínas próximas às células ósseas, além de atuar em vias de sinalização para a diferenciação de osteoblastos(5). Somando-se o fato de que o fármaco possui taxa de liberação maior em pHs não fisiológicos na região(5), a liberação de curcumina no defeito pode ter sido insuficiente para a observação de efeitos práticos.

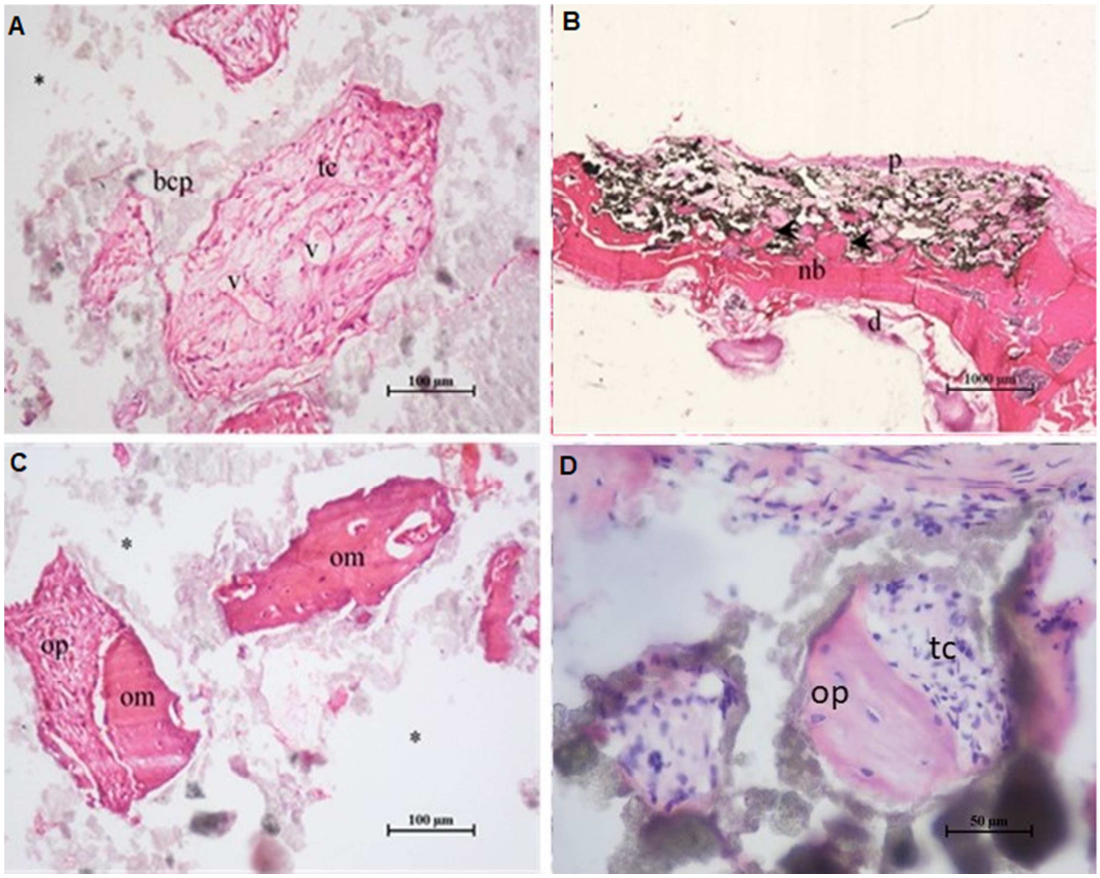

Figura 1: Fotomicrografia de defeito de tamanho crítico (DTC) na calvária de ratos Wistar 45 dias após implante com discos porosos (*scaffolds)* de BCP (fosfato de cálcio bifásico) (A e C) e BCP impregnado com curcumina (B e D). Em (A), destaque para um poro preenchido com tecido conjuntivo (tc) celularizado e vascularizado (v) Em B, imagem panorâmica de corte obtido em área mais próxima à margem do defeito, nota-se crescimento da tábua óssea (nb) ao longo de toda a base do disco. Esta é a face em contato com a dura-máter (d). As cabeça de seta indicam poros preenchidos com osso. Em (C), observa-se poros preenchidos por tecido ósseo primário (op) e tecido ósseo maduro (om) nos *scaffolds*. Em (D) destaca-se poro com tecido conjuntivo (tc) e osso primário (op). Coloração H&E. Legenda: cabeça de seta: poros com osso; p = periósteo; d = dura-máter; nb = osso novo; bcp = fosfato de cálcio bifásico; mo = medula óssea; * = poro; tc = tecido conjuntivo; v = vaso sanguíneo; op = tecido ósseo primário; om= osso maduro (lamelar).

Conclusões

Ambos arcabouços de BCP e BCP impregnado com curcumina favoreceram a proliferação e migração de células osteogênicas e vasos sanguíneos, permitindo o

desenvolvimento de tecido ósseo maduro em seus poros. Todavia, o período de tempo avaliado (45 dias) não foi suficiente para promover o total preenchimento do defeito ósseo. Ademais, a presença de curcumina no implante não apresentou influência aparente sobre a deposição tecidual.

Agradecimentos

Meus agradecimentos à Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

1) BOSE, S., SARKAR, N., BANERJEE, D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. **Materials Today. Chemistry**, v. 8, p. 110-120, 2018.

2) KIYOCHI JUNIOR, H. J., CANDIDO, A. G., BONADIO, T. M., da Cruz, J. A., BAESSO, M. L., WEINAND, W. R., HERNANDES, L. 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**. (DORDRECHT. ONLINE), v. 31, p. 1-13, 2020.

3) OH, S., KYUNG, T. W., CHOI, H. S. Curcumin inhibits osteoclastogenesis by decreasing receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in bone marrow stromal cells. **Molecules and cells**, v. 26, n. 5, p. 486-489, 2008.

4) PLUMMER, S. M., HOLLOWAY, K. A., MANSON, M. M., et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. **Oncogene**, v. 18, n. 44, p. 6013 – 6020,1999.

5) TANG, Z., LI, X., TAN, Y., FAN, H., ZHANG, X. The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 1, p. 43-59, 2018.