EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NÃO COLAGÊNICAS NO OSSO NOVO APÓS IMPLANTE COM CERÂMICAS A BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO DE ORIGEM NATURAL

Antonio Marcos Reissureição Galindo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Luzmarina Hernandes (Orientadora). E-mail: lhernandes@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências Biológicas: Morfologia

Palavras-chave: Hidroxiapatita; regeneração óssea; sindecano.

RESUMO

A matriz óssea orgânica contém proteínas não colagenosas (PNCs) que, embora minoritárias, são essenciais na adesão celular, angiogênese e mineralização. Entre elas, a sindecana-1 (SDC-1) atua na sinalização celular, retenção de fatores de crescimento e diferenciação osteoblástica. Este estudo avaliou, por imuno-histoquímica aos 45 dias pós-operatórios, a presença e distribuição da SDC-1 em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos implantados com scaffolds de hidroxiapatita (HAp) e do compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (HAp-Nb-1080). Após imunocoloração pelo método da peroxidase, as lâminas foram analisadas descritivamente. Ambas as cerâmicas apresentaram ampla imunorreatividade para SDC-1, sem diferenças qualitativas evidentes entre os biomateriais. A marcação concentrou-se no microambiente de reparo, destacando-se em áreas de nucleação, matriz óssea imatura no interior dos poros e, fortemente, nos vasos sanguíneos interconectados, o que reforça o papel do marcador na angiogênese e recrutamento de fatores como VEGF, BMPs e FGFs. Em contrapartida, a matriz óssea madura lamelar exibiu pouca ou nenhuma imunomarcação, indicando que a expressão da SDC-1 está associada às etapas ativas de osteogênese e maturação tecidual. Conclui-se que HAp e HAp-Nb-1080 promovem um microambiente vascular e matricial favorável à regeneração óssea, consolidando a SDC-1 como relevante marcadora do processo.

INTRODUÇÃO

A MEC orgânica óssea, ou osteóide, produzida principalmente pelos osteoblastos antes da mineralização, é constituída por proteínas colagenosas e não colagenosas (PNCs) (Paiva e Granjeiro, 2017). As últimas representam menor proporção da MEC, porém desempenham funções essenciais na adesão, proliferação e diferenciação celular, na interação com fatores de crescimento e na regulação da nucleação e mineralização da matriz em eventos de reparo ósseo. (Gorski, 2011). Dessa forma, participam da determinação da qualidade e das propriedades da matriz mineralizada, incluindo a cristalinidade da HAp, além de contribuírem para a

osteoindução e diferenciação osteoblástica (Lu *et al.*, 2018). A sindecana-1 (SDC-1 / CD138) desempenha um papel regulador essencial na regeneração óssea, atuando como uma ponte de sinalização entre as células ósseas e a matriz extracelular (MEC). Por ser uma proteoglicana de transmembrana rica em cadeias de heparam sulfato, ela atua modulando a adesão celular, o recrutamento de fatores de crescimento e o acoplamento entre osteogênese e osteoclastogênese. As proteoglicanas de transmembrana, como a sindecana-1, atuam na regulação do microambiente celular, mediando a adesão osteoblástica e a retenção de fatores de crescimento essenciais para a regeneração óssea (Couchman, 2003). O presente estudo teve como objetivo fazer um estudo descritivo da presença e distribuição da sindecana-1 em defeitos de tamanho crítico após o implante de scaffolds de hidroxiapatita (HAp) e do compósito hidroxiapatita-pentóxido de Nb (HAp-Nb).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de calvária de animais com defeitos ósseos críticos de 8 mm, implantados com scaffolds cerâmicos de hidroxiapatita (HAp) ou do compósito HAp-Nb-1080, obtido pela sinterização de HAp com pentóxido de nióbio (Nb□O□). Aos 45 dias pós-craniotomia, os animais foram eutanasiados, e as calvárias processadas para inclusão em parafina. Foram obtidos cortes histológicos de 8 µm, submetidos à imunocoloração para detecção de sindecana, proteína não colagênica, pelo método da peroxidase, descrito a seguir: após desparafinização, os cortes foram reidratados e, submetidos ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio em 97% de metanol. Após lavagens em solução tampão TRIS, as amostras foram incubadas com anticorpo monoclonal de coelho anti-Syndecan 1 (Boster Biological Technology® M00991), na diluição de 1:200. As lâminas foram reveladas utilizando o kit Histostain Plus® (Zymed Laboratories Inc.®). O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário. As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss (Tóquio, Japão) para estudo descritivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunorreatividade para Sindecana-1 foi identificada em ambas as cerâmicas, não sendo observadas diferenças qualitativas que permitissem estabelecer superioridade entre os biomateriais. A imunomarcação esteve associada principalmente ao microambiente de reparo, com destaque para áreas de nucleação (Figura 1A) e tecido ósseo imaturo no interior dos poros (Figura 1B). Em contraste, a matriz óssea madura e lamelar apresentou pouca ou nenhuma imunorreatividade (Figuras 1E e 1F), indicando uma possível relação entre a expressão do marcador e o estágio de mineralização do osso novo. A ausência ou redução da marcação na matriz madura (Figuras 1E e 1F) sugere que sua expressão esteja mais relacionada às etapas ativas de organização e maturação do tecido do que ao osso lamelar já estabelecido. Os vasos sanguíneos localizados no interior dos poros e nas interconexões entre eles (Figuras 1C–1E) apresentaram forte marcação para

sindecana. Esse achado é relevante considerando a participação das sindecanas na organização do microambiente vascular e na modulação da biodisponibilidade de fatores de crescimento, como VEGF, BMPs e FGFs, envolvidos na angiogênese e na diferenciação osteogênica (Kim *et al.*, 2018; Toyama *et al.*, 2020). A imunorreatividade observada nas áreas de nucleação e na matriz óssea imatura (Figuras 1A e 1B) também é compatível com o envolvimento dos sindecanos em eventos de proliferação e diferenciação osteoblástica (Sun *et al.*, 2020). Embora o presente estudo tenha como foco a regeneração óssea, os sindecanos também podem participar da remodelação por meio da modulação do eixo RANKL/OPG e da atividade osteoclástica (Timmen *et al.*, 2020). Em conjunto, os achados da Figura 1 sugerem que o Sindecano-1 está associado a componentes celulares, vasculares e matriciais envolvidos no reparo ósseo, especialmente em regiões de tecido imaturo, sem diferenças qualitativas evidentes entre HAp e HAp-Nb1080.

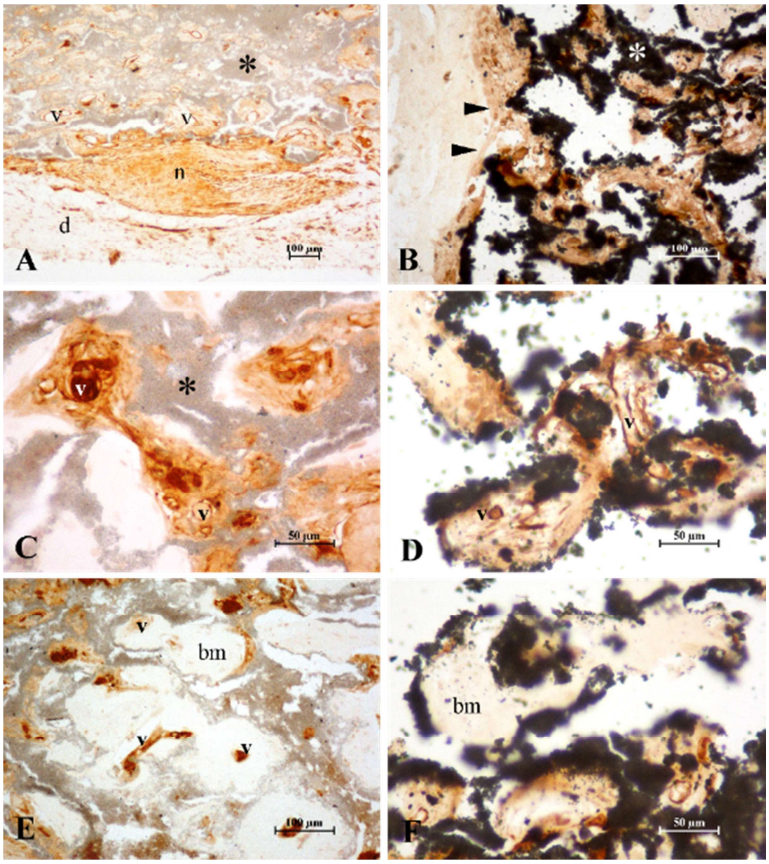


Figura 01. Fotomicrografias ilustrando a imunomarcação para Sindecano-1 em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar 45 dias após a implantação de scaffolds de HAp (A, C, E) ou HAp-Nb1080 (B, D, F). A imunorreatividade para Sindecano-1 foi observada na dura-máter (d), em áreas de nucleação (n) (A) e em poros contendo tecido ósseo imaturo (B). Em (B), é possível observar o limite entre a matriz imatura, positiva para sindecano-1, e a matriz madura, não imunorreativa (ponta de seta fechada). Maior imunorreatividade foi observada nos vasos sanguíneos (v) localizados no interior dos poros ou nas interconexões entre diferentes poros (C, D e E). A matriz óssea madura (bm), lamelar, não apresentou imunorreatividade para sindecano-1 (E, F); entretanto, os vasos centrais apresentaram forte imunorreatividade para esse proteoglicano. * Preto = HAp; *Branco = HAp-Nb1080.

CONCLUSÕES

A análise imuno-histoquímica demonstrou ampla imunoexpressão de sindecano no microambiente de reparo ósseo de defeitos tratados com HAp e HAp-Nb-1080, associada à matriz extracelular, estruturas vasculares, células da linhagem osteogênica e interfaces tecido-biomaterial. Apesar de variações pontuais entre os espécimes, ambos os biomateriais apresentaram padrão semelhante de expressão, indicando um microambiente compatível com a neoformação óssea. Os achados reforçam a relevância do sindecano como marcador envolvido no reparo ósseo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão da bolsa PIBIC. À minha orientadora e aos profissionais do laboratório de histotécnica. Ao professor Wilson Weinand (*in memoriam*) pela idealização do projeto e desenvolvimento dos materiais.

REFERÊNCIAS

COUCHMAN, J. R. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microenvironments. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 12, p. 926-937, 2003. DOI: 10.1038/nrm1257.

GORSKI, J. P. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. **Front. Biosci**, [s. l.], v. 16, p. 2598-2621, 2011.

KIM, J. M. *et al.* Suppressive effect of syndecan ectodomains and N-desulfated heparins on osteoclastogenesis via direct binding to macrophage-colony stimulating factor. **Cell Death & Disease**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. 1-13, 2 nov. 2018.

LU, J.; YU, H.; CHEN, C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. **RSC Advances**, [s. l.], v. 8, p. 2015-2033, 2018.

PAIVA, K. B. S.; GRANJEITO, J. M. Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling and Repair. **Prog Mol Biol Transl**, [s. l], v. 148, p. 203-303, 2017.

SUN, L. *et al.* The Effects of Syndecan on Osteoblastic Cell Adhesion Onto Nano-Zirconia Surface. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], v. 15, p. 5061-5072, jul. 2020.

TIMMEN, M. *et al.* The heparan sulfate proteoglycan Syndecan-1 influences local bone cell communication via the RANKL/OPG axis. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 20510, 2020.

TOYAMA, N. *et al.* The effect of macrophages on an atmospheric pressure plasma-treated titanium membrane with bone marrow stem cells in a model of guided bone regeneration. **Journal Of Materials Science**, [s.l.], v. 31, n. 8, p. 1-9, 2020.