



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

FERNANDA DA SILVA SOBRINHO

**HIDROGEL ASSOCIADO A BIOVIDRO FUNCIONALIZADO COM
RANELATO DE ESTRÔNCIO: análise de biocompatibilidade *in
vitro*.**

2024

FERNANDA DA SILVA SOBRINHO

**HIDROGEL ASSOCIADO A BIOVIDRO FUNCIONALIZADO COM RANELATO DE
ESTRÔNCIO: análise do sobrenadante *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação, reparação tecidual e patologia do sistema estomatognático.

Orientadora: Profa. Dra. Marianne Spalding

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2024]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Silva Sobrinho, Fernanda Da

Hidrogel associado a biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio: análise do sobrenadante in vitro. / Fernanda Da Silva Sobrinho. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Marianne Spalding

Coorientador: Renata Falchete Do Prado

1. Sistemas de liberação de medicamentos. 2. Citocinas. 3. Osteogênese. I. Spalding, Marianne, orient. II. Prado, Renata Falchete Do, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O impacto potencial pode ser significativo na área médica e odontológica aumentando a compreensão dos biomateriais utilizados na saúde óssea. A utilização local do ranelato de estrôncio pode diminuir efeitos colaterais da utilização sistêmica, espera-se que os experimentos desenvolvidos tragam novas opções de tratamento não só para mulheres com deficiência de estrógeno, como para pessoas que sofrem com osteopatias em geral. A dissertação está alinhada com os ODS das Nações Unidas, saúde e bem-estar.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The potential impact could be significant in the medical and dental fields by increasing understanding of biomaterials used in bone health. The local use of strontium ranelate can reduce side effects of systemic use. It is expected that the experiments developed will bring new treatment options not only for women with estrogen deficiency, but also for people suffering from osteopathist in general. The dissertation is aligned with the United Nations SDGs, health, and well-being.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marianne Spalding (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Gabriela de Moraes Gouvêa Lima

Universidade de Mogi das Cruzes (UMC)

Campus de Mogi das Cruzes.

Profa. Associada Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de março de 2024.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rosione da Silva Sobrinho e José Ernandes Ferreira Sobrinho, cujo apoio incondicional e amor inabalável sempre me impulsionaram a buscar o conhecimento e a persistir em meus objetivos. Suas palavras sábias e exemplo de dedicação me inspiram todos os dias. Agradeço por estar ao meu lado, apoiando minhas escolhas e me encorajando a perseguir meus sonhos.

Ao meu irmão, José Ernandes Ferreira Sobrinho Filho companheiro de vida e confidente nas horas mais difíceis. E seu apoio contínuo me ajudaram a superar obstáculos e a alcançar este momento tão significativo. Agradeço por cada palavra motivadora e por sempre trazer alegria aos meus dias.

Ao meu amado marido, Lucas Muniz Alves, que tem sido meu maior incentivador e apoio inabalável. Seu amor, compreensão e paciência durante esses anos de estudo foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Agradeço por me encorajar a expandir os horizontes do conhecimento e por ser o meu porto seguro. Você é meu maior orgulho e minha fonte de inspiração.

O sucesso deste trabalho é, em grande parte, um reflexo do amor e apoio que recebi de vocês ao longo desta jornada acadêmica. Vocês são minha motivação constante e minha fortaleza. Obrigada por me acompanharem e por serem parte essencial da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos que compõem a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos. Pelo acolhimento e incentivo diário.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, na pessoa de coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges. Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, que estiveram sempre disponíveis para esclarecer dúvidas, proporcionar orientações valiosas e compartilhar seus conhecimentos e experiências.

À Profa. Dra. Marianne Spalding, pela orientação, dedicação, pela amizade e pela paciência e incentivo sempre.

À Profa. Dra. Renata Falchete do Prado, pelo acolhimento como coorientadora, ensino, pela amizade e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período fevereiro de 2023.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio, por meio do Processo FAPESP nº 2021/05274-8. Pertencente a pesquisadora prof. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, a qual agradeço imensamente por ter me aceito na equipe de trabalho.

Quero estender meu agradecimento a todos os membros da equipe de alunos do LEIC (Laboratório de Estudos Interdisciplinar em Células). À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.

“Tudo que você pode fazer ou sonha que pode, comece. Ousadia tem genialidade,
poder e magia.” — Johann Wolfgang von Goethe.

RESUMO

Silva Sobrinho F. Hidrogel associado a biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio: análise do sobrenadante *in vitro*. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

A utilização de sistemas de liberação de fármacos para evitar complicações sistêmicas foi o enfoque do trabalho apresentado. O fármaco utilizado foi o ranelato de estrôncio (SrR), medicamento indicado para osteoporose que auxilia na prevenção de fraturas ósseas. Incorporou-se ao sistema biomateriais que estimulam a formação de tecido ósseo, como o hidrogel e o biovidro. O hidrogel é um material polimérico que possui alta capacidade de retenção de água e pode ser injetado no local da lesão, preenchendo o defeito ósseo. O biovidro é um material cerâmico que possui propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, ou seja, favorece a adesão e a diferenciação de células ósseas. O biovidro foi funcionalizado com o fármaco por meio da rota sonoquímica e incorporado aos hidrogéis produzidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de citocinas, pró e anti-inflamatórias que participam da remodelação óssea, utilizando hidrogéis incorporados com partículas de biovidro funcionalizadas com medicamento sobre células mesenquimais *in vitro*. Foram preparados três tipos de materiais: hidrogel puro (HP), hidrogel com biovidro (HB) e hidrogel com biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio (HBR). Os materiais foram caracterizados por técnicas físico-químicas e biológicas, ensaio de viabilidade celular, ensaio de intumescimento e degradação. Foram realizados testes de cultura celular, utilizando células mesenquimais diferenciadas em osteoblastos, isoladas de fêmures de ratas ovariectomizadas. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade para a seleção do teste estatístico apropriado, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que os materiais apresentaram boa interação entre os componentes, formando uma rede tridimensional porosa e homogênea. O ensaio de intumescimento e degradação mostrou a compatibilidade do hidrogel proposto para sistemas de ação local, curva de crescimento compatível com tempo de resposta celular. No teste ELISA evidenciou-se a presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-17, sua expressão nas células mesenquimais analisadas e sua possível influência na remodelação óssea.

Palavras-chave: sistemas de liberação de medicamentos; citocinas; osteogênese.

ABSTRACT

Silva Sobrinho F. Hydrogel associated with bioglass functionalized with strontium ranelate: in vitro supernatant analysis. [dissertation] São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The use of drug delivery systems to avoid systemic complications was the focus of the work presented. The drug used was strontium ranelate (SrR), a medication indicated for osteoporosis that helps prevent bone fractures. Biomaterials that stimulate the formation of bone tissue, such as hydrogel and bioglass, were incorporated into the system. The hydrogel is a polymeric material that has a high-water retention capacity and can be injected into the injury site, filling the bone defect. Bioglass is a ceramic material that has osteoconductive and osteoinductive properties, that is, it favors the adhesion and differentiation of bone cells. The bioglass was functionalized with the drug through the sonochemical route and incorporated into the hydrogels produced. The objective of this work was to evaluate the presence of pro- and anti-inflammatory cytokines that participate in bone remodeling, using hydrogels incorporated with bioglass particles functionalized with medication on mesenchymal cells in vitro. Three types of materials were prepared: pure hydrogel (HP), hydrogel with bioglass (HB) and hydrogel with bioglass functionalized with strontium ranelate (HBR). The materials were characterized by physicochemical and biological techniques, cell viability testing, swelling and degradation testing. Cell culture tests were carried out using mesenchymal cells differentiated into osteoblasts, isolated from the femurs of ovariectomized rats. Quantitative data were subjected to the normality test to select the appropriate statistical test, with a significance level of 5%. The results showed that the materials showed good interaction between the components, forming a porous and homogeneous three-dimensional network. The swelling and degradation test showed the compatibility of the proposed hydrogel for local action systems, a growth curve compatible with cellular response time. The ELISA test revealed the presence of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10 and IL-17, their lower expression in cells from ovariectomized animals and their possible influence on bone remodeling.

Keywords: drug delivery systems; cytokines; osteogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 SrBM- Biomaterial contendo estrôncio	20
2.2 Resposta inflamatória e comportamento das células mesenquimais. ..	23
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Síntese e Caracterização do Vidro Bioativo BG 45S5	27
4.2 Funcionalização do biovidro com Ranelato de estrôncio.....	27
4.3 Síntese do hidrogel	28
4.4. Procedimento cirúrgico de ovariectomia	29
4.4.1. Isolamento, cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular	30
4.5. Determinação da viabilidade celular.....	32
4.6 Teste de intumescimento e degradação.....	33
4.7 Teste ELISA.....	34
5 RESULTADO	36
5.1 Viabilidade celular in vitro	36
5.2 Teste de Intumescência e degradação	37
5.3 Teste ELISA.....	38
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO.....	52

1 INTRODUÇÃO

O sistema esquelético é essencial ao corpo humano, protege órgãos importantes, mantém o movimento humano, regula o sistema endócrino e auxilia na estabilidade mineral e nutricional (Battaglini, 2017). Tecidos ósseos são formados durante o crescimento e a estabilidade da massa óssea é mantida via renovação contínua da matriz (Lin et al., 2020). Esta formação óssea tem interações de dois tipos celulares: osteoclastos que reabsorvem a matriz óssea calcificada e osteoblastos que são responsáveis pela formação de novo osso (Chen et al, 2018). Na infância e juventude a formação óssea mediada por osteoblastos costuma exceder a reabsorção óssea, levando ao crescimento ósseo (Olsen et al., 2000). Em adultos, a absorção e a formação óssea exibem um equilíbrio dinâmico, mantendo a quantidade de massa óssea. Na velhice, a absorção óssea geralmente é mais forte que a formação óssea, resultando em balanço ósseo negativo (Falgayrac et al., 2021). Ocorre maior rapidez na remodelação óssea, podendo ocasionar em fratura das trabéculas ósseas e alterações na estrutura trabecular óssea, resultando em redução da resistência óssea. A persistência desse estado pode levar à osteoporose (Meng et al., 2023).

Considerada a mais comum e mais significativa osteopatia metabólica (Yu & Wang, 2022), a osteoporose representa uma doença de longa duração caracterizada pela deterioração da microestrutura óssea, perda de massa óssea e aumento da fragilidade óssea, levando ainda à dor, deformação da coluna vertebral e fratura por fragilidade (Meng et al., 2023). Pacientes que sofrem de osteoporose, exibem um processo de cicatrização óssea prejudicado, tornando desafiador o tratamento de defeitos ósseos ou fraturas nos ossos dos pacientes comprometidos (Z. Liu et al., 2022).

O tratamento pode ser preventivo ou caso a doença já esteja instalada, medicamentoso (Pires et al., 2022). Existem diferentes tipos de quimioterapias para o tratamento da osteoporose, que incluem bisfosfonatos, denosumabe, paratormônio intermitente, esclerostina e ranelato de estrôncio (Snodgrass, 2022). Os medicamentos para osteoporose são administrados de forma sistêmica, no entanto, essas drogas têm limitações significativas, incluindo baixa eficácia e efeitos colaterais (Reid & Billington, 2022). Estudos sobre o efeito desses medicamentos aplicados

localmente estão ganhando uma atenção nos últimos anos, sendo uma alternativa eficiente pois permitem a liberação controlada e gradual de componentes ativos (Pires et al., 2022).

A estrutura molecular do ranelato de estrôncio (Sr) consiste em duas moléculas de Sr^{2+} e um íon ranelato. A absorção do íon ranelato é baixa devido à sua alta polaridade e, portanto, rapidamente excretado do corpo através do rim (Borciani et al., 2022). Portanto, Sr^{2+} é o principal componente do Sr que desempenha papel farmacológico (Deeks & Dhillon, 2010). Comparada a outras drogas para osteoporose, o Sr tem dois efeitos farmacológicos, efeito duplo no turnover ósseo. Primeiro, ativa OPG/RANKL/RANK, NF κ B e outras vias de sinalização para inibir a atividade e a sobrevivência osteoclástica (Huang et al. 2020). Em segundo lugar, o Ranelato de estrôncio aumenta as atividades da fosfatase alcalina (FA), a síntese de colágeno e a expressão de marcadores osteoblásticos, como a sialoproteína óssea e a osteocalcina, levando ao aumento da osteogênese (Kern et al, 2019).

Assim atua tanto como medicamento anabólico como modulador seletivo de receptores de estrógeno, com especificidade para os receptores presentes em osteoblastos (Xue et al., 2021). Foi demonstrado que o ranelato de estrôncio aumenta a densidade óssea, reduz a perda óssea, melhora a microarquitetura, a força óssea e melhora a osteointegração (Boraei et al., 2021). Além disso, diminui significativamente o risco de fraturas vertebrais.

No entanto, o uso sistêmico de Sr em longo prazo está associado a reações adversas graves cardiovascular e hemodinâmicas, como náuseas, diarreia e tromboembolismo venoso dos pacientes (Meunier et al., 2004). Em 2013, a *European Drug Administration* limitou a indicação de Sr ao tratamento da osteoporose grave, pois seu uso elevado aumenta o risco de infarto do miocárdio, eventos tromboembólicos, reatividade cutânea grave e outras doenças (Rui et al., 2021). Além disso, estudos farmacocinéticos demonstraram que a biodisponibilidade oral do ranelato de estrôncio é muito baixa, e o cálcio oral (Ca) ou uma dieta rica em Ca podem reduzir significativamente a biodisponibilidade do Sr (por serem competidores moleculares diretos) (Deeks & Dhillon, 2010).

Portanto, estudos de engenharia de tecido ósseo têm proposto uma nova estratégia para o tratamento de defeitos ósseos durante a osteoporose, ou seja, implantar biomateriais contendo estrôncio (Sr) (SrBMs) para liberar continuamente

Sr²⁺ localmente. Esses materiais são de grande importância no tratamento de defeitos ósseos críticos associados à osteoporose e fraturas por compressão. Um destes sistemas de liberação são as matrizes poliméricas (Meng et al., 2023), de hidrogel (B. Liu et al., 2021), associados com partículas ativas de biovidro para tornar o sistema mais funcional (Lisboa-Filho et al., 2018). O conjunto forma um biomaterial com uma melhor adaptação aos tecidos e uma liberação de medicação mais lenta, para se adequar a reparação dos tecidos circunvizinhos (Liu et al., 2021).

Os hidrogéis ganharam grande atenção na última década como ótimos materiais carreadores (Del Valle et al., 2017). São géis hidrofílicos de estrutura de rede de três posições (Wang et al., 2021). Como portadores de fármacos, eles podem controlar a velocidade e o tempo de liberação do fármaco, além de manter uma determinada concentração do fármaco nas partes danificadas para alcançar efeitos terapêuticos. Suas propriedades físico-químicas determinam a taxa e duração do fármaco (Fu et al., 2021). Por ser um material polimérico que possui alta capacidade de retenção de água o hidrogel pode ser injetado no local da lesão, preenchendo o defeito ósseo (Xu et al., 2020).

O composto escolhido para ser associado ao hidrogel no proposto trabalho foi o biovidro. Um material cerâmico que possui propriedades osteocondutoras e osteoindutoras, ou seja, favorece a adesão e a diferenciação de células ósseas (Rizwan et al., 2017). O biovidro forma na sua superfície a hidroxiapatita, um material capaz de induzir a adesão e proliferação de células osteogênicas para o local do defeito ósseo (Frazão et al., 2015). O mais utilizado é o 45S5 devido à sua bioatividade, osteoestimulação, osteocondução e outras propriedades importantes para a regeneração óssea (Kargozar et al., 2019). Além disso, é capaz de induzir a liberação de íons específicos para promover uma resposta intra e extracelular visando a otimização da reparação óssea.

No entanto, ambos os materiais apresentam limitações, como a baixa resistência mecânica do hidrogel e a rápida degradação do biovidro (Gonzáles et al., 2020). A associação dos materiais, forma um compósito híbrido que combina as vantagens de cada um (Zhang et al., 2023). A incorporação de fármacos que atuem na regulação do metabolismo ósseo, como o ranelato de estrôncio, amplia a eficácia proposta do sistema e diminui os efeitos colaterais sistêmicos do medicamento (Bergamini et al., 2009). Uma das formas de analisar o comportamento do biomaterial

é avaliando seu intumescimento e degradação.

O intumescimento de um hidrogel consiste na capacidade do material polimérico absorver parte do meio ao qual está inserido, sendo este processo de absorção dependente da composição química dos polímeros que formam o hidrogel, do pH e da força iônica da solução em que ele está inserido. Assim, quando o gel se hidrata, as cadeias poliméricas interagem com as moléculas do solvente e se expandem, enquanto isso, a área reticulada oferece uma força de retração para conter a expansão dos polímeros. Esse movimento de retração e expansão ocorre até que se atinja o equilíbrio (Ahmed, 2015). Dessa forma, polímeros de alto peso molecular normalmente possuem inúmeras áreas de reticulação, sendo capazes de formar hidrogéis mais resistentes e com menor grau de intumescimento, já polímeros menores formam hidrogéis mais maleáveis e intumescíveis (Z. Liu et al., 2022).

Uma das alternativas para a análise da resposta do biomaterial proposto frente aos processos de remodelação óssea é a avaliação das citocinas no sobrenadante da cultura celular. Evidências crescentes têm demonstrado que citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias relacionadas a macrófagos desempenham um papel na osteogênese e nos processos de cicatrização óssea (Pajarinen et al., 2019).

Espera-se que os experimentos desenvolvidos tragam novas opções de tratamento não só para mulheres com deficiência de estrógeno, como para pessoas que sofrem com osteopatias em geral. Frente aos resultados favoráveis dessas medicações reportados na literatura, buscam-se evidências do papel local destas no tecido ósseo, visando eliminar os efeitos colaterais advindos da medicação sistêmica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O metabolismo ósseo é continuamente realizado através da ação das células ósseas, que incluem a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos, enquanto os osteócitos atuam como sensores mecânicos e orquestradores do processo de remodelação óssea (Chen et al., 2018). Esse processo está sob o controle de fatores locais (fatores de crescimento e citocinas) e sistêmicos (calcitonina e estrogênio) que, juntos, contribuem para a homeostase óssea (Hu et al., 2019).

Um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea pode resultar em doenças ósseas, incluindo osteoporose (Olsen et al., 2000). Recentemente, reconheceu-se que, durante a remodelação óssea, há uma intrincada comunicação entre as células ósseas. Por exemplo, o acoplamento da reabsorção óssea à formação óssea é obtido pela interação entre osteoclastos e osteoblastos. O crescente conhecimento sobre a estrutura e as funções das células ósseas contribuiu para um melhor entendimento da biologia óssea (Florencio-Silva et al., 2015).

A remodelação óssea normal é necessária para a consolidação da fratura e adaptação do esqueleto ao uso mecânico, bem como para a homeostase do cálcio (Gavinho et al., 2023). O desequilíbrio da reabsorção e formação óssea resulta em diversas doenças ósseas, como reabsorção excessiva pelos osteoclastos sem a quantidade correspondente de osso neoformado pelos osteoblastos contribuindo para a perda óssea e osteoporose (Pires et al., 2022), enquanto o contrário pode resultar em osteopetrose (Olsen et al., 2000). Assim, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é necessário e depende da ação de vários fatores locais e sistêmicos, incluindo hormônios, citocinas e estimulação biomecânica (Pajarinen et al., 2019).

Os osteoblastos são células cuboidais que estão localizadas ao longo da superfície óssea, compreendendo 4% a 6% do total de células ósseas residentes e são amplamente conhecidas por sua função formadora de osso (Chen et al., 2018). O RANKL é um fator crucial para a osteoclastogênese e é expresso por osteoblastos, osteócitos e células estromais. Quando se liga ao seu receptor RANK em precursores de osteoclastos, a formação de osteoclastos é induzida (Yasuda, 2021). Por outro

lado, outro fator chamado osteoprotegerina (OPG), que é produzido por uma ampla gama de células, incluindo osteoblastos, células estromais, fibroblastos gengivais e periodontais (Wu et al., 2023) liga-se ao RANKL, impedindo a interação RANK/RANKL e, conseqüentemente, inibindo a osteoclastogênese. Assim, o sistema RANKL/RANK/OPG é um mediador chave da osteoclastogênese (Yasuda, 2021).

O aumento na formação e atividade dos osteoclastos leva a algumas doenças ósseas, como a osteoporose, a reabsorção excede a formação, causando diminuição da densidade óssea e aumento das fraturas ósseas (Chen et al., 2018). Osteoclastos não são apenas células absorvedoras de osso, mas também uma fonte de citocinas que influenciam a atividade de outras células (Olsen et al., 2000). Na periodontite, a ativação anormal dos osteoclastos induz a migração de células inflamatórias (Yu and Wang, 2022). Essas células produzem mediadores químicos como IL-6 e RANKL que estimulam a migração de osteoclastos (Yasuda, 2021). Como resultado, ocorre um aumento anormal da reabsorção óssea no osso alveolar, contribuindo para a perda das inserções dos dentes e para a progressão da periodontite (Reid, 2020).

A osteoporose é uma condição comum, afetando uma em cada três mulheres na pós-menopausa e um em cada cinco homens, correspondendo a 200 milhões de mulheres e homens, em todo o mundo (Song et al., 2022). A osteoporose é caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da arquitetura óssea (WHO, 1994). A fisiopatologia da osteoporose envolve um desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. Favorecendo lesões ósseas e dificulta a reparação e cicatrização. A consequência clínica imediata da osteoporose é a fratura, e as fraturas relacionadas à osteoporose, tanto vertebrais quanto de quadril, estão associadas à morbidade e ao aumento da mortalidade (Snodgrass et al., 2022)

Um dos principais fatores que influenciam na instalação da osteoporose é a diminuição dos níveis de estrogênio com a idade avançada feminina (Compston et al., 2019). O estrogênio desempenha papéis cruciais para a homeostase do tecido ósseo; a diminuição do nível deste hormônio na menopausa é a principal causa de perda óssea e osteoporose (Florencio-Silva et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o estrógeno mantém a homeostase óssea por meio da inibição da apoptose de osteoblastos e osteócitos (Snodgrass et al., 2022) e auxilia a prevenir a reabsorção óssea excessiva. Tem sido sugerido que o estrógeno diminui a formação de osteoclastos, inibindo a síntese da citocina osteoclastogênica RANKL por

osteoblastos e osteócitos (Hu et al., 2019), e estimula essas células ósseas a produzirem osteoprotegerina (OPG). Reduzindo assim os níveis de outras citocinas osteoclastogênicas, como IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , TNF- β . (Chen et al., 2018)

Existe uma ampla diversidade na abordagem medicamentosa para a osteoporose, grande parte destas sendo de uso sistêmico. No entanto o fato dessas medicações passarem por degradação sistêmica a associam a uma grande quantidade de efeitos colaterais (Song et al., 2022). Para que sejam amenizados estes efeitos pode se optar a entrega local das medicações. (Reid & Billington, 2022)

Dentre as medicações utilizadas temos o ranelato de estrôncio (SrR), que tem um excelente desempenho frente a fraturas, com desempenho na diminuição da perda óssea e na reparação celular. (Bergamini et al., 2009) Porém, as reações adversas mais comuns foram náusea e diarreia. A descontinuação da terapia devido à ocorrência de náuseas impedia continuação da prescrição (Pilmane et al., 2017a). Seguindo a bula do medicamento, 'Nos estudos de fase III, a incidência anual de tromboembolismo venoso (TEV) observada ao longo de 5 anos, foi aproximadamente de 0,7%, com um risco relativo de 1,4 (IC 95% = [1,0; 2,0]) nos pacientes tratados com ranelato de estrôncio em comparação com o placebo'. Fazendo com que o ranelato de estrôncio sofresse restrições em alguns países e aumentassem os estudos para encontrar alternativas ao uso sistêmico das medicações.

Trazendo a discussão para a área da odontologia, a região oral e maxilofacial possui múltiplas funções fisiológicas críticas como mastigação, deglutição, fala e uma perda óssea pode afetar o movimento e levar à disfunção oral, interferindo na qualidade de vida e na saúde psicológica dos pacientes. (Sacco et al., 2022). Defeitos ou deficiências ósseas causados por tumores, traumas ou fatores fisiológicos na região oral e maxilofacial, muitas vezes apresentam características irregulares e lacunares (Verdier et al., 2024). Embora o pó ósseo e outros materiais granulares sejam empregados na clínica odontológica para reparar perda óssea, muitos problemas existem, como operações complicadas, dificuldades de inserir e posicionar o material. (Ningsih et al., 2022). Portanto, o desenvolvimento de materiais de reparo regenerativo injetáveis adequados para cirurgia minimamente invasiva tornou-se interessante na clínica (Yu & Wang, 2022).

O estrôncio (Sr) é um oligoelemento necessário para o ser humano e é encontrado principalmente no esqueleto (Pilmane et al., 2017). Estudos prévios

constatarem que a Sr poderia promover proliferação e diferenciação osteogênica. Além disso, estudos demonstraram que a Sr poderia inibir efetivamente a diferenciação osteoclástica e a atividade osteoclástica. Xie & Ye (2015) verificaram que o estrôncio e o cálcio circundante mostraram um efeito sinérgico na regeneração óssea de forma dose-dependente. O Sr promove a apoptose dos osteoclastos através da via de sinalização OPG/RANKL/RANK (Yasuda, 2021). A identificação do sistema OPG/RANKL/RANK como mediador final dominante da osteoclastogênese representou grandes avanços na biologia óssea, e conseguiu elucidar alguns mecanismos de ação na estrutura óssea. Sr induz a expressão de ciclooxigenase (COX)-2 e prostaglandina E2 (PGE2) por ativar a via de sinalização

o ERK (Zarins et al., 2018). As prostaglandinas (PGs) são potentes reguladores das funções das células ósseas (Chen et al., 2018). Atuam tanto em linhagens osteoblásticas quanto osteoclásticas. Elas promovem a atividade dos osteoblastos, contribuindo para o aumento da atividade e no aumento da densidade óssea. As PGs também reduzem a atividade dos osteoclastos, promovem a cicatrização óssea e auxiliam no reparo de fraturas. As PGs causam aumento da permeabilidade capilar, o que pode afetar o fluxo sanguíneo e a nutrição das células ósseas (Souza and Lerner, 2013).

Estudos têm mostrado que Sr pode regular o microambiente imune no tecido ósseo para promover a regeneração óssea e vascular (Zhao et al., 2021). O estrôncio pode afetar a direção de polarização dos macrófagos (Arioka et al., 2019). Os macrófagos são importantes reguladores da imunidade inata e adaptativa. Quando o corpo é lesado, os macrófagos não apenas removem células mortas e restos celulares por meio da fagocitose, ativando fatores inflamatórios específicos, mas também secretam proteínas ou citocinas que estimulam a cicatrização de feridas (Sheng et al., 2023).

As diferentes funções dos macrófagos estão relacionadas à sua direção de polarização. Como uma importante linha de defesa para a imunidade humana, os macrófagos devem responder rapidamente a patógenos ou sinais de dano tecidual para remover objetos estranhos ou células danificadas e apoptóticas (Raziyeva et al., 2021). Nesse ponto, os macrófagos polarizam na direção M1. Os macrófagos M1 (macrófagos pró-inflamatórios) secretam principalmente citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e IL-6, atraindo outras

células imunes, como T CD4 e células dendríticas, para participar da eliminação de patógenos e do início de reações inflamatórias agudas, lançando assim as bases para o subsequente reparo tecidual (You et al., 2022). Geralmente, o efeito pró-inflamatório dos macrófagos M1 determina destruição substancial dos tecidos.

Entretanto, vários estudos recentes têm acreditado que macrófagos M1 moderadamente ativados são benéficos para a diferenciação osteogênica de CTMs (células totipotentes) mediada por oncostatina M (OSM) ou proteína morfogenética óssea 2 (BMP2) (Raziyeva et al., 2021). Ao contrário dos macrófagos M1, os macrófagos M2 (macrófagos anti-inflamatórios) estão associados ao reparo, remodelamento e cicatrização tecidual (Singh et al., 2019). As citocinas inibitórias usadas pelos macrófagos M2 para contrapor-se à inflamação incluem principalmente antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA), IL-10 e fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (Jones et al., 2007). Sabe-se que IL-10 e IL-1RA promovem osteogênese e inibem a atividade osteoclástica (Mahon et al., 2020). Produzida por células T, a IL-17 atua principalmente em células epiteliais, endoteliais e estromais, esse grupo de citocinas age rapidamente durante a infecção, antes do início de uma resposta adaptativa de células T. A IL-17 pode ser considerada pró-inflamatória, por dar início a resposta rápida a agressores (Gaffen, 2011). A pesquisa demonstrou que Sr promove a polarização dos macrófagos na direção M2, resultando em um microambiente osteogênico benéfico que suporta a regeneração óssea (Sheng et al., 2023).

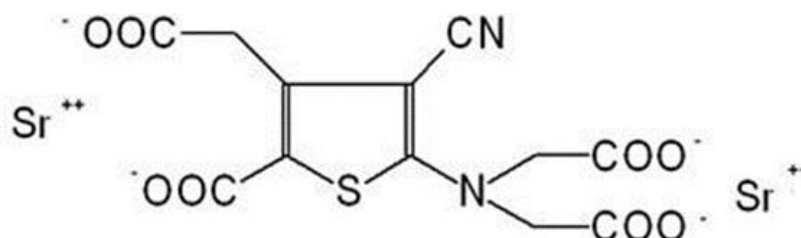
O estrôncio tem sido amplamente dopado em vários biomateriais para alcançar o efeito de reparo ósseo desejado (Cui et al., 2020). Por exemplo, cerâmicas dopadas com Sr poderiam não apenas promover diferenciação osteogênica *in vitro*, mas também inibir a diferenciação osteoclástica. Além disso, materiais com Sr poderiam acelerar o reparo ósseo *in vivo* através da supressão da atividade osteoclástica em modelo osteoporótico (Weng et al., 2017).

O ranelato de estrôncio (SrR), (*Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, Mo, USA*), designações comerciais – *Protelos* e *Osseor*, é um fármaco administrado oralmente para o tratamento da osteoporose pós-menopáusia para redução do risco de fraturas vertebrais e do colo do fêmur. Os dados que sustentam a eficácia e a segurança do ranelato de estrôncio foram obtidos de dois ensaios clínicos, o SOTI (*Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention*) e o TROPOS (*Treatment of Peripheral*

Osteoporosis (Zhang et al., 2023). É o único tratamento eficaz na prevenção de fraturas vertebrais e do colo do fêmur em mulheres com idade igual ou superior a 80 anos.

SrR é constituído por dois átomos de estrôncio estável e uma molécula de ácido ranélico, a parte orgânica que permite o melhor compromisso em termos de peso molecular, farmacocinética e aceitabilidade do medicamento (Andersen et al., 2015). Estudos *in vitro* demonstraram que o ranelato de estrôncio aumenta a formação de osso em culturas de tecido ósseo, bem como a replicação do precursor dos osteoblastos e a síntese de colágeno em culturas de células ósseas e diminui a reabsorção óssea através da diminuição da diferenciação dos osteoclastos e a atividade de reabsorção (You et al., 2022). Isto resulta num reequilíbrio do turnover ósseo a favor da formação do osso. (Pilmane et al., 2017)

Figura 1: Representação da molécula do ranelato de estrôncio



Fonte: bula empresa Sigma.

Especificamente, pode promover a osteoblastogênese e a mineralização da matriz óssea, ao mesmo tempo em que inibe a migração, o acúmulo, a diferenciação e a capacidade de reabsorção dos osteoclastos, de modo a reduzir o risco de fratura e aumentar a resistência óssea (Yu et al., 2022). No campo da odontologia, o SrR tem demonstrado melhorar a osseointegração dos implantes dentários, atenuar a reabsorção radicular durante a movimentação ortodôntica e reduzir a reabsorção óssea alveolar em ratos com periodontite (Arioka et al., 2019).

Os efeitos colaterais comuns com o uso de SrR incluem distúrbios gastrointestinais, por exemplo, vômitos, flatulência, náuseas, eventos

tromboembólicos e reações cutâneas, incluindo necrose epidérmica tóxica e síndrome de Stevens-Johnson (Xiao et al., 2023). Em outras evidências de ensaios clínicos de fase III controlados por placebo, o tratamento com ranelato de estrôncio foi associado a uma incidência significativamente alta de tromboembolismo. O risco é ainda maior em pacientes que também correm risco de trombose, como pacientes idosos, principalmente devido a doenças associadas e por falta de mobilidade (Pilmane et al., 2017). Uma alternativa para contornar os diversos efeitos colaterais sistêmicos do SrR é a aplicação local da medicação associada a outros compostos para realizar a osteomodulação e induzir neoformação óssea (Cui et al., 2020).

2.1 SrBM- Biomaterial contendo estrôncio

O biomaterial proposto para o estudo foi um biovidro funcionalizado com o ranelato de estrôncio associado ao hidrogel. Diversos compostos semelhantes foram estudados e tiveram aplicações locais (You et al., 2022). O hidrogel com base em alginato tem várias aplicações na área médica, como curativos para feridas crônicas e agudas. (Zare et al., 2022) capaz de manter um ambiente úmido na ferida, o que promove a cicatrização e previne a infecção. Além disso, pode absorver o exsudato da ferida, o que ajuda a remover o tecido morto e a reduzir o risco de maceração da pele. Este hidrogel tem como base o alginato de sódio (ALG), um polímero natural aniônico biodegradável não tóxico, derivado de algas marinhas que pode formar géis em presença de íons de cálcio (Dimatteo et al., 2018). Anteriormente, estudos sobre a formação de hidrogéis CS/ALG ou nanopartículas foram conduzidos principalmente usando Ca ou Zn como reticulantes, pois a ALG é capaz de formar redes tridimensionais com esses cátions metálicos multivalentes (Treenate & Monvisade, 2017).

Esse hidrogel também tem potencial para ser usado como veículo de liberação controlada de fármacos. O hidrogel pode ser carregado com fármacos e implantado no local da lesão, onde o fármaco é liberado gradualmente ao longo do tempo. Isso pode melhorar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais, ele é poroso, atóxico e degradável, degradando-se a uma taxa otimizada com a proliferação e crescimento simultâneo de células, proporcionando assim um ambiente

adequado para o crescimento e desenvolvimento de novos tecidos e vasos sanguíneos (Ahmed, 2015).

Os hidrogéis vêm se destacando porque são matrizes tridimensionais capazes de reter grande quantidade de água e permanecer edemaciados similarmente aos tecidos corpóreos (Hilborn, 2011). A natureza elástica de hidrogéis totalmente inchados ou hidratados foi encontrada para minimizar a irritação dos tecidos circundantes após o contato. A baixa tensão interfacial entre a superfície do hidrogel e o fluido corporal minimiza a adsorção de proteínas e a adesão celular, o que reduz as chances de uma reação imunológica negativa (Liu et al., 2021). As ligações físicas e químicas presentes nesta matriz são fundamentais para a construção de uma rede hidrofílica, que também pode ser incorporada com agentes químicos (medicamentos) e/ou partículas (biovidro), dando origem aos sistemas drug delivery (Del Valle et al., 2017).

Hidrogel injetável com estruturas porosas semelhantes à matriz extracelular (MEC) é reconhecido como superior no reparo da deficiência óssea lacunar (Ahmed, 2015). Os poros conectados internamente são preenchidos principalmente com água, o que é benéfico para a troca de nutrientes e transporte de drogas, de modo a ser propício à sobrevivência e proliferação celular (Hoffman, 2012). No entanto, uma desvantagem significativa dos hidrogéis é a sua baixa resistência mecânica, apresentando dificuldades significativas no manuseio (Liu et al., 2022).

O Biovidro é um material composto por vidro bioativo que tem sido amplamente estudado para aplicações em engenharia de tecidos ósseos, esse material sintético bioativo reabsorvível foi inicialmente desenvolvido para reparar defeitos ósseos estimulando a regeneração óssea (Merino et al., 2015). Um tipo deles pode ser composto por 45% de SiO_2 , 24,5% de CaO , 24,5% de Na_2O e 6% de P_2O_5 (Rizwan et al., 2017). O Biovidro 45S5 é conhecido por sua capacidade de se ligar quimicamente ao tecido ósseo e promover a formação de uma camada de hidroxiapatita na superfície do material, o que ajuda a acelerar o processo de regeneração óssea (Del Valle et al., 2017). A formação de hidroxiapatita na superfície de materiais contendo biovidro pode modular a absorção de proteínas, o que, por sua vez, pode promover a adesão e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos mediadas por fibronectina. Também se sabe que os produtos de dissolução iônica dos biovidros podem estimular a osteogênese e angiogênese tanto in vitro quanto in vivo

(Kargozar et al., 2019). Essa bioquímica o torna um excelente candidato para aplicações cirúrgicas com custo limitado.

Se tornou um dos materiais inorgânicos mais utilizados para regeneração de tecidos duros devido à sua alta bioatividade e sua ligação com o osso hospedeiro, tão forte que só poderia ser separado por fratura óssea (Verdier et al., 2024). Além de promover a osseointegração (ligação direta entre o biomaterial e o osso hospedeiro), o biovidro 45S5 apresenta propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (Gavinho et al., 2023). A osteoindução permite a indução direta do crescimento ósseo através do recrutamento, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. A osteocondução está relacionada à capacidade do material de atuar como matriz e fornecer o microambiente para permitir a adesão, migração, crescimento e divisão das células ósseas (Verdier et al., 2024).

O comportamento biológico do Biovidro 45S5 pode ser melhorado com a adição de íons terapêuticos bivalentes como estrôncio, magnésio etc. Isso se deve principalmente à presença desses íons na composição natural dos tecidos duros e seu papel no crescimento e regeneração óssea. O íon estrôncio desempenha importante função no processo de remodelação óssea. (Gavinho et al., 2024). Alguns estudos relataram que a inserção desses íons à rede do Bioglass 45S5 poderia potencializar seu efeito antibacteriano (Ningsih et al., 2022). Íons de estrôncio têm sido estudados e utilizados na reconstrução de tecidos moles e duros na região maxilofacial (Wu et al., 2023). Adicionados a estruturas biodegradáveis para regeneração de tecidos moles, no reparo do esmalte induzindo diferenciação e proliferação de células da polpa dentária humana, como tratamento de superfície de implantes dentários para melhorar a integração de células epiteliais gengivais e fibroblastos, e têm efeito antibacteriano para patógenos periodontais comuns (Mahon et al., 2020).

Uma das principais características que fazem do biovidro um biomaterial excepcional é sua capacidade de armazenar grandes quantidades de cargas elétricas com baixa polarização (Gavinho et al., 2024). Esta propriedade notável decorre da alta mobilidade das cadeias iônicas de sódio dentro de sua estrutura vítrea. A composição única do biovidro permite que ele acumule e libere cargas elétricas de forma eficiente, que podem ser aproveitadas para vários fins terapêuticos (Verdier et al., 2024). As propriedades biológicas podem ser influenciadas pelo tipo de carga (se

é positiva ou negativa acumulada (Treenate and Monvisade, 2017). Tem sido relatado que superfícies com carga negativa promovem regeneração tecidual e aumentam o crescimento ósseo e a osseointegração, estimulando a atividade osteoblástica (Gavinho et al., 2023).

2.2 Resposta inflamatória e comportamento das células mesenquimais.

As citocinas são uma rede complexa de proteínas liberadas por numerosas células inflamatórias e que auxiliam nos processos de reparação (linfócitos, macrófagos, monócitos, fibroblastos e neutrófilos). Se ligam aos receptores de superfície, influenciando o comportamento celular de maneira sobreposta e redundante (Yang et al., 2020). As citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6), são liberadas em resposta a estímulos inflamatórios, como lesões, infecções ou doenças autoimunes (Liao et al., 2017). Essas citocinas estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos, células especializadas na degradação do tecido ósseo (Zeimaran et al., 2021). A ativação dos osteoclastos promove a liberação de minerais e fatores de crescimento presentes na matriz óssea, desempenhando um papel importante na remodelação óssea normal e na cura de lesões ósseas (Kruppke et al., 2019). IL-1 β e IL-6 têm importante participação na perda óssea alveolar e regulação do metabolismo ósseo. IL-1 β já foi associada a ativação direta da sinalização de RANK, assim como é capaz de induzir a expressão de Rankl (Yasuda, 2021). O papel da IL-6, entretanto, ainda é bastante discutido, visto ter participação fisiológica em processos reabsortivos, assim como de formação óssea (Souza & Lerner, 2013).

Citocinas anti-inflamatórias, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e a interleucina-10 (IL-10), atuam de forma oposta às pró-inflamatórias (Anam and Insogna, 2021). Essas citocinas reduzem a atividade osteoclástica, promovendo assim a formação óssea pelos osteoblastos, células responsáveis pela síntese e mineralização da matriz óssea (Cui et al., 2020). Além disso, as citocinas anti-inflamatórias também ajudam a controlar a resposta inflamatória e a promover a regeneração óssea.

O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é essencial para a manutenção da saúde óssea (Yasuda, 2021). A regulação adequada dessas moléculas é necessária para promover a cicatrização de lesões ósseas, a remodelação normal do osso e a prevenção de doenças ósseas, como a osteoporose e a artrite reumatoide (Weng et al., 2017). O entendimento dos mecanismos de regulação mediados pelas citocinas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando restaurar o equilíbrio ósseo em condições prejudiciais à saúde óssea (Zhao et al., 2022). Estudos anteriores demonstraram que a produção de citocinas (IL-1 α , IL-6 e TNF- α) a partir de monócitos/macrófagos era aumentada em vários biomateriais comumente usados como biovidro (Yu et al., 2022). Outros estudos mostraram que a hidrofilia e a carga podem modular a expressão de mRNA de IL-10, IL-1 β e IL-8 tanto *in vitro* e *in vivo*.

Visando avaliar a expressão das citocinas anti-inflamatórias e inflamatórias em células afetadas pela osteoporose/perda óssea buscamos analisar o sobrenadante de cultura celular *in-vitro* com a técnica ELISA. Para a análise, submetemos animais experimentais (ratas fêmeas) a cirurgia de ovariectomia e estimulamos assim a perda óssea por deficiência de hormônio ovariano (Yousefzadeh et al., 2020). No outro grupo, para comparação realizamos uma cirurgia com exposição do ovário sem a sua retirada (Sham), para expor os animais ao estresse da cirurgia e reabilitação pelo mesmo período. As características da perda óssea e suas sequelas nos animais submetidos a OVX se assemelham às encontradas em mulheres na pós-menopausa.

Embora em comparação com os seres humanos, a massa esquelética de ratos permaneça estável por um período prolongado durante sua vida, as ratas podem ser ovariectomizadas para torná-las deficientes em hormônios sexuais e para estimular a perda acelerada de osso que ocorre em mulheres após a menopausa (Kalu, 1991). A perda óssea induzida pela ovariectomia nas ratas e a perda óssea pós-menopausa tem características semelhantes (Shen et al., 2022). Aumento da taxa de remodelação óssea com reabsorção excedendo a formação; uma fase inicial rápida de perda óssea seguida por uma fase muito mais lenta; maior perda de osso esponjoso do que cortical; diminuição da absorção intestinal de cálcio e resposta esquelética semelhante à terapia com estrógeno, tamoxifeno, bisfosfonatos, paratormônio, calcitonina e exercício (Yousefzadeh et al., 2020). Essas amplas

semelhanças são fortes evidências de que o modelo de perda óssea de ratas ovariectomizadas é adequado para estudar problemas relevantes para a perda óssea pós-menopausa.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral neste estudo será avaliar a influência do hidrogel injetável, incorporado com biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio na liberação de citocinas inflamatórias por células mesenquimais cultivadas *in vitro*.

E como objetivos específicos avaliar o biomaterial (hidrogel, biovidro e ranelato de estrôncio) quanto:

- a) Seu grau de intumescimento e degradação para atender padrões de drug delivery.
- b) Presença de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado sob número de protocolo 03/2021 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEUA) do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP - Campus de São José dos Campos e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). Este trabalho também seguiu as diretrizes preconizadas pelo ARRIVE (Animal Research Reporting of In Vivo Experiments) (Percie Du Sert et al., 2020).

Foi realizado estudo piloto das concentrações de Ranelato de estrôncio, denominados HSr1, com 1% de ranelato de estrôncio e HSr3 com 3%.

4.1 Síntese e Caracterização do Vidro Bioativo BG 45S5

A síntese e a caracterização do vidro bioativo BG45S5 foram realizadas no Laboratório de Cerâmicas - BIOCERAM da UNIFESP – Campus de São José dos Campos sob a supervisão da Profa. Dra. Eliandra de Sousa Trichês, com a colaboração do aluno de doutorado Lucas Barbosa.

4.2 Funcionalização do biovidro com Ranelato de estrôncio

A mistura e homogeneização dos materiais foram realizadas no Laboratório de Materiais Avançados do Centro para Pesquisa e Desenvolvimento de Materiais Funcionais - Divisão de Saúde - CEPID/FAPESP sob a supervisão do Prof. Assoc. Paulo Noronha Lisboa Filho. As amostras de biovidro 45S5 foram funcionalizadas com ranelato de estrôncio (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, Mo, USA) que foram tratadas pela técnica sonoquímica utilizando água Mili-Q. ultrapure como meio para obter uma umidade homogênea e para diminuir o tamanho da partícula de biovidro. A água Milli-

Q. ultrapure faz com que as bolhas de cavitação tenham maior dissolução de vapor e, assim acelere o efeito da cavitação acústica. A técnica sonoquímica foi realizada de acordo com a metodologia de (Lisboa-Filho et al., 2018)

4.3 Síntese do hidrogel

Hidrogéis à base de gelatina, alginato e cloreto de cálcio foram sintetizados no laboratório de Bioengenharia sob a responsabilidade do Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges no Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) – UNESP São José dos Campos – SP. Resumidamente, para o hidrogel puro foi utilizada 10ml de água destilada aquecida a 55°C, e então sob agitação magnética foram adicionados um a um os pós, sendo 0,5% de gelatina (gelatina de pele suína tipo A, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA), correspondente a 0,05g (peso/volume), 5% de alginato de sódio (sodium alginate, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA), correspondente a 0,5g (peso/volume) e 0,3% de cloreto de cálcio (cloreto de cálcio anidro P.A/ACS, Neon, São Paulo, Brasil) correspondente a 0,03g (peso/volume), essa solução foi mantida sob agitação, por 1h. O material fica em descanso por 15-60 minutos a temperatura ambiente para que atinja consistência final.

Para a síntese do hidrogel contendo biovidro não funcionalizado ou funcionalizado com a medicação ranelato de estrôncio foram realizadas algumas modificações como: utilização de 10ml de água destilada em temperatura ambiente, adicionado 50% de biovidro, o que corresponde à 0,315g (peso/volume), e então agitação magnética pelo período de 20 minutos, para que as partículas de biovidro se dissolvam completamente; após essa etapa, as demais decorreram igualmente à síntese do hidrogel puro, com mudanças apenas na concentração dos pós. Em agitador magnético, a solução contendo água destilada e biovidro foi aquecida à 55°C, os pós foram adicionados um a um, acrescentando o alginato por último evitando formação de grumos. As concentrações e medidas adicionadas foram 0,5% de gelatina, correspondente a 0,05g (peso/volume) (gelatina de pele de porco tipo A, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA), 5% de alginato de sódio (sodium alginate, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA), correspondente a 0,5g (peso/volume) e 0,6%

de cloreto de cálcio (cloreto de cálcio anidro P.A/ACS, Neon, São Paulo, Brasil), correspondente a 0,06g (peso/volume), essa solução foi mantida sob agitação, por 1h; ao término desse processo permaneceu de 15-60 minutos em temperatura ambiente.

Após o preparo dos materiais, as misturas referentes a composição de cada um dos hidrogéis foram colocados em seringas plásticas. O hidrogel injetável foi inserido em uma seringa de 10 mL (BD plastipak, Curitiba, Brasil) e o material foi dispensado por meio de pressão manual do êmbolo para preenchimento do fundo da placa de 24 poços visando o estudo *in vitro*.

4.4. Procedimento cirúrgico de ovariectomia

Três ratas pesando cerca de 300g com 90 dias de idade foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) (Figura 3). Inicialmente foram anestesiadas via intramuscular com a combinação de 100mg/kg de Ketamina (Dopalen® - Vetbrands, Jacarei - Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan® - Vetbrands, Jacarei - Brasil). A seguir, após conferência da sedação, as ratas foram colocadas em decúbito lateral e foi realizada antissepsia com álcool iodado no local para realização de uma incisão de 1cm nos flancos. Posteriormente, foi realizada a divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, foram localizados os ovários e os cornos uterinos que foram laqueados com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Johnson&Johnson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Posteriormente, foi realizada a remoção dos ovários e foi realizada a sutura por planos, todos utilizando fio de seda nº 3 (Ethicon/Johnson & Johnson).

Novamente foi realizada antissepsia com álcool iodado no local e ao término da cirurgia, foi administrado um fármaco analgésico cloridrato de tramadol, 5-7 mg/kg, por via oral, a cada 24 h, durante 05 dias após a cirurgia

Figura 2: Ovariectomia bilateral (OVX)



Legenda: a) Exposição do ovário; b) Remoção do ovário; c) Ovário e corno uterino suturados.

Fonte: Prof. Luana M.R Vasconcellos e colaboradores do LEIC.

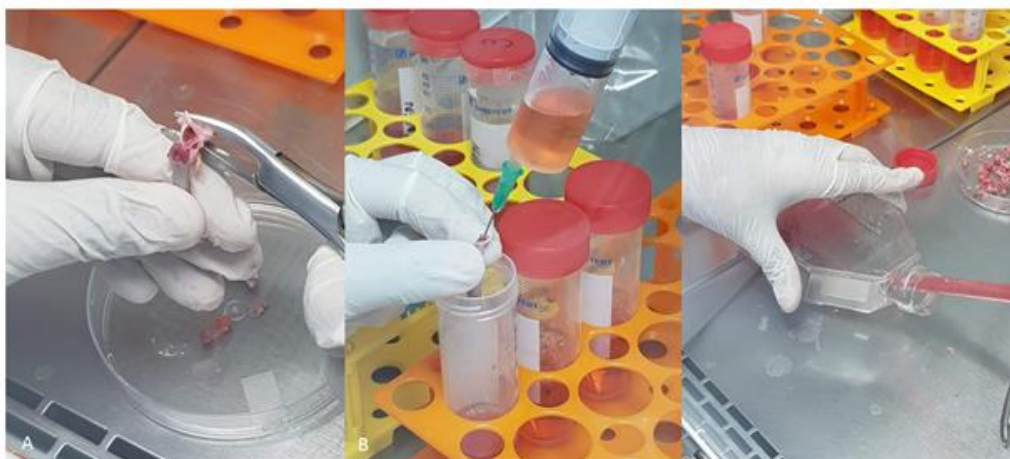
4.4.1. Isolamento, cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

Após 8 semanas do procedimento de ovariectomia, as ratas foram eutanasiadas por meio de dose excessiva (dose tripla) da solução anestésica de 100mg/kg de Ketamina (Dopalen® - Vetbrands, Jacarei - Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Anasedan® - Vetbrands, Jacarei - Brasil), por via intramuscular. As células foram obtidas dos fêmures dessas ratas de acordo com Maniatopoulos et al. (1988) modificado, uma vez que a dexametasona foi retirada seguindo o meio de cultura utilizado em Biggs et al. (2009) e Sartori et al. (2018).

Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutaminha (α -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA). No fluxo laminar, as extremidades foram removidas e culturas primárias de osteoblastos foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura suplementado contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutamina (α -MEM – Gibco- Life Technologies, NY, USA), suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Cultilab Ltda, Campinas Brasil) e gentamicina (Gibco- Life Technologies, NY, USA).

Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brazil) e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Após a confluência (aproximadamente 7 dias), as células foram liberadas enzimaticamente e plaqueadas na densidade de 1×10^4 células viáveis em poços da microplaca de 96 poços (Kasvi, São Jose dos Pinhais, Paraná, Brazil).

Figura 3: Isolamento celular



Legenda: a) Remoção da epífise do fêmur; b) Lavagem do canal medular do fêmur com meio suplementado; e) garrafa com meio suplementado.

Fonte: Prof. Luana M.R Vasconcellos e colaboradores do LEIC

Previamente ao plaqueamento, foram preparadas amostras dos hidrogéis incorporados com o biovidro (HB) e biovidro funcionalizado com o fármaco ranelato de estrôncio (HSr), as quais foram inseridas no interior dos poços para ocupar a área relativa ao diâmetro do poço. Os seguintes grupos foram testados: hidrogel (H), hidrogel incorporado com biovidro (HB) e hidrogel incorporado com biovidro funcionalizado com 1% (HSr1) e 3% (HSr3) de ranelato de estrôncio. Também foi inserido no delineamento o grupo controle somente com células sem qualquer biomaterial. Neste momento 4 grupos foram testados quanto sua influência na viabilidade celular.

Após a inserção dos biomateriais nos poços, foi acrescentado 250 μ L de meio de cultura osteogênico na placa, que foi produzido a partir da adição de 5 mg/mL de ácido ascórbico (Neon, Suzano, BR) e 2,16g de β glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) na solução de 500 mL do meio de cultura celular suplementado citado acima. O grupo controle do experimento foi representado por meio do plaqueamento apenas das células no poço da placa, sem qualquer biomaterial no poço. O meio de cultura osteogênico foi trocado a cada 48 horas.

Após estes procedimentos, a placa com os grupos foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ e mantida até o momento do teste de viabilidade celular.

4.5. Determinação da viabilidade celular.

Foi realizada avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição e incubação com o corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenilcarboxilato] (Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) utilizando análise espectrofotométrica do corante incorporado. Inicialmente o fundo dos poços da placa de 96 poços foi preenchido com 0,2g dos diferentes tipos de hidrogel injetáveis produzidos, conforme descritos no item acima. Como controle negativo foi utilizado o fundo da placa.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas após o período de 05 dias, utilizando medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU, Santa Clara, USA). Inicialmente foram preparadas alíquotas de MTT a 5 mg/mL em meio osteogênico, e esta solução foi inserida nos poços sendo 10% em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram lavadas com PBS. Em seguida, foi adicionado o DMSO (Dimethyl Sulfoxide, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, USA) em cada poço, e a mistura permaneceu sob agitação em mesa agitadora orbital (Solab, Piracicaba, BR), para a solubilização completa do precipitado formado no interior das células. Alíquotas de 100 μ L foram retiradas de cada poço e transferidas para placa de 96 poços (Greiner, Americana, BR) para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda 570 nm (Biotek EL808IU, Santa Clara, USA). Os dados foram aferidos como absorbância e expressos como porcentagem sendo o controle 100%.

4.6 Teste de intumescimento e degradação.

O grau de intumescimento foi obtido com PBS (tampão de fosfato, do inglês Phosphate Buffered Saline) à temperatura de $36\pm 1^\circ\text{C}$. O PBS foi obtido segundo protocolo laboratorial padrão. Para a determinação do grau de intumescimento cinco amostras de cada um dos tipos de hidrogel (H, HB e HSr) foram inicialmente pesadas e imersas em recipientes contendo o PBS, pH 7,4, por distintos períodos (0, 24h, 168h e 336h). Após a finalização desses períodos, as amostras foram retiradas das soluções, colocadas em papel de filtro para a retirada do excesso de líquido e pesadas novamente (B. Liu et al., 2021). A quantidade de água absorvida foi calculada utilizando a Equação 1:

$$P = \frac{P_u - P_s}{P_s}$$

P sendo o peso das amostras, P_u o peso úmido e P_s o peso seco.

Figura 4: Amostras embebidas em PBS



Fonte: Elaborada pela autora.

A porcentagem de biodegradação foi calculada através da medida da perda de massa em soluções tampão, PBS (pH 7,2). Cinco quantidades específicas de

hidrogel de cada composto foram cuidadosamente cortadas, pesadas, registradas como W_0 submerso em solução tampão. No intervalo de tempo de 0h, 24h, 168h e 336h, as amostras foram retiradas da solução, totalmente secas e pesadas novamente como W_t . A taxa de degradação dos nano compósitos foi calculada utilizando-se a Equação 2:

$$SP = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

Sp é a taxa de degradação, W_t as amostras após a secagem e W_0 o peso inicial.

4.7 Teste ELISA

A avaliação das citocinas inflamatórias foi realizada por ELISA (Kits Enzyme-linked immunosorbent assay). O ensaio imunoenzimático realizado para as seguintes interleucinas: (IL)-1 β , IL-6, IL-10 e IL17;

As amostras foram recolhidas do sobrenadante do plaqueamento celular com material (Hidrogel, biovidro e ranelato de estrôncio) e armazenadas em tubos de eppendorf (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a -80° C. Para o teste ELISA sensibilizou-se placas de microtitulação de 96 poços com anticorpos de captura específicos para cada citocina de interesse, IL-1 β DuoSet Mouse ELISA (DY501 R & D Systems); IL-6 DuoSet ELISA Mouse (DY506 R & D Systems); IL-10 DuoSet ELISA Mouse (DY522 R & D Systems); and IL-17 DuoSet ELISA Mouse (DY4437R & D Systems), sendo 100 μ L/poço. As placas permanecerão overnight em temperatura ambiente.

Posteriormente, as placas foram lavadas com 300 μ L de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS acrescido de 0,1% de Soro Albumina Bovino - BSA). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por uma hora. Após os procedimentos de lavagem, foi adicionado nas placas 100 μ L do padrão de citocinas (curva-padrão) ou 100 μ L das amostras. Os testes foram realizados em duplicata.

As placas foram mantidas por duas horas em temperatura ambiente. Após os procedimentos de lavagem, acrescentados em cada poço das placas 100 µL de anticorpo de detecção marcado com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h. Novas lavagens feitas e logo após, adicionados em cada poço, 100 µL de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. Cobriu-se as placas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após os procedimentos de lavagem, adicionou-se em cada poço 100 µL da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1. As placas ficaram cobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 minutos. Logo após foram adicionados 50 µL da solução de parada da reação (ácido sulfúrico 2N). Imediatamente levou-se as placas ao leitor de microplacas (Biotek EL808IU, Santa Clara, USA), com comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das densidades ópticas, foram determinados, em pg/mL, os níveis de interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-10 e IL17 presentes nas amostras.

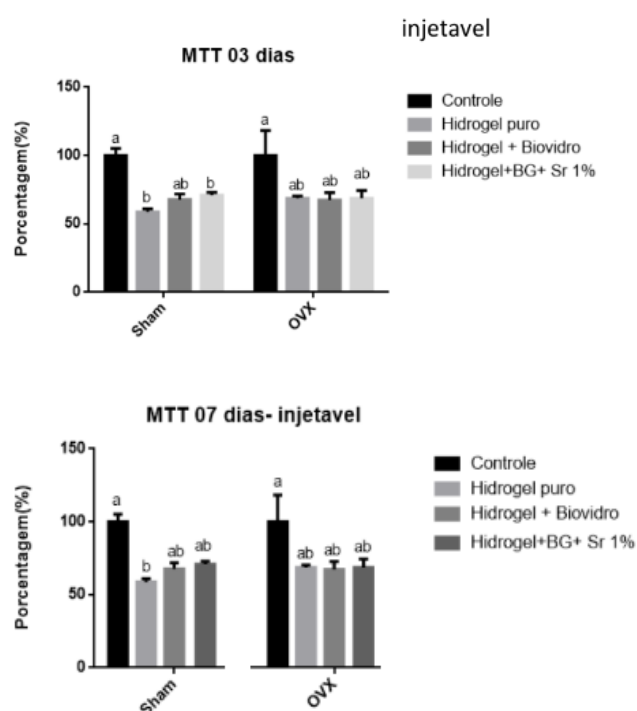
Com os dados em mãos, avaliou-se a presença das citocinas nas amostras e comparou-se com a curva padrão obtida. Após obtenção da quantidade expressada em cada amostra analisamos no 2024 Minitab® (Statistical Software, LLC.), para obter a estatística dos dados.

5 RESULTADO

5.1 Viabilidade celular in vitro

Os dados obtidos no teste in vitro de MTT foram plotados e inicialmente analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p=0,05$) seguido por teste paramétrico de análise de variância ANOVA um fator ($p=0,05$), considerando como variável os diferentes grupos. Em seguida, foram submetidos ao teste post-hoc de Tukey. Na figura 5, pôde-se observar que o grupo controle (fundo da placa) exibiu o menor valor de células viáveis, o qual não exibiu diferença estatística com os grupos HB, HSr1 e HSr3 ($p>0,05$), que também não diferiram entre si e dos grupos H ($p>0,05$).

Figura 5: Valores de média e desvio padrão ($\pm$) do teste de viabilidade celular



Fonte: Elaborado pela autora

5.2 Teste de Intumescência e degradação

Os hidrogéis apresentaram padrão semelhante de intumescimento e degradação. O hidrogel funcionalizado com biovidro e ranelato (HSr) teve uma discrepância não significativa, após as 24h iniciou-se uma queda indicando início da degradação dos compostos.

Na figura 6 vemos as amostras após o intumescimento de 24 horas em PBS, observarmos uma margem sobressalente demonstrando o aumento da massa.

Figura 6: Teste de intumescimento



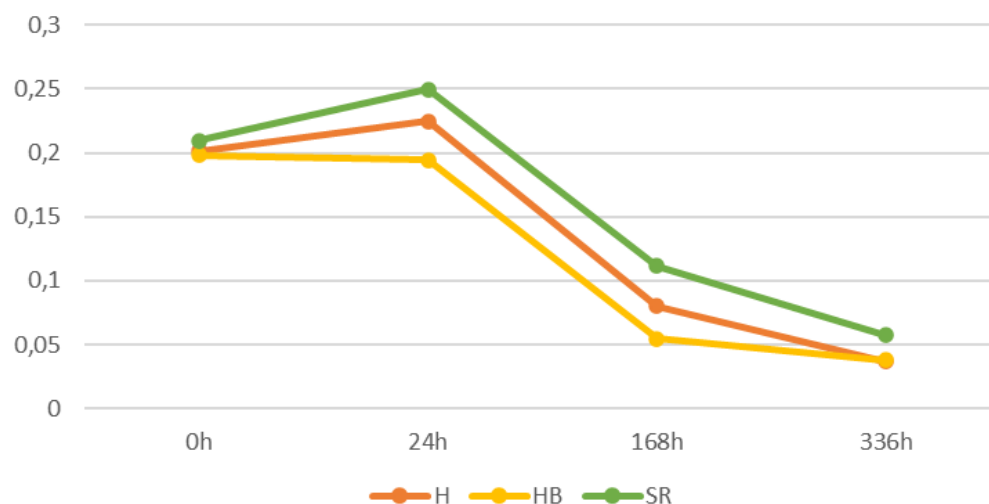
Legenda: Amostras com aumento de massa após 24h em PBS. A) Hidrogel puro, B) Hidrogel com biovidro C) Hidrogel com biovidro e ranelato de estrôncio.

Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 7 mostra que a degradação foi linear e que é propícia a um bom desenvolvimento da matriz óssea. Todos os dados quantitativos são apresentados como média $\pm$ DP. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA one-way e teste t de Student, com nível de significância de $p < 0,05$ realizado no Jamovi. (Jamovi Pty Ltd, 33 Tighes Terrace, Tighes Hill, NSW 2297)

A perda de peso de todos os hidrogéis mostrou a mesma tendência geral, após as 24 horas de intumescimento. Vale ressaltar que os hidrogéis mantiveram a forma de integridade após maior tempo de exposição (após 350 h), mas seu peso diminuiu, o que se deveu ao fato de estar parcialmente degradado.

Figura 7: Gráfico de intumescimento e degradação das amostras



Legenda: Demonstração do inchamento e degradação das amostras ao longo do tempo. Eixo Y indicando o peso das amostras e o eixo X a passagem do tempo.

Fonte: Elaborado pela autora

Juntos, os resultados mostram que o hidrogel funcionalizado com biovidro e ranelato de estrôncio pode fornecer uma combinação ótima de propriedades físico-químicas e desempenho biológico para uso injetável em defeitos ósseos.

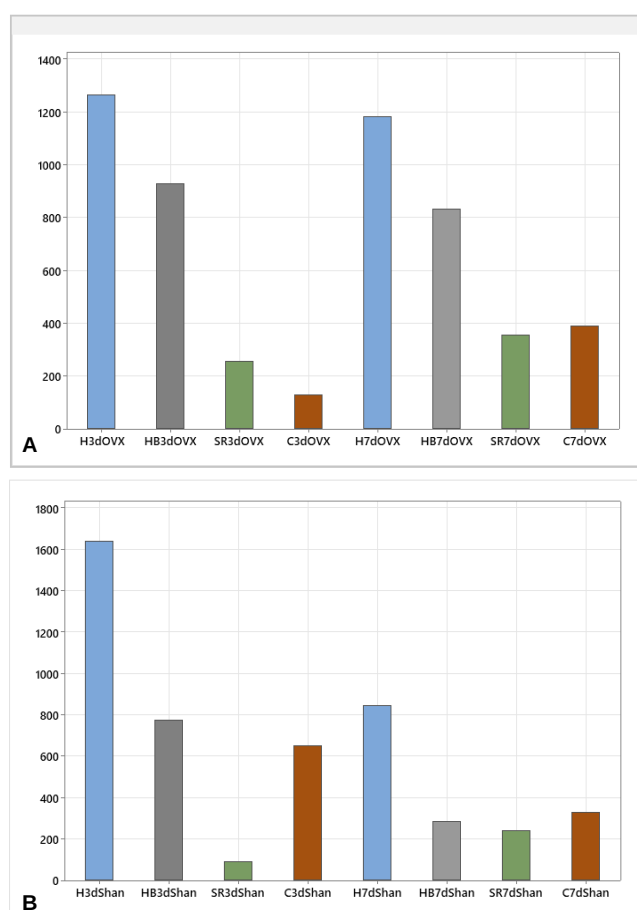
5.3 Teste ELISA

Os resultados mostram que houve expressão das citocinas de interesse e que houve alteração da concentração destas ao longo do tempo. Evidenciou-se o impacto do procedimento de ovariectomia na liberação das citocinas, sendo proporcionalmente menor que as ratas não ovariectomizadas (Sham).

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) seguido por teste paramétrico de análise de variância ANOVA um fator ($p > 0,05$), considerando como variável os diferentes grupos.

Nas figuras a seguir, são apresentados os gráficos que demonstram a expressão das citocinas nas amostras em 3d (3 dias) e 7d (7dias). Em **A**, observam-se as amostras do grupo que realizou ovariectomia (OVX) e em **B** as amostras do grupo Sham (S). Na figura 8, foi observada uma maior quantidade de IL-1 β no hidrogel puro (H), e uma diminuição no grupo SR, tanto no grupo OVX quanto no Sham. Podemos notar também a diminuição com o passar do tempo nas amostras, com exceção de SR e C que tiveram leve aumento.

Figura 8: Análise da citocinas IL-1 β

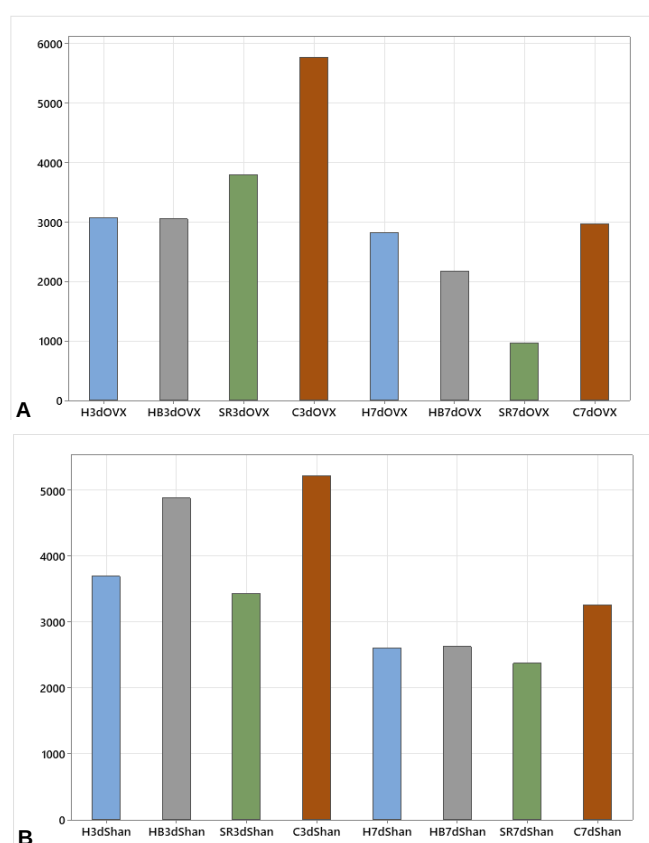


Legenda: Eixo x representa as amostras estudadas: Hidrogel puro (H), Hidrogel com biovidro (HB), ranelato de estrôncio (SR) e controle (C) com diferença de 3 dia e 7 dias. Eixo Y mostrando a concentração da citocina IL-1 β em pg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com relação a expressão da IL-6 foi observado que não houve diferença estatística entre as amostras, $p>0,5$, porém houve uma maior expressão de IL-6 nos grupos controles, tendo uma diminuição com o passar do tempo. Nos outros grupos se observou um leve declínio nas amostras de 7 dias e valores aproximados entre o grupo OVX e o grupo Sham (figura 9).

Figura 9: Citocinas IL-6

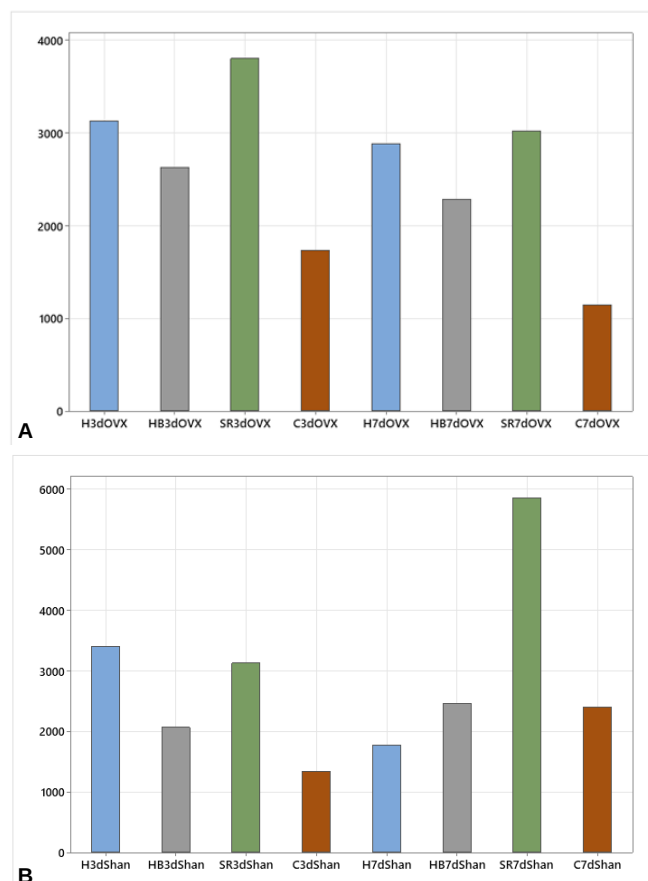


Legenda: Eixo x representando as amostras estudadas, Hidrogel puro (H), Hidrogel com biovidro (HB), ranelato de estrôncio (SR) e controle (C) com diferença de 3 dia e 7 dias. Eixo Y mostrando a concentração da IL-6 em pg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 10 observamos uma maior expressão de citocinas IL-10 no grupo OVX, com uma discreta redução nos 7 dias em comparação os 3 dias. No grupo Sham ocorreu um aumento na amostra de SR aos 7 dias.

Figura 10: Citocinas IL-10

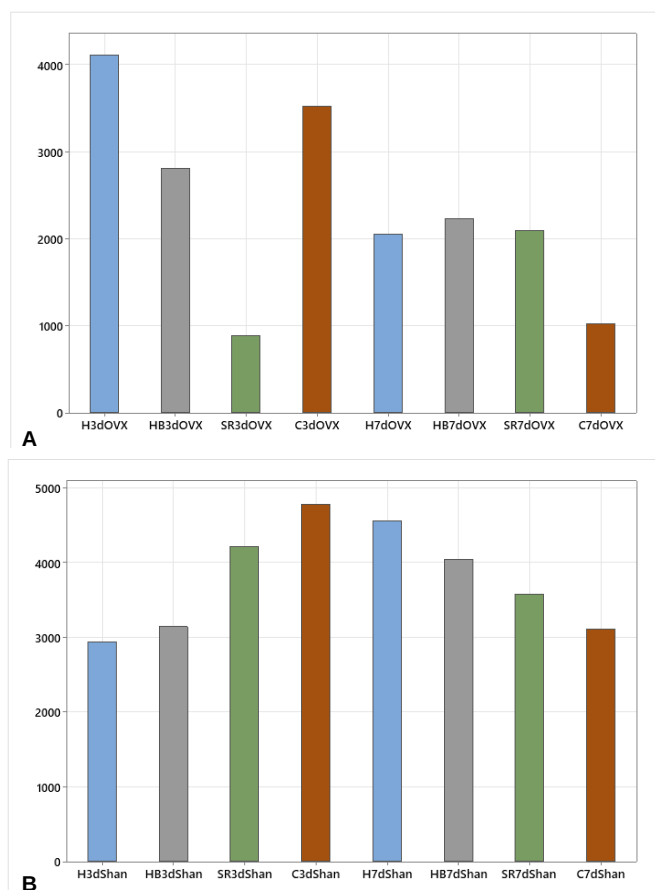


Legenda: Eixo x: Hidrogel puro (H), Hidrogel com biovidro (HB), ranelato de estrôncio (SR) e controle (C) com diferença de 3 dia e 7 dias. Eixo Y mostrando a concentração da IL-10 em pg/mL.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na figura 11, é possível observar que houve uma expressão maior de IL-17 no grupo Sham, excetuando as amostras H3d e HB3d. No OVX, somente o grupo SR teve acréscimo com o passar dos dias. No grupo Sham o hidrogel puro e associado com biovidro apresentaram aumento com o tempo.

Figura 11: Citocinas IL-17



Legenda: Eixo x: Hidrogel puro (H), Hidrogel com biovidro (HB), ranelato de estrôncio (SR) e controle (C) com diferença de 3 dia e 7 dias. Eixo Y mostrando a concentração da IL-17 em pg/mL.
 Fonte: Elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

O biomaterial estudado, hidrogel associado a biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio, é utilizado para reparação e regeneração de tecidos ósseos devido às suas propriedades físicas e bioquímicas favoráveis (Gonzáles et al., 2020). Este biomaterial pode modular a resposta inflamatória, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) (Ghani and Arfee, 2023). Isso ocorre devido às propriedades do ranelato de estrôncio, que inibe a ativação de macrófagos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Ningsih et al., 2022). Neste estudo, focamos na análise de citocinas associadas ao uso desse material, explorando a influência do hidrogel e do biovidro funcionalizado com ranelato de estrôncio na modulação da resposta inflamatória e consequentemente na regulação do processo de regeneração óssea.

O intumescimento pode ocorrer devido à interação do hidrogel com o líquido circundante ou através de estímulos externos, como pH ou temperatura. Pode ser modificado através de alterações em sua composição química, como a inclusão de biovidro e ranelato de estrôncio (Kargozar et al., 2019). Quando incorporado ao hidrogel, o biovidro pode ajudar a fortalecer a estrutura do material, conferindo-lhe maior resistência e durabilidade (Dimatteo et al., 2018). Nos nossos resultados houve acréscimo de peso nas primeiras 24h em todos os grupos, e observamos que o grupo com maior intumescimento foi o SR. Também demonstrado por (Kruppke et al., 2019), que decorreu sobre a degradação do material após as horas iniciais.

Esta degradação provoca a liberação de íons, e a capacidade de um material substituto ósseo iniciar a formação de uma camada de apatita em sua superfície, o que é chamado de bioatividade (Kruppke et al., 2019). Apesar dessa sobreposição de fatores, todas as amostras apresentaram diminuição de massa durante as 336h de análise. A maior diminuição de massa foi medida para os grupos H e HB, restando aproximadamente 25% de massa seca. Para SR a massa foi reduzida para 35%.

Além disso, o biovidro também pode proporcionar propriedades antimicrobianas ao hidrogel, ajudando a prevenir infecções durante a cicatrização de feridas ou implantes. A potência de degradação do arcabouço pode apresentar

espaço suficiente para a formação de osso e crescimento vascular, em contraste, quando a taxa de degradação é rápida, leva a defeitos teciduais indesejáveis no local. (Cui et al., 2020)

Uma das questões levantadas era se o uso de biovidro e ranelato de estrôncio poderia acelerar a degradação do hidrogel, que pode ocorrer devido à quebra de ligações químicas ou ação de enzimas presentes no corpo (Hoffman, 2012). Portanto, é necessário considerar a estabilidade e o tempo de vida útil do hidrogel quando utilizado em combinação com esses materiais. Além disso, a toxicidade dos componentes do hidrogel, biovidro e ranelato de estrôncio também deve ser levada em consideração (Treenate and Monvisade, 2017). Em nossos resultados observamos um padrão de intumescimento nas amostras, demonstrando que o hidrogel estudado é apto para a proposta e que na observação *in vitro* cumpriu o requisito para se considerar um meio de transporte local de medicação.

O SrR e o biovidro podem ter influência ativa na regulação óssea através da modulação de citocinas (Souza and Lerner, 2013), como a diminuição de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de citocinas anti-inflamatórias (Pilmane et al., 2017). Nos resultados obtidos pode-se observar a expressão das citocinas tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$) e com uma maior expressão das pró-inflamatórias mostrando o papel ativo nesta modulação óssea. No entanto, são necessários mais estudos para melhor compreender os mecanismos envolvidos e avaliar a eficácia desse material em modelos animais e, posteriormente, em ensaios clínicos.

As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias desempenham papéis fundamentais na regulação óssea. Essas moléculas são produzidas por células do sistema imunológico e outros tipos de células presentes no osso e em seu entorno, sendo responsáveis por modular as respostas inflamatórias e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea (Walters et al., 2018). Já em condições de alto turnover ósseo, como em processos inflamatórios, associada a outras citocinas como TNF- α e IL-1 β , seus efeitos sobre a atividade dos osteoclastos aparentam ser mais pronunciados (Jones et al., 2007). A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias, e apresenta importante papel protetor na perda óssea alveolar (Chen et al., 2018).

Realizamos apenas a análise do sobrenadante *in vitro*, o que não

necessariamente reflete o comportamento do hidrogel associado ao biovidro em um ambiente biológico real. Portanto, estudos adicionais, como testes em modelos animais, são necessários para validar os resultados encontrados.

Os limites dos ensaios *in vitro* incluem a incapacidade de reproduzir a liberação espacial e temporal de Sr dentro dos tecidos e o grande uso de linhagens celulares, que se assemelham a células ósseas primárias, mas não se comportam exatamente como células humanas primárias. Além disso, dentro dos estudos *in vitro/in vivo*, as doses de Sr devem se assemelhar à quantidade local liberada no osso após a administração de Sr, mas os valores fisiológicos são pouco conhecidos e reproduzidos experimentalmente.

7 CONCLUSÃO

A funcionalização de biomateriais com estrôncio para estratégias regenerativas ósseas demonstrou que existe a liberação de citocinas, tanto as pró-inflamatórias quanto as anti-inflamatórias. Assim, pode-se inferir que há influência na regeneração óssea local. Novas estratégias para incorporar estrôncio em biomateriais e controlar a liberação local são pontos necessários a serem abordados, para melhorar os sistemas de liberação reais e superar as limitações. Os testes exemplificaram que o material é biocompatível e tem sua degradação e intumescimento satisfatório para a aplicação local.

Os diversos estudos sobre o uso de biomateriais enriquecidos com estrôncio, demonstram o potencial de terapias avançadas de engenharia de tecidos na regeneração de fraturas ósseas. Biomateriais enriquecidos com estrôncio são confirmados como uma boa estratégia para administrar íons estrôncio evitando os problemas críticos sistêmicos do ranelato de estrôncio.

REFERÊNCIAS

- Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 2015; 6:105–21. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- Anam AK, Insogna K. Update on Osteoporosis Screening and Management. *Medical Clinics of North America* 2021; 105:1117–34. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2021.05.016>.
- Arioka M, Zhang X, Li Z, Tulu US, Liu Y, Wang L, et al. Osteoporotic Changes in the Periodontium Impair Alveolar Bone Healing. *J Dent Res* 2019; 98:450–8. <https://doi.org/10.1177/0022034518818456>.
- Borciani G, Ciapetti G, Vitale-Brovarone C, Baldini N. Strontium Functionalization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering Purposes: A Biological Point of View. *Materials* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ma15051724>.
- Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast–osteoclast interactions. *Connect Tissue Res* 2018; 59:99–107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>.
- Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *The Lancet* 2019; 393:364–76. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32112-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32112-3).
- Cui X, Zhang Y, Wang J, Huang C, Wang Y, Yang H, et al. Strontium modulates osteogenic activity of bone cement composed of bioactive borosilicate glass particles by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Bioact Mater* 2020; 5:334–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.016>.
- Del Valle LJ, Díaz A, Puiggalí J. Hydrogels for biomedical applications: Cellulose, chitosan, and protein/peptide derivatives. *Gels* 2017;3. <https://doi.org/10.3390/gels3030027>.
- Dimatteo R, Darling NJ, Segura T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2018; 127:167–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.03.007>.
- Falgayrac G, Farlay D, Ponçon C, Béhal H, Gardegaront M, Ammann P, et al. Bone matrix quality in paired iliac bone biopsies from postmenopausal women treated for 12 months with strontium ranelate or alendronate. *Bone* 2021; 153:116107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116107>.
- Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015;2015. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 2011; 23:613–9. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.006>.
- Gavinho SR, Pádua AS, Holz LIV, Sá-Nogueira I, Silva JC, Borges JP, et al. Bioactive Glasses Containing Strontium or Magnesium Ions to Enhance the

Biological Response in Bone Regeneration. *Nanomaterials* 2023;13.
<https://doi.org/10.3390/nano13192717>.

Gavinho SR, Hammami I, Jakka SK, Teixeira SS, Silva JC, Borges JP, et al. Influence of the Addition of Zinc, Strontium, or Magnesium Oxides to the Bioglass 45S5 Network on Electrical Behavior. *Materials* 2024;17.
<https://doi.org/10.3390/ma17020499>.

Ghani A, Arfee S. Role of Calcitonin and Strontium Ranelate in Osteoporosis. *Indian J Orthop* 2023; 57:115–9. <https://doi.org/10.1007/s43465-023-01034-x>.

González ACH, Jurado LT, Lorenzo LMR. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. *Carbohydr Polym* 2020;229.

Hilborn J. In vivo injectable gels for tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2011; 3:589–606. <https://doi.org/10.1002/WNAN.91>.

Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64:18–23. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.010>.

Hu C, Ashok D, Nisbet DR, Gautam V. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2019;219.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119366>.

Jones JA, Chang DT, Meyerson H, Colton E, II KK, Matsuda T, et al. Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83:585–96. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31221>.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 Dec;15(3):175-91. doi: 10.1016/0169-6009(91)90124-i. PMID: 1773131.

Kruppke B, Wagner AS, Rohnke M, Heinemann C, Kreschel C, Gebert A, et al. Biomaterial based treatment of osteoclastic/osteoblastic cell imbalance – Gelatin-modified calcium/strontium phosphates. *Materials Science and Engineering C* 2019;104. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109933>.

Liao C, Zhang C, Yang Y. Pivotal Roles of Interleukin-17 as the Epicenter of Bone Loss Diseases. *Curr Pharm Des* 2017; 23:6302–9.
<https://doi.org/10.2174/1381612823666170519120040>.

Liu Z, Xin W, Ji J, Xu J, Zheng L, Qu X, et al. 3D-Printed Hydrogels in Orthopedics: Developments, Limitations, and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.845342>.

Mahon OR, Browe DC, Gonzalez-Fernandez T, Pitacco P, Whelan IT, Von Euw S, et al. Nano-particle mediated M2 macrophage polarization enhances bone formation and MSC osteogenesis in an IL-10 dependent manner. *Biomaterials* 2020; 239:119833. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2020.119833>.

Meng F, Yu Y, Tian Y, Deng M, Zheng K, Guo X, et al. A potential therapeutic drug for osteoporosis: prospect for osteogenic lncRNAs. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1219433>.

Ningsih HS, Liu YC, Chen JW, Chou YJ. Effects of strontium dopants on the in vitro bioactivity and cytotoxicity of strontium-doped spray-dried bioactive glass microspheres. *J Non Cryst Solids* 2022;576. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.121284>.

Olsen BR, Reginato AM, Wang W. BONE DEVELOPMENT. vol. 16. 2000.

Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials* 2019;196:80–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>.

Pilmane M, Salma-Ancane K, Loca D, Locs J, Berzina-Cimdina L. Strontium, and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. *Materials Science and Engineering C* 2017a; 78:1222–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.042>.

Pires ACL, Moraes ES de, Rodrigues IFR e, Mota JVC, Freitas ML da C, Silva RQ da, et al. Prevenção à osteoporose em mulheres na pós-menopausa: uma revisão sistemática. *Research, Society and Development* 2022;11: e16811124667. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24667>.

Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/biom11050700>.

Reid IR. A broader strategy for osteoporosis interventions. *Nat Rev Endocrinol* 2020; 16:333–9. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0339-7>.

Shen X, Fang K, Ru Yie KH, Zhou Z, Shen Y, Wu S, et al. High proportion strontium-doped micro-arc oxidation coatings enhance early osseointegration of titanium in osteoporosis by anti-oxidative stress pathway. *Bioact Mater* 2022;10:405–19. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2021.08.031>.

Sheng X, Li C, Wang Z, Xu Y, Sun Y, Zhang W, et al. Advanced applications of strontium-containing biomaterials in bone tissue engineering. *Mater Today Bio* 2023; 20:100636. <https://doi.org/10.1016/J.MTBIO.2023.100636>.

Singh AK, Pramanik K, Biswas A. MgO enables enhanced bioactivity and antimicrobial activity of nano bioglass for bone tissue engineering application. *Materials Technology* 2019; 34:818–26. <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1638636>.

Snodgrass P, Zou A, Gruntmanis U, Gitajn IL. Osteoporosis Diagnosis, Management, and Referral Practice After Fragility Fractures. *Curr Osteoporos Rep* 2022;20:163–9. <https://doi.org/10.1007/S11914-022-00730-1>.

Song S, Guo Y, Yang Y, Fu D. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis. *Pharmacol Ther* 2022;237:108168. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2022.108168>.

Souza PPC, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest* 2013;42:555–622. <https://doi.org/10.3109/08820139.2013.822766>.

Treenate P, Monvisade P. In vitro drug release profiles of pH-sensitive hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogels using paracetamol as a soluble model drug. *Int J Biol Macromol* 2017; 99:71–8. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.02.061>.

Verdier EF, Saloux AL, Azzis OM, Lebullenger RM, Davit-Béal TA, Brézulier DY. Bioglass 45S5, a relevant alternative to autogenous harvesting for secondary alveolar bone grafts in clefts? Retrospective study of one hundred surgeries. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2024; 52:85–92. <https://doi.org/10.1016/J.JCMS.2023.12.005>.

Walters G, Pountos I, Giannoudis P V. The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: Current evidence. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12: e1662–77. <https://doi.org/10.1002/term.2593>.

Wang L, Zhang HJ, Liu Xueqian, Liu Y, Zhu X, Liu Xinhua, et al. A Physically Cross-Linked Sodium Alginate–Gelatin Hydrogel with High Mechanical Strength. *ACS Appl Polym Mater* 2021; 3:3197–205. <https://doi.org/10.1021/acsapm.1c00404>.

Wu D, Sun X, Zhao Y, Liu Y, Gan Z, Zhang Z, et al. Strontium Ranelate Inhibits Osteoclastogenesis through NF- κ B-Pathway-Dependent Autophagy. *Bioengineering* 2023;10. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030365>.

Xiao X, Cui Y, Lu H, Wang J, Yang J, Liu L, et al. Strontium ranelate enriched *Ruminococcus albus* in the gut microbiome of Sprague–Dawley rats with postmenopausal osteoporosis. *BMC Microbiol* 2023;23. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03109-z>.

Yang TL, Shen H, Liu A, Dong SS, Zhang L, Deng FY, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* 2020; 16:91–103. <https://doi.org/10.1038/S41574-019-0282-7>.

Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab* 2021; 39:2–11. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01175-1>.

You J, Zhang Y, Zhou Y. Strontium Functionalized in Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Prominent Role in Osteoimmunomodulation. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.928799>.

Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: A practical guide. *EXCLI J* 2020; 19:89–107. <https://doi.org/10.17179/excli2019-1990>.

Yu B, Wang CY. Osteoporosis and periodontal diseases – An update on their association and mechanistic links. *Periodontol 2000* 2022; 89:99–113. <https://doi.org/10.1111/PRD.12422>.

Yu H, Liu Y, Yang X, He J, Zhong Q, Guo X. The anti-inflammation effect of strontium ranelate on rat chondrocytes with or without IL-1 β in-vitro. *Exp Ther Med* 2022;23. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11131>.

Zarins J, Pilmane M, Sidhoma E, Salma I, Locs J. Immunohistochemical evaluation after Sr-enriched biphasic ceramic implantation in rabbit's femoral neck: comparison

of seven different bone conditions. *J Mater Sci Mater Med* 2018;29. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6124-7>.

Zhao DW, Liu C, Zuo KQ, Su P, Li LB, Xiao GY, et al. Strontium-zinc phosphate chemical conversion coating improves the osseointegration of titanium implants by regulating macrophage polarization. *Chemical Engineering Journal* 2021; 408:127362. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2020.127362>.

Zhao T, Chu Z, Ma J, Ouyang L. Immunomodulation Effect of Biomaterials on Bone Formation. *J Funct Biomater* 2022;13. <https://doi.org/10.3390/jfb13030103>.

ANEXO A – Título



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 03/2021, intitulado: SISTEMA DRUG DELIVERY EM HIDROGEL, INJETÁVEL E IMPRESSÃO 3D, PARA REPARO ÓSSEO EM RATAS OVARECTOMIZADAS, sob a responsabilidade de LUANA MAROTTA REIS DE VASCONCELLOS, tendo como colaboradores JULIANI CAROLINE RIBEIRO DE ARAÚJO SOUTO e LEONARDO ALVARES SOBRAL SILVA; e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 21/03/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	21/03/2022 a 28/03/2023
Espécie/Inocuidade	Rato heterotópico Wistar
Nº de Animais	89 (OITENTAE NOVE)
Peso/Idade	300 gr – 90 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Compromisso/Labatório(s)	Parcial -> Envio para a CEUA- 15/03/2022 Final -> Envio para a CEUA- 15/03/2023

São José dos Campos, 21 de março de 2022

Andrea Carvalho de Marco
Profa. Dra ANDREA CARVALHO DE MARCO
COORDENADORA CEUA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Denon
CEP 12281-979 – F. (12) 3463-4021 / 4076
Fax (12) 3463-4029 E-mail: andrea.marco@unesp.br