

FÁBIO ROBERTO DE SOUZA BATISTA

**SCAFFOLDS DE HIDROGÉIS DE DNA COMO ESTRATÉGIA PARA OTIMIZAR O
DRUG DELIVERY DE BMP-2: ESTUDOS PRÉ CLÍNICOS EM RATAS
OSTEOPORÓTICAS.**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP), Unidade
(Faculdade de Odontologia de Araçatuba)

Supervisora: Roberta Okamoto

PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO DA UNESP

Araçatuba/SP

2025

RESUMO

O objetivo deste projeto é avaliar, por meio de estudos pré-clínicos in vivo, estratégias de entrega de fármacos (drug delivery) utilizando hidrogéis e incorporando rh-BMP2 em dois modelos experimentais, visando otimizar o tecido ósseo reparacional em condições de osteoporose. O comprometimento sistêmico será induzido em ratas ovariectomizadas induzindo e mantendo a deficiência de estrógeno por 90 dias. Modelo 1: Consiste na funcionalização de implantes porosos que apresentam alterações na macrogeometria (com poros em seu terço médio), utilizando a técnica de Dip coating para aplicação de "drug delivery". Os implantes porosos serão tratados com hidrogéis de DNA e GelMA, bem como suas combinações com rh-BMP2, e implantados nos grupos SHAM (cirurgia fictícia) e OVX (ovariectomia). Após 28 dias, os procedimentos de análise dos tecidos descalcificados incluirão histologia, imunoistoquímica, análise biomecânica de torque de remoção, análise de expressão gênica de PCR em tempo real, e tecidos mineralizados: microtomografia computadorizada e Microscopia confocal, análise dinâmica óssea por fluorocromos. As amostras coletadas serão inclusas em metilmetacrilato (PMMA) para avaliação ultraestrutural da interface osso/implante no laboratório da Professora Kathryn Grandfield. Modelo 2: Visa avaliar o potencial regenerativo dos hidrogéis de DNA e GelMA, ambos funcionalizados com rh-BMP2, em um defeito ósseo criado na calvária e preenchido com os hidrogéis mencionados. Após 28 dias pós-operatórios, as calvárias serão coletadas e processadas para análises histológicas e imunoistoquímicas, RT-PCR, microtomografia computadorizada, microscopia confocal para avaliar a dinâmica reparacional óssea e avaliação ultraestrutural. Os dados coletados serão analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism 7.03, com um nível de significância de $p < 0,05$, para determinar a eficácia das intervenções nos processos de reparação e regeneração óssea nos diferentes modelos experimentais.

Palavras chaves: hidrogéis, osseointegração, interface osso implante, osteoporose.

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da osseointegração, crucial para a reabilitação oral, depende fortemente da qualidade e microarquitetura do tecido ósseo, incluindo fatores como a densidade óssea, essencial para suportar cargas fisiológicas [1]. Em casos de osteoporose, que se caracteriza pela redução da densidade óssea, a eficácia da integração do implante pode ser comprometida, afetando a estabilidade e a sua funcionalidade [2]. Além disso, nesse contexto de alteração do metabolismo ósseo, o comprometimento do reparo afeta diretamente a neoformação óssea e a aplicação de biomateriais em reconstruções de áreas atróficas que requerem implantes [3].

A osteoporose é uma das doenças metabólicas do esqueleto mais comuns e é caracterizada por baixa resistência óssea, atividade osteogênica reduzida e aumento da reabsorção pelos osteoclastos, elevando assim o risco de fraturas ósseas [4]. No tecido ósseo, ocorre um processo metabólico dinâmico de modelação e remodelação óssea. Os osteoblastos mediam o processo de modelação através da secreção de matriz óssea e da promoção da deposição de cálcio. Por outro lado, os osteoclastos mediam o processo de remodelação por meio da reabsorção da matriz óssea [5]. No entanto, o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea em pacientes com osteoporose é alterado, resultando em má osseointegração após a implantação de implantes [6].

Para superar as limitações dos tratamentos convencionais para osteoporose, a tecnologia de impressão 3D tem sido utilizada para desenvolver implantes com estruturas altamente porosas que não apenas reduzem a diferença de rigidez entre o titânio e o osso hospedeiro, mas também facilitam a incorporação de substâncias bioativas e promovem o crescimento ósseo [7,8]. Dessa forma, o uso da técnica dip coating para funcionalizar os implantes, associados à estrutura dos poros otimizada para entrega controlada de medicamentos, tem sido uma boa estratégia para melhorar o reparo ósseo peri-implantar [7,8].

Partindo do pressuposto de que uma adequada quantidade e qualidade de tecido ósseo são fundamentais para a instalação de implantes dentários, o uso de hidrogéis como carreadores osteoindutores e osteocondutores surge

como uma abordagem inovadora na regeneração tecidual em uma condição de osteoporose [9].

Os hidrogéis são geralmente descritos como redes tridimensionais extremamente hidrofílicas, constituídas por polímeros hidrofílicos que se unem através de crosslinks físicos ou químicos. Essa estrutura permite que eles retenham uma quantidade significativa de água, o que os torna ideais para várias aplicações na bioengenharia [10].

Dentre os diversos tipos de hidrogéis produzidos, o hidrogel de DNA [9], e a gelatina de metacriloil (GelMA) [11], destacam-se pela relevância. O hidrogel de DNA baseia-se nos princípios da nanotecnologia de DNA, exibindo uma aparência macroscópica de um gel tridimensional enquanto apresenta estruturas nanoescalares precisas de matrizes bioativas repetidas, o que facilita a mineralização orientada através de sua estrutura tridimensional, as bases nitrogenadas no DNA (adenina, timina, citosina e guanina) permitem uma personalização única do hidrogel [9,12]. A GelMA é produzida pela reação de anidrido metacrílico com gelatina derivada de colágeno, resultando em um biohidrogel de excelente biocompatibilidade [11]. Este pode ser polimerizado formando reticulações em uma estrutura tridimensional sob exposição à luz visível ou ultravioleta, oferecendo uma plataforma eficaz para o crescimento e diferenciação celular [13].

Nesse contexto, a funcionalização dos implantes porosos com os hidrogéis de DNA e GelMA representa uma técnica inovadora, visando atuar como scaffolds. Essa abordagem envolve a incorporação de biomoléculas em bases nitrogenadas e derivadas do colágeno, o que aprimora o controle sobre a mineralização tecidual. Tal capacidade de funcionalizar esses scaffolds permite interações mais específicas com o tecido ósseo reparacional, aumentando a eficiência dos processos de reparo ósseo [11,12].

A biomolécula selecionada para o presente estudo é a proteína morfogenética recombinante humana rh-BMP2. Estudos anteriores em nosso laboratório já exploraram o uso de BMP2 com diversos scaffolds, uma abordagem cuja menção se justifica pelo fato de já termos experimentado essa estratégia anteriormente, embora sem acesso às técnicas avançadas que agora propomos [14].

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), especialmente a rh-BMP2, são fatores de crescimento fundamentais na indução da diferenciação osteogênica de células-tronco tanto in vitro quanto na regeneração óssea in vivo [15]. A BMP-2, conhecida por sua alta osteogenicidade, já foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico e atua via sinalização SMAD para promover a expressão de genes relacionados à osteogênese [16]. Ela se liga a receptores específicos na membrana celular, iniciando uma cascata de vias que estimulam a formação óssea, sendo particularmente eficaz em tratar defeitos osteoporóticos [17]. Adicionalmente, a osteoprotegerina (OPG), uma glicoproteína que inibe a reabsorção óssea ao bloquear a atividade dos osteoclastos através do sistema RANKL/RANK/OPG, é crucial para controlar a atividade osteoclástica excessiva em ambientes osteoporóticos [18].

O estudo visa empregar técnicas avançadas, como o dip coating em implantes dentários, adaptados para tecidos ósseos afetados por osteoporose, utilizando uma estratégia de porosidade otimizada para melhorar a liberação de rh-BMP2 através de hidrogéis. Estamos explorando o uso de hidrogel de DNA, que contém bases nitrogenadas, como scaffold para rh-BMP2, facilitando a conexão e desconexão nos locais de reparo ósseo, como em defeitos de calvária. Além disso, avaliamos o GelMA, um hidrogel de gelatina metacrilóil derivado de colágeno, uma alternativa prática e de custo reduzido, como outro scaffold para rh-BMP2. Essas abordagens visam otimizar a entrega de rh-BMP2 em diferentes formatos, potencializando a regeneração óssea e o reparo peri-implantar.

2. OBJETIVOS

Avaliar estratégias relacionadas às características do implante que poderiam beneficiar a resposta de osseointegração perante a instalação de implantes em ratas ovariectomizadas com osteoporose, assim como avaliar o potencial regenerativo de hidrogéis de DNA funcionalizados com rh-BMP2,

atuando como scaffolds no processo de reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Etapas em comum para os modelos proposto nesse estudo:

A síntese e funcionalização dos hidrogéis de DNA e GelMA serão realizados em colaboração com a Professora Karina Carneiro (Universidade de Toronto).

Síntese do Hidrogel de DNA

Os hidrogéis de DNA serão montados em uma reação de duas etapas, com base no trabalho seminal de Luo e colaboradores [19]. A formação de hidrogel ocorre rapidamente à temperatura ambiente ao misturar dois construtos na proporção de 1:3 Y:L em tampão Tris-Ca. Essa formulação resulta em hidrogéis com cavidades de 24 nm, que permitem a permeabilidade de íons, enzimas e proteínas solúveis essenciais para o crescimento ósseo e a biodegradação do hidrogel em feridas. Ajustando a proporção de Y para L e o comprimento das sequências de DNA, é possível controlar precisamente a rigidez e a porosidade do hidrogel, características fundamentais para replicar as propriedades das matrizes de colágeno e otimizar os biomateriais.

Funcionalização dos hidrogéis de DNA

O DNA pode ser funcionalizado com moléculas e drogas promotoras de mineralização de maneira específica do local, e desta forma analisaremos este material funcionalizado com 5µg de rh-BMP2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Esta etapa usará a experiência de Carneiro em funcionalização específica de DNA e automontagem sob condições de mineralização. Seu laboratório tem experiência na adaptação de nanoestruturas de DNA que podem ser usadas em condições de mineralização. A bioconjugação permite que pequenas moléculas sejam adicionadas a superfície destas estruturas em posições específicas podendo servir como um veículo promissor para a entrega sustentável de moléculas

ativas, incluindo proteínas e drogas [12]. Nesse sentido, com a expertise da professora Karina na área, iremos funcionalizar sítios específicos do hidrogel de DNA isolado e com 5µg de rh-BMP2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Síntese de Hidrogel de gelatina de metacrilóil (GelMA)

A preparação do Hidrogel de Gelatina de Metacrilóil (GelMA) inicia com a dissolução da gelatina em água ou tampão fosfato (PBS) a temperaturas entre 50-60°C para assegurar homogeneidade. Segue-se a adição de anidrido metacrílico, cuja quantidade varia conforme o grau de funcionalização desejado, reagindo com os grupos amino da gelatina para criar ligações covalentes e introduzir grupos metacrilóil. É crucial monitorar e ajustar o pH entre 7,4 e 8,0 durante essa adição para garantir uma reação eficaz e evitar hidrólise. Após a reação, a solução é purificada por diálise contra água ou tampões para remover impurezas e monômeros não reagidos, seguida de liofilização para obter um pó seco e preservar as propriedades químicas do GelMA. Para formar o hidrogel, o pó liofilizado é dissolvido numa solução aquosa e fotocurado com luz UV na presença de um fotoiniciador como Irgacure 2959, ativando os grupos metacrilóil e formando uma rede polimérica reticulada [20].

Funcionalização do GelMA

Inicialmente, o GelMA liofilizado é dissolvido em PBS e aquecido para uma mistura homogênea. Após a preparação, 5 µg de rh-BMP2 são adicionados à solução de GelMA, juntamente com um fotoiniciador, como Irgacure 2959. A solução é então exposta à luz UV para induzir a reticulação e formação do hidrogel. Este hidrogel, agora incorporado com rh-BMP2, é destinado a aplicações que requerem promoção da osteogênese, como em implantes dentários ou reparos de defeitos ósseos, oferecendo um ambiente propício para o crescimento ósseo e a reparação tecidual. Colaboração com a Professora Karina Carneiro (Universidade de Toronto).

Animais

Os procedimentos a serem executados no presente projeto serão realizados com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA: Processo FOA 0549/2021) desta instituição. Os ratos, ao início do experimento terão a idade de 3 meses, serão mantidas em biotério climatizado e com ciclo claro/escuro a cada 12 horas e receberão água *ad libitum*.

Cálculo amostral e randomização

O cálculo do tamanho da amostra para os estudos será determinado a partir de um teste de poder realizado no site <http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm> (OpenEpi, Versão 3, calculadora de código aberto), onde o nível de significância utilizado é de 5% e o poder de 95% em um teste de hipótese unicaudal [8].

A randomização será realizada usando o software Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA) e os animais serão aleatoriamente designados aos grupos SHAM ou OVX, e distribuídos conforme os modelos propostos nesse estudo. Todas as amostras finais coletadas serão aleatoriamente designadas para as análises propostas, de maneira que os pesquisadores não interfiram na escolha.

Modelo 1 (Implante porosos em tibia)

Implantes porosos (impressos na Universidade de McMaster, Grandfield Research Group) - utilizados para o modelo de osteoporose

Para os estudos *in vivo* com os modelos de deficiência de estrógeno, osteoporose, serão utilizados implantes com alteração na macrogeometria pela presença de poros no seu terço medial. A porção porosa dos implantes biomiméticos foi projetada utilizando a tesselação de Voronoi, que consiste na dispersão de pontos em um espaço finito a partir do qual um polígono cresce para fora, expandindo-se a uma taxa constante para preencher um espaço. O crescimento termina quando poliedros vizinhos colidem uns com os outros. Implantes medindo 2 mm de diâmetro, 4 mm de comprimento com um núcleo sólido para conferir suporte à estrutura e exterior poroso, com trabéculas de 300 µm, mimetizando trabéculas naturais de ratas osteoporóticas, serão impressos em titânio comercialmente puro grau IV em uma impressora de

fusão à laser seletiva (SLS) EOS M280 [21,22]. Todos os implantes, após a impressão, serão submetidos ao duplo ataque ácido com ácido clorídrico e ácido sulfúrico.

Funcionalização dos implantes – Dip Coating

Os implantes serão funcionalizados através da técnica de incorporação: Dip-coating que consiste imersão dos implantes porosos em uma solução com a finalidade de formar camadas ao redor dos implantes. Serão realizadas 5 camadas ao redor dos implantes porosos de acordo com a necessidade observada através dos testes preliminares, dessa forma o maior número de camadas garante que durante a inserção dos implantes no leito cirúrgico a funcionalização da superfície não seria perdida [23]. A funcionalização dos implantes porosos será realizada com hidrogéis: de DNA e GelMA e associações DNA + rh-BMP2 e GelMA + rh-BMP2 para serem instalados nos grupos SHAM (cirurgia fictícia), subgrupos: Implante Poroso + DNA; Implante Poroso + GelMA; Implante Poroso + DNA/rh-bmp2; Implante Poroso + GelMA/rh-BMP2 e OVX (ovariectomia) Implante Poroso + DNA; Implante Poroso + GelMA; Implante Poroso + DNA/rh-bmp2; Implante Poroso + GelMA/rh-BMP2. Após a formação das 5 camadas e secagem adequada dos implantes os mesmos foram instalados nos animais.

Modelo de osteoporose:

Ovariectomia bilateral

As ratas do grupo OVX serão anestesiadas com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e cloridrato de cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir, serão imobilizadas sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito lateral. Após a antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo, será realizada uma incisão de 1 cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, serão localizados os ovários e os cornos uterinos que serão laqueados com fio de poliglactina. Feito isso, será realizada a remoção dos ovários e posteriormente, a sutura em planos, com o mesmo fio de sutura. As ratas do grupo SHAM serão submetidas ao mesmo procedimento, no entanto, será

realizada a exposição cirúrgica dos cornos uterinos e dos ovários sem suas respectivas laqueadura e remoção [24].

Delineamento experimental

Para investigar o processo de reparo peri-implantar em condições osteoporóticas, será utilizado um modelo experimental com ratas Wistar adultas de 3 meses. Essas ratas, selecionadas após a verificação de um ciclo estral normal [25], serão submetidas a uma ovariectomia bilateral ou cirurgia fictícia (SHAM). Após 90 dias, os implantes porosos, funcionalizados com hidrogéis de DNA e/ou GelMA, associados ou não ao rh-BMP2, serão instalados. Aos 28 dias após a instalação, proceder-se-á à eutanásia dos animais para diversas análises.

Serão coletadas amostras para PCR em tempo real, mensuração do torque de remoção (TR) e obtenção de tíbias para confecção de cortes histológicos descalcificados destinados à análise imunoistoquímica. Estas análises visam avaliar a expressão gênica de proteínas envolvidas no reparo ósseo e a resistência biomecânica dos implantes, além das respostas peri-implantares de formação, reabsorção e mineralização óssea. Além disso, será feita a análise da ultraestrutura da interface osso-implante usando microscopia eletrônica de transmissão (MET) de alta resolução e tomografia de feixe de íons focados em plasma (PFIB), que mapeará as redes minerais, celulares e vasculares em micro e nanoescala.

Outra parcela dos animais receberá injeções de fluorocromos — calceína aos 14 dias e alizarina aos 24 dias pós-operatórios — para estudos adicionais sobre a dinâmica dos eventos de formação e mineralização óssea. Por fim, será realizada microtomografia computadorizada (micro-CT) e microscopia confocal (MC) para analisar a microarquitetura do osso peri-implantar.

Grupos experimentais

Serão incluídas no estudo ratas de 3 meses de idade, com peso corporal de 300 gramas. Essas serão mantidas em biotério climatizado, com ciclo claro/escuro a cada 12 horas, recebendo ração balanceada, contendo 1.4% Ca e 0.8% P, e água *ad libitum*. As 192 ratas serão separadas em 2 grandes

grupos, sendo o grupo SHAM o grupo em que as ratas serão submetidas à cirurgia fictícia e o grupo OVX, em as ratas serão submetidas à ovariectomia bilateral. Em cada grande grupo serão utilizados implantes porosos. Cada grupo de implante receberá funcionalizações de hidrogéis (DNA e/ou GelMA) com ou sem rh-BMP2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). Tabela1, e linha do tempo (Figura1).

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos a serem realizados.

GRUPO	IMPLANTE	Ovariectomia	Drug delivery	n
SHAM	Poroso	Fictícia	Hidrogel DNA	12
	Poroso	Fictícia	Hidrogel GelMA	12
	Poroso	Fictícia	DNA/rhBMP2	12
	Poroso	Fictícia	GelMA/rhBMP2	12
OVX	Poroso	✓	Hidrogel DNA	12
	Poroso	✓	Hidrogel GelMA	12
	Poroso	✓	DNA/rhBMP2	12
	Poroso	✓	GelMA/rhBMP2	12



Figura 1. Modelo 1 – Linha do tempo.

Instalação de implante na tíbia

Serão instalados os implantes impressos vindos da McMaster University (96 sólidos e 96 porosos), para o modelo de osteoporose, implantes de titânio comercialmente puro grau IV, com superfície tratada por duplo ataque ácido; todos os implantes possuem as mesmas medidas: diâmetro de 2 mm e comprimento de 4 mm e serão esterilizados por raios gama.

Quanto ao procedimento cirúrgico, a fresagem será realizada com uma fresa espiral de 1.6 mm de diâmetro, atingindo as corticais superior e inferior, e uma fresa de 2.0 mm na cortical superior e na porção medular, que serão

montadas em um motor elétrico, a uma velocidade de 1000 rpm, sob constante irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% e contra-ângulo com redução 20:1. Cada animal receberá um implante em cada metáfise tibial. Os tecidos serão suturados em planos utilizando fio absorvível, com pontos contínuos no plano profundo e com fio monofilamentar, com suturas interrompidas no plano mais externo. No período pós-operatório imediato, cada animal receberá uma única dose intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina.

Aplicação de fluorocromos para análise de microscopia confocal

Para histometria dinâmica, aos 14 e 24 dias após a instalação dos implantes. Os animais receberão 20 mg/kg de calceína [26] e 30 mg/kg de alizarina [27], respectivamente. Ambas as substâncias são fluorocromos que apresentam afinidade com o cálcio durante o processo de precipitação sobre a matriz óssea. O intervalo de 10 dias entre as injeções é determinado para que seja avaliada a precipitação mineral diária (*mineral apposition rate*).

Eutanásia dos animais

Os animais serão submetidos à eutanásia por overdose de anestésico e as amostras serão coletadas para a realização das análises propostas.

Aleatorização da seleção das amostras que serão destinadas às análises propostas

Será utilizado um software para que seja aleatória a seleção das amostras que serão destinadas às análises de PCR e contra torque (mesma amostra), imunoistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão, tomografia de feixe de íons focados em plasma, microtomografia computadorizada e microscopia confocal.

Modelo 2 (Defeito ósseo crítico em calvária)

Delineamento experimental para defeito crítico de calvária

Serão utilizados 96 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Os hidrogéis de DNA e GelMA associados a proteína rh-BMP2 serão

administrados localmente com a finalidade de preencher o defeito crítico realizado nas calvárias dos animais. As análises propostas para este estudo serão divididas nas seguintes análises: microtomografia computadorizada, microscopia confocal, análise biomecânica, histológica, imunoistoquímica e biologia molecular por PCR em tempo real.

No tempo zero, os animais selecionados serão submetidos à cirurgia de defeito crítico em calvária. Serão realizados três períodos de eutanásia sendo o primeiro período de eutanásia 3 dias após o procedimento cirúrgico, o segundo período 10 dias após o procedimento cirúrgico e o terceiro período 28 dias após o procedimento cirúrgico.

As calvárias obtidas dos animais eutanasiados no período de 3 dias serão submetidas à análise histológica e imunoistoquímica. As calvárias obtidas dos animais eutanasiados no período de 10 dias serão submetidas a análise histológica, imunoistoquímica, molecular por pcr em tempo real e microtomografia computadorizada. As calvárias obtidas dos animais eutanasiados no período de 28 dias serão submetidas a análise histológica, imunoistoquímica, molecular por pcr em tempo real, microtomografia computadorizada e microscopia confocal.

Todos os grupos experimentais com período de eutanásia de 28 dias receberão a injeção intramuscular de Calceína (20mg/kg) após 14 dias da cirurgia de defeito crítico em calvária, os mesmos animais receberão injeção intramuscular de alizarina (20mg/kg) 24 dias após a cirurgia de defeito crítico em calvária. As injeções dos fluorocromos objetivam avaliar a dinâmica óssea através da microscopia confocal.

Com 28 dias os animais serão anestesiados e o osso formado na região do defeito previamente criado será coletado para posterior realização análise molecular por PCR tempo real, com o intuito de avaliar a expressão relativa de genes envolvidos no processo reparacional. Os demais animais serão submetidos a sobredosagem anestésica para realização da eutanásia. As calvárias serão devidamente organizadas e parte das calvárias serão destinadas para as análises referente aos calcificados enquanto que as demais serão destinadas para os descalcificados. Os calcificados compreendem as análises de microtomografia computadorizada e microscopia confocal enquanto os descalcificados compreendem as análises

histológica e imunoistoquímica. As calvárias destinadas para os calcificados serão submetidas ao escaneamento através do microtomógrafo computadorizado (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) seguido do armazenamento das imagens reconstruídas e processamento pelos softwares para avaliação morfométrica do tecido ósseo reparacional. Após a realização da MicroCT as amostras serão desidratadas para que seja feita a análise da dinâmica óssea através dos fluorocromos por microscopia confocal. As calvárias destinadas para os descalcificados serão descalcificadas e a seguir incluídas em parafina para a obtenção de cortes histológicos. Os grupos SHAM e OVX experimentais avaliados serão os seguintes: DNA defeito ósseo crítico preenchido somente com o hidrogel de DNA; GelMA defeito ósseo crítico preenchido somente com hidrogel GelMA; DNA/rh-BMP2, Hidrogel de DNA funcionalizado com rh-BMP2; GelMA/rh-BMP2, Hidrogel GelMA funcionalizado com rh-BMP2. (Tabelas 2) (Figura2)

Tabela 2. Divisão dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos a serem realizados.

GRUPO	Subgrupo	Ovariectomia	Drug delivery	n
SHAM	DNA	Ficticia	Hidrogel DNA	12
	GelMA	Ficticia	Hidrogel GelMA	12
	DNA/rh-BMP2	Ficticia	DNA/rhBMP2	12
	GelMA/rh-BMP2	Ficticia	GelMA/rhBMP2	12
OVX	DNA	✓	Hidrogel DNA	12
	GelMA	✓	Hidrogel GelMA	12
	DNA/rh-BMP2	✓	DNA/rhBMP2	12
	GelMA/rh-BMP2	✓	GelMA/rhBMP2	12



Figura 2. Modelo 2 – Linha do tempo

Cirurgia de defeito crítico de calvária

Antes da cirurgia, os animais ficarão em jejum por oito horas e receberão uma combinação de 50mg/kg de Ketamina e 5mg/kg de cloridrato de xilazina para sedação, além de 0.3 ml/kg de cloridrato de mepivacaína para anestesia local e hemostasia. Na sala cirúrgica, após tricotomia e antisepsia da região craniana com PVPI, uma incisão semilunar de aproximadamente 2 cm será realizada com uma lâmina número 15, e o tecido mole será afastado para expor o osso. Um defeito de 5mm será criado na região parietal direita usando uma broca trefina sob irrigação salina. Dependendo do grupo de tratamento, o defeito será preenchido com hidrogel de DNA simples ou funcionalizado com rh-BMP2, ou com hidrogel GelMA simples ou funcionalizado com rh-BMP2. A sutura será realizada em duas camadas, usando fio absorvível internamente e monofilamentar externamente. Após a operação, os animais receberão uma dose de Penicilina G-benzatina e serão mantidos em gaiolas individuais com acesso livre a comida e água durante o estudo.

Processamento laboratorial para tecidos calcificados

As amostras destinadas a análise de tecidos calcificados serão fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas e serão imersas em álcool 70, para que seja realizado o escaneamento pelo microtomógrafo computadorizado. Após a obtenção das imagens reconstruídas tridimensionalmente, estas mesmas amostras passarão pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 80, 90, 95 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 3 dias. As peças em desidratação serão colocadas em agitador orbital (KLine CT – 150, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil) todos os dias durante 4 horas. Ao término da desidratação, as peças serão imersas em mistura de álcool 100 e metilmetacrilato em diferentes concentrações, até que se utilize apenas a resina como meio de imersão. As peças serão incluídas em metilmetacrilato associado a peróxido de benzoíla 1% (catalisador) em tubos de ensaio, mantidos em estufa a 60°C. Após 5 dias, polimerizada a resina, as amostras serão lixadas até que se obtenham cortes na espessura de 100 µm, para posterior montagem em lâmina. Neste momento, as lâminas serão analisadas em microscopia confocal (para avaliação dos fluorocromos).

Processamento laboratorial para tecidos descalcificados

As amostras destinadas a análise de tecidos descalcificados serão fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 10% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. As peças obtidas serão incluídas em parafina separadamente e receberão cortes de 6µm de espessura e serão montadas em lâminas histológicas para que seja realizada a coloração de hemaroxilina e eosina e a reação de imunoistoquímica.

Análises:

Análise biomecânica (torque de remoção)

A análise biomecânica será destinada apenas ao modelo 1 (implante em tibia), realizada nos períodos de 28 dias após a instalação dos implantes. Em cada período os animais serão sedados com uma combinação intramuscular de 50 mg/kg de cetamina (Vetaset - Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser - Laboratório Calier do Brasil Ltda - Osasco, São Paulo, Brasil). Em seguida, as tíbias serão acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante será adaptado a fenda do implante e o torquímetro digital será acoplado ao monta-implante. Será aplicado movimento anti-horário, aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registre o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm) [28].

Análise molecular (PCR em tempo real)

Nos modelos 1 e 2, serão conduzidas análises de expressão gênica usando PCR em tempo real para investigar o reparo ósseo em períodos pós-operatórios específicos. No modelo 1, com implantes em tibia, fragmentos ósseos serão coletados aos 28 dias, lavados em PBS, congelados e o RNA extraído com Trizol. O cDNA sintetizado a partir deste RNA será usado para avaliar a expressão de genes como Osteoprotegerina, RANKL, Osteopontina,

entre outros. No modelo 2, envolvendo defeito ósseo em calvária, as amostras serão obtidas por trefinação e analisadas para genes como Runx-2 e Fosfatase Alcalina. O PCR seguirá um protocolo que inclui ciclos de aquecimento e resfriamento para amplificação genética [29]. A quantificação da expressão gênica nos dois modelos será feita pelo método $\Delta\Delta CT$, referenciando proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizando pela expressão nos tecidos em reparação. Essas medidas, feitas em quadruplicata, permitirão uma análise detalhada e robusta das alterações moleculares durante o reparo ósseo peri-implantar e nos defeitos ósseos críticos [29].

Análise imunoistoquímica

Nos modelos 1 e 2, que visam explorar a dinâmica do reparo ósseo, serão realizadas análises imunoistoquímicas detalhadas. No Modelo 1 (implantes em tibia), as tíbias serão coletadas 28 dias após a instalação dos implantes e submetidas a um protocolo rigoroso que inclui fixação em formaldeído, desmineralização em EDTA, seguida de desidratação, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Os cortes de 5 μm resultantes serão usados para imunomarcagem de proteínas como runx2, ALP, OPN, Wnt e beta catenina usando detecção por imunoperoxidase, com etapas adicionais de desparafinização, hidratação e bloqueio de atividades enzimáticas. A visualização será feita com Diaminobenzidina e contra-coloração com Hematoxilina de Harris [30]. O Modelo 2 (defeito ósseo em calvária) seguirá um procedimento similar para a imunomarcagem de proteínas como Runx-2, Fosfatase Alcalina, Osteopontina, entre outros. Em ambos os modelos, a expressão proteica será avaliada usando uma escala ordinal de intensidade de marcação e os resultados serão verificados com o teste Kappa para assegurar a precisão das avaliações [30].

Análise ultraestrutural e multiescala

Nos modelos 1 (implantes em tibia) e 2 (defeito ósseo crítico em calvária), análises ultraestruturais e multiescala serão realizadas aos 28 dias o procedimento cirúrgico. O osso, um tecido hierárquico e tridimensional composto de hidroxiapatita e fibrilas de colágeno em nanoescala, será

examinado para entendermos o reparo ósseo peri-implantar. Utilizaremos a tomografia de feixe de íons focados em plasma (PFIB), que, diferentemente da micro-CT, não requer rotação dos espécimes e permite fresagem e captura de imagens sequenciais, reconstruindo-as em volumes 3D. Esta técnica detalha gradientes minerais e mapeia redes celulares e vasculares [31]. Adicionalmente, amostras serão preparadas com molde de resina para examinar a distribuição e orientação de osteócitos peri-implantar em 3D, investigando a influência das biomoléculas locais. A microscopia eletrônica de transmissão (MET), assistida por FIB para preparação de cortes finos, avaliará contrastes composicionais e mudanças na densidade mineral óssea, além de realizar tomografia eletrônica quando necessário para analisar a arquitetura em nanoescala. Esta abordagem integrada fornecerá insights profundos sobre os mecanismos de osseointegração e o impacto das intervenções nos tecidos ósseos [32].

Micro tomografia computadorizada

Após 28 dias da instalação dos implantes no modelo 1 (implantes em tíbia) e da criação de defeitos ósseos no modelo 2 (defeito ósseo em calvária), as amostras serão fixadas em formaldeído a 10% por 48 horas, lavadas por 24 horas e armazenadas em álcool 70%. Seguindo-se a isso, as tíbias do modelo 1 e as amostras de calvária do modelo 2 serão submetidas à microtomografia computadorizada, utilizando cortes de 8 μm e 12 μm , respectivamente, com ajustes específicos de filtros e rotação. As imagens capturadas serão processadas usando o software NRecon para definir as áreas de interesse e ajustadas no Data Viewer para assegurar a uniformidade nos planos transversal, longitudinal e sagital. Através do CTAnalyser, as Regiões de Interesse (ROI) serão demarcadas ao redor dos implantes com uma margem de 0,5 mm no modelo 1 e 5 mm de diâmetro no defeito crítico no modelo 2. Os parâmetros microarquiteturais, incluindo porcentagem de volume ósseo (BV/TV), espessura de trabéculas (Tb.th), número de trabéculas (Tb.N), separação entre trabéculas (Tb.S), porosidade total (Po.Tot), superfície de interseção (I.S.) e densidade de conectividade (Conn.Den.), serão avaliados para refletir a qualidade do osso ao redor dos implantes e a regeneração

óssea nos dois modelos. Conforme os protocolos de Bouxsein et al. 2010 para a avaliação da microarquitetura óssea em roedores [33].

Microscopia confocal (histometria dinâmica)

Nos estudos dos modelos 1 e 2, as amostras de implantes em tíbia e defeitos ósseos críticos, após serem microtomografadas, passarão por um processo de preparação para análise histológica detalhada. Inicialmente, serão desidratadas e imersas em uma solução de álcool 100% e metilmetacrilato, gradativamente substituído por resina, e posteriormente encapsuladas em metilmetacrilato com peróxido de benzoíla, curadas a 60°C por cinco dias. Após a cura, as amostras serão lixadas para obter cortes de 100 µm de espessura e montadas em lâminas para análise em microscopia confocal.

Usando microscopia confocal a laser, as lâminas serão examinadas para capturar imagens detalhadas, com secções de 2µm escaneadas por 2,5 minutos, produzindo múltiplos cortes. Os cortes serão analisados com o auxílio de fluorocromos, como calceína e alizarina, para marcar e distinguir as fases de mineralização óssea, identificando áreas de nova mineralização e regiões mais antigas. A análise das sobreposições de fluorocromos revelará as dinâmicas de formação e reabsorção óssea, permitindo quantificar o turnover ósseo.

A partir das imagens, será calculada a superfície ativa de mineralização e estimada a taxa de deposição mineral diária (MAR) pela distância entre as faixas de fluorocromos. Esses dados proporcionarão uma avaliação quantitativa de parâmetros como o volume ósseo total, a superfície mineralizada e a taxa de formação óssea, oferecendo uma visão compreensiva dos efeitos dos tratamentos e dos processos de regeneração óssea nos modelos estudados [34].

Análise estatística

Os dados obtidos a partir das análises serão submetidos a análise estatística pelo software GGraphPad Prisma 7.03. Todos os dados coletados serão submetidos, primeiramente, a um teste de homocedasticidade para

determinação da normalidade (Graph Pad Prism 7.03). A seguir, o teste apropriado, paramétrico ou não paramétrico, será utilizado para a comparação entre os diferentes grupos. Sempre que possível, two way ANOVA será considerado. O nível de significância será de $p < 0,05$.

Referências

- 1- Rajaeirad M, Fakharifar A, Posti MHZ, Khorsandi M, Watts DC, Elraggal A, Ouldryerou A, Merdji A, Roy S. Evaluating the effect of functionally graded materials on bone remodeling around dental implants. *Dent Mater*. 2024 Apr 13:S0109-5641(24)00068-X. doi: 10.1016/j.dental.2024.04.002. Epub ahead of print. PMID: 38616152.
- 2- Heimes D, Becker P, Pabst A, Smeets R, Kraus A, Hartmann A, Sagheb K, Kämmerer PW. How does dental implant macrogeometry affect primary implant stability? A narrative review. *Int J Implant Dent*. 2023 Jul 5;9(1):20. doi: 10.1186/s40729-023-00485-z. PMID: 37405709; PMCID: PMC10323072.
- 3- Tabrizi R, Shafiei S, Moslemi H, Dastgir R, Peacock ZS. Impact of Osteoporosis on Autogenous Bone Graft Resorption. *J Oral Maxillofac Surg*. 2024 Mar 27:S0278-2391(24)00203-9. doi: 10.1016/j.joms.2024.03.021. Epub ahead of print. PMID: 38615693.
- 4- Li SY, Xue ST, Li ZR. Osteoporosis: Emerging Targets on the Classical Signaling Pathways of Bone Formation. *Eur J Pharmacol*. 2024 Apr 18:176574. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.176574. Epub ahead of print. PMID: 38642670.
- 5- Guo, W., Li, H., Lou, Y., Zhang, Y., Wang, J., Qian, M., et al. (2021). Tyloxapal Inhibits RANKL-Stimulated Osteoclastogenesis and Ovariectomized-Induced Bone Loss by Restraining NF-kappaB and MAPK Activation. *J. Orthop. Translat* 28, 148–158. doi:10.1016/j.jot.2021.01.005.
- 6- Toepfer, E. T., Rott, J., Bartosova, M., Kolevica, A., Machuca-Gayet, I., Heuser, A., et al. (2021). Calcium Isotope Fractionation by Osteoblasts and Osteoclasts, across Endothelial and Epithelial Cell Barriers and with Binding to Proteins. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 321 (1), R29–R40. doi:10.1152/ajpregu.00334.2020.
- 7- Wang X, Li Z, Wang Z, Liu H, Cui Y, Liu Y, Ren M, Zhan H, Li Z, Wu M, Wang J. Incorporation of Bone Morphogenetic Protein-2 and Osteoprotegerin in 3D-Printed Ti6Al4V Scaffolds Enhances Osseointegration Under Osteoporotic Conditions. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Nov 4;9:754205. doi: 10.3389/fbioe.2021.754205. PMID: 34805113; PMCID: PMC8600075.
- 8- Gomes-Ferreira PHS, Frigério PB, de Moura J, Duarte ND, de Oliveira D, Deering J, Grandfield K, Okamoto R. Evaluation of Vitamin D isolated or Associated with Teriparatide in Peri-Implant Bone Repair in Tibia of Orchiectomized Rats. *Biology (Basel)*. 2023 Jan 31;12(2):228. doi: 10.3390/biology12020228. PMID: 36829506; PMCID: PMC9952949.

- 9- Athanasiadou D, Meshry N, Monteiro NG, Ervolino-Silva AC, Chan RL, McCulloch CA, Okamoto R, Carneiro KMM. DNA hydrogels for bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023 Apr 25;120(17):e2220565120. doi: 10.1073/pnas.2220565120. Epub 2023 Apr 18. PMID: 37071684; PMCID: PMC10151614.
- 10-Nie R, Zhang QY, Feng ZY, Huang K, Zou CY, Fan MH, Zhang YQ, Zhang JY, Li-Ling J, Tan B, Xie HQ. Hydrogel-based immunoregulation of macrophages for tissue repair and regeneration. *Int J Biol Macromol*. 2024 Apr 19:131643. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131643. Epub ahead of print. PMID: 38643918.
- 11-Gaglio CG, Baruffaldi D, Pirri CF, Napione L, Frascella F. GelMA synthesis and sources comparison for 3D multimaterial bioprinting. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024 Mar 25;12:1383010. doi: 10.3389/fbioe.2024.1383010. PMID: 38590606; PMCID: PMC10999536.
- 12-Athanasiadou D, Carneiro KMM. DNA nanostructures as templates for biomineralization. *Nat Rev Chem*. 2021 Feb;5(2):93-108. doi: 10.1038/s41570-020-00242-5. Epub 2021 Jan 13. PMID: 37117611.
- 13-Ju Y, Hu Y, Yang P, Xie X, Fang B. Extracellular vesicle-loaded hydrogels for tissue repair and regeneration. *Mater Today Bio*. 2022 Dec 21;18:100522. doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100522. PMID: 36593913; PMCID: PMC9803958.
- 14-Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3855-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.076. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21376389.
- 15-Baek HJ, Kim IH, Yun PY, Kim YK. Prognosis of single tooth implants following alveolar ridge preservation with two recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivery systems. *BMC Oral Health*. 2021 Apr 20;21(1):201. doi: 10.1186/s12903-021-01565-5. PMID: 33879162; PMCID: PMC8059292.
- 16-Chao YL, Wang TM, Chang HH, Lin LD. Effects of low-dose rhBMP-2 on peri-implant ridge augmentation in a canine model. *J Clin Periodontol*. 2021 May;48(5):734-744. doi: 10.1111/jcpe.13440. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33544419.
- 17-Wang Z, Bao HW, Xu YJ. Cnidium lactone prevents bone loss in an ovariectomized rat model through the estrogen- α /BMP-2/Smad signaling pathway. *J Gene Med*. 2020 Aug;22(8):e3198. doi: 10.1002/jgm.3198. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32267602.
- 18-Hauser B, Zhao S, Visconti MR, Riches PL, Fraser WD, Piec I, Goodson NJ, Ralston SH. Autoantibodies to Osteoprotegerin are Associated with Low Hip Bone Mineral Density and History of Fractures in Axial Spondyloarthritis: A Cross-Sectional Observational Study. *Calcif Tissue Int*. 2017 Oct;101(4):375-383. doi: 10.1007/s00223-017-0291-2. Epub 2017 May 22. PMID: 28534161; PMCID: PMC5587630.
- 19-Um, S.H., et al. Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel. *Nat Mater* 5, 797-801 (2006).

- 20-Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*. 2015 Dec;73:254-71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045. Epub 2015 Aug 28. PMID: 26414409; PMCID: PMC4610009.
- 21-Deering, J., Dowling, K. I., DiCecco, L. A., McLean, G. D., Yu, B., & Grandfield, K. (2021). Selective Voronoi tessellation as a method to design anisotropic and biomimetic implants. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 116, 104361.
- 22-Fantini, M., Curto, M., 2018. Interactive design and manufacturing of a Voronoi-based biomimetic bone scaffold for morphological characterization. *Int J Interact Des Manuf Ijidem* 12 (2), 585–596.
- 23-Nesabi M, Valanezhad A, Safaee S, Odatsu T, Abe S, Watanabe I. A novel multi-structural reinforced treatment on Ti implant utilizing a combination of alkali solution and bioactive glass sol. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2021 Dec;124:104837. doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104837. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34601434.
- 24-Silva WPPD, Santos JMFE, Souza MC, Barbosa S, Santos AMS, Ervolino E, Bassi APF, Sukotjo C, Faverani LP. Ozone therapy improves early stages of osseointegration in ovariectomized rats. *J Appl Oral Sci*. 2024 Mar 25;32:e20230172. doi: 10.1590/1678-7757-2023-0172. PMID: 38536992; PMCID: PMC11018298.
- 25-LONG J.A.; EVANS H.M. The estorus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer.Calif.*, v. 6, p. 1-148, 1922
- 26-Ramalho-Ferreira, Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto, T.; Okamoto, R. alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics* 2015; 20(3):038003.
- 27-Pitol-Palin, L.; de Souza-Batista, F.R.; Gomes-Ferreira, P.H.S.; Mulinari-Santos, G.; Ervolino, E.; Ávila-Souza, F.; Matsushita, D.H.; Okamoto, R. Different stages of alveolar bone repair process are compromised in the type 2 diabetes condition: an experimental study in rats. *Biology*. 2020. 9. 471
- 28-Wajima CS, Pitol-Palin L, de Souza Batista FR, Dos Santos PH, Matsushita DH, Okamoto R. Morphological and biomechanical characterization of long bones and peri-implant bone repair in type 2 diabetic rats treated with resveratrol. *Sci Rep*. 2024 Feb 4;14(1):2860. doi: 10.1038/s41598-024-53260-4. PMID: 38310154; PMCID: PMC10838324.
- 29-Inoue BKN, Paludetto LV, Monteiro NG, Batista FRS, Kitagawa IL, da Silva RS, Antoniali C, Lisboa Filho PN, Okamoto R. Synergic Action of Systemic Risedronate and Local Rutherfordy in Peri-implantar Repair of Ovariectomized Rats: Biomechanical and Molecular Analysis. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 10;24(22):16153. doi: 10.3390/ijms242216153. PMID: 38003342; PMCID: PMC10671386.

- 30-Pitol-Palin L, Frigério PB, Moura J, Pilatti L, de Oliveira LMJ, Matsubara EY, Tunchel S, Shibli JA, Blay A, Saska S, Okamoto R. Performance of Polydioxanone-Based Membrane in Association with 3D-Printed Bioceramic Scaffolds in Bone Regeneration. *Polymers (Basel)*. 2022 Dec 21;15(1):31. doi: 10.3390/polym15010031. PMID: 36616379; PMCID: PMC9823904.
- 31-Binkley, D. M., Deering, J., Yuan, H., Gourrier, A., & Grandfield, K. (2020). Ellipsoidal mesoscale mineralization pattern in human cortical bone revealed in 3D by plasma focused ion beam serial sectioning. *Journal of structural biology*, 212(2), 107615.
- 32-Micheletti, C.; Gomes-Ferreira, P.H.S.; Casagrande, T.; Lisboa-Filho, P.N.; Okamoto, R.; Grandfield, K. From tissue retrieval to electron tomography: nanoscale characterization of the interface between bone and bioactive glass. *Journal Royal Society Interface* 18. 2021
- 33-Bouxsein, M.L.; Boyd, S.K.; Christiansen, B.A.; Guldberg, R.E.; Jepsen, K.J.; Muller, R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research* (2010 25(7):1468-1486.
- 34-Ramalho-Ferreira, Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto, T.; Okamoto, R. alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics* 2015; 20(3):038003.

4. ATIVIDADES REALIZADAS

Justificativa

Durante o período de vigência da bolsa de pós-doutorado, diversas atividades experimentais e técnicas foram conduzidas com o objetivo de investigar a aplicação de hidrogéis de DNA funcionalizados na regeneração óssea. Inicialmente, a proposta envolvia a utilização da proteína recombinante humana BMP-2 (rh-BMP2), porém sua instabilidade em meio ao DNA levou à formação de complexos insolúveis, inviabilizando sua aplicação. Esse fenômeno decorre da forte interação eletrostática entre as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA e as cargas variáveis da proteína, resultando em alterações conformacionais e posterior agregação.

Diante desse desafio, optou-se pela substituição da molécula de rh-BMP2 por estrôncio (Sr), elemento com propriedades osteoindutivas já bem

estabelecidas na literatura. O estrôncio foi previamente incorporado ao hidrogel de DNA de forma estável e controlada, favorecendo a continuidade do projeto sem prejuízo aos objetivos científicos.

Como suporte à substituição, destaca-se o artigo: Fernandes E, Oliveira HF, Addison O, et al. Strontium-containing mineralized phospholipid coatings improve osseointegration in osteoporotic rats. J Biomed Mater Res A. 2025;113(1):e37782. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.37782>.

Revisão Bibliográfica

Foi conduzida uma revisão sistematizada da literatura com foco nas estratégias de funcionalização de biomateriais, nos mecanismos de mineralização óssea mediados por íons metálicos como o estrôncio e nas aplicações dos hidrogéis de DNA em engenharia tecidual. A revisão embasou as decisões metodológicas do projeto, especialmente no redirecionamento da funcionalização do hidrogel com rh-BMP2 para o uso do íon Sr^{2+} .

Atividades Desenvolvidas

Durante o desenvolvimento do projeto, foram realizadas atividades experimentais em duas frentes principais: (1) síntese e funcionalização de hidrogéis de DNA com estrôncio, e (2) avaliação biológica in vivo da aplicação desses hidrogéis em modelos de defeito ósseo crítico e instalação de implantes em tibia. A seguir, descrevem-se as etapas conduzidas.

ANIMAIS

O projeto iniciou após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal, Processo FOA nº 700-2024.

Avaliação Piloto com Implantes Porosos e Redefinição da Estratégia Experimental

Inicialmente, a proposta previa o uso de implantes porosos para a avaliação da funcionalização de superfície com hidrogéis, com foco nas características macroestruturais e na viabilidade de sua aplicação durante o ato cirúrgico. Para esse fim, foi realizado um teste-piloto que permitiu observar a funcionalização com os hidrogéis e seu comportamento intraoperatório. Com base nas observações obtidas nesse experimento preliminar, optou-se por redirecionar a estratégia experimental para o uso de implantes com menor diâmetro e comprimento, disponíveis no laboratório. Essa mudança foi fundamentada na necessidade de reduzir o volume de hidrogel por unidade implantada, especialmente considerando as particularidades do hidrogel de DNA, que apresenta alta sensibilidade à manipulação, dificuldade de estabilização e disponibilidade limitada no contexto deste projeto. Diferentemente do GelMA, o hidrogel de DNA requer condições mais delicadas de manuseio, o que reforçou a escolha por implantes de menor dimensão como forma de otimizar a funcionalização por imersão e aposição, garantindo a integridade e aplicabilidade do biomaterial nas condições propostas.



Imagem 1: Sequência de instalação de implante em tibia, 2x4mm sólido e poroso.

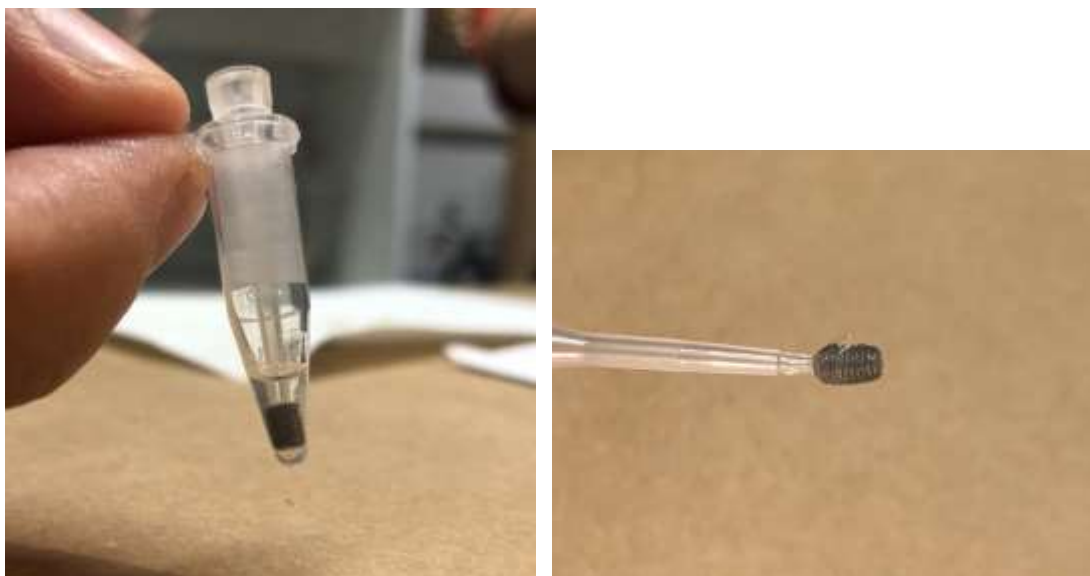


Imagem 2 e 3: Funcionalização por imersão e por aposição direta.

Padronização Experimental da Cirurgia e Funcionalização dos Implantes

Foi realizada a padronização de um protocolo cirúrgico para instalação de implantes na tíbia de ratos Wistar, com o objetivo de avaliar a funcionalização de superfície com hidrogéis. Para a confecção do leito ósseo, utilizou-se uma fresa helicoidal de 1,1 mm de diâmetro, acoplada a um contra-ângulo com redução de 20:1, operando a 1.100 rotações por minuto (RPM). Essa configuração permitiu a perfuração controlada da tíbia, minimizando o aquecimento local e preservando a viabilidade do tecido ósseo.

Os implantes utilizados foram confeccionados em titânio, com dimensões reduzidas (1,4 mm de diâmetro × 2,7 mm de comprimento), de modo a otimizar a aplicação e estabilização dos hidrogéis na superfície dos dispositivos. A instalação foi realizada com o auxílio de uma chave digital especialmente desenvolvida para o estudo. Todos os componentes – implantes, fresas e chaves – foram produzidos exclusivamente para este projeto, assegurando padronização e controle experimental.

A funcionalização da superfície dos implantes foi conduzida por duas abordagens distintas: (1) por imersão em hidrogel de GelMA e (2) por aposição direta do hidrogel de DNA. Ambas as estratégias foram previamente testadas em modelos-piloto, permitindo a avaliação da distribuição, adesão e estabilidade dos

hidrogéis durante o ato operatório. O protocolo de funcionalização encontra-se atualmente em fase de padronização final para aplicação em modelos in vivo.



Imagem 4: Sequência de instalação de implante convêncional 1.4x2.7mm.



Imagem 5 e 6: Funcionalização por imersão.

Síntese e Funcionalização dos Hidrogéis de DNA

A síntese dos hidrogéis de DNA foi realizada em colaboração com o laboratório da Profª Karina Carneiro (Universidade de Toronto), com base no protocolo descrito por Um et al. (2006), utilizando fitas simples Y1, Y2, Y3 e reticuladores L1/L1'. A formulação empregada com razão Y:L de 1:1,5 proporcionou uma degradação controlada em 15 dias. A funcionalização com estrôncio foi conduzida pela bioconjugação de íons Sr^{2+} em sítios específicos da estrutura, com o objetivo de induzir atividade osteogênica localizada.

ETAPA CIRÚRGICA – MODELO DE IMPLANTE EM TÍBIA

Até a presente data, foi concluída a etapa cirúrgica referente ao modelo experimental de implante em tíbia. Foram utilizadas 24 ratas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas), com instalação bilateral dos implantes, totalizando 48 sítios de análise. Os animais foram distribuídos igualmente entre três grupos

experimentais: SHAM convencional (n = 16), DNA puro (n = 16) e DNA funcionalizado com estrôncio (n = 16). Os períodos experimentais definidos para eutanásia e coleta dos espécimes foram de 10 e 28 dias pós-operatórios.

As análises planejadas para os diferentes grupos e períodos incluem: avaliação biomecânica por torque reverso, análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR), caracterização estrutural por microtomografia computadorizada (Micro-CT) e avaliação morfométrica tecidual por microscopia confocal.

Modelo de Defeito Crítico em Calvária

A engenharia tecidual tem explorado a associação de scaffolds, células e fatores de crescimento como abordagem promissora para a regeneração óssea (Ye et al., 2020). Entre os materiais emergentes, destaca-se o DNA como arcabouço de mineralização, capaz de recrutar cátions inorgânicos e formar estruturas tridimensionais organizadas, favorecendo a biomineralização (Athanasiadou et al., 2021). Em estudos prévios, nosso grupo avaliou o DNA na proporção 1:3 com resultados favoráveis. Na presente etapa, aprimoramos sua formulação para a proporção 1:1,5, visando uma degradação controlada em cerca de 15 dias, o que permite associação a biomoléculas osteoindutivas.

O estrôncio é um cátion com ação dual no metabolismo ósseo — estimula osteoblastos e inibe osteoclastos — mas seu uso clínico é limitado por efeitos adversos (You et al., 2022; Kargozar et al., 2019). Estratégias nanotecnológicas têm buscado melhorar sua segurança e eficácia (Liu et al., 2022; Tarantino et al., 2017). Nesse contexto, avaliamos o potencial de hidrogéis de DNA funcionalizados com estrôncio no reparo de defeitos ósseos críticos de 5mm em calvária de ratos.

Foram utilizados 33 ratos Wistar machos, alocados em dois grupos experimentais: DNA (hidrogel de DNA puro) e DNA-Sr (hidrogel de DNA funcionalizado com estrôncio). Após cirurgia para criação do defeito crítico (5mm), o hidrogel correspondente foi implantado. Os animais foram subdivididos por tempo de eutanásia: 10 dias (análises histológicas, imunoistoquímica e PCR), 28 dias (histologia, imunoistoquímica, PCR, micro-CT e fluorocromos) e 60 dias (mesmas análises do grupo 28D). Para avaliação fluorocromática, foram

administradas calceína (14 ou 45 dias) e vermelho de alizarina (24 ou 55 dias) conforme o grupo. A eutanásia foi conduzida por sobredosagem anestésica. Este projeto foi desenvolvido em colaboração com a Profa. Karina Carneiro (Universidade de Toronto), responsável pela síntese do DNA e pelos experimentos in vitro.

5. RESULTADOS

Análise de Expressão Gênica (qPCR em Tempo Real)

A coleta das amostras ósseas foi realizada com o auxílio de uma trefina de 8 mm de diâmetro, acoplada a um motor cirúrgico em baixa rotação, permitindo a remoção completa do tecido ósseo em reparação presente na região do defeito. Os fragmentos coletados foram imediatamente lavados com solução tampão PBS estéril e, em seguida, congelados em nitrogênio líquido para preservação do RNA.

A extração do RNA total foi conduzida utilizando o reagente Trizol® (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade, integridade e concentração do RNA extraído foram analisadas previamente à transcrição reversa. Para a síntese do cDNA, utilizou-se 1 µg de RNA em uma reação com transcriptase reversa M-MLV (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

As reações de PCR em tempo real foram preparadas com o TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) e distribuídas em placas de 96 poços (96-well fast thermal cycling plates, Life Technologies). A detecção da expressão gênica foi realizada utilizando sondas TaqMan™ Gene Expression Assays específicas para os genes de interesse relacionados ao reparo ósseo: **Runx2**, **IBSP**, **osteocalcina (OCN)**, **fosfatase alcalina (ALP)** e **TRAP**.

As reações foram conduzidas no sistema de detecção Quantum 3 (Applied Biosystems) sob as seguintes condições:

- Pré-incubação: 50 °C por 2 minutos
- Desnaturação inicial: 95 °C por 10 minutos
- Amplificação: 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto
- Curva de melting (desnaturação padrão)

A expressão relativa dos genes foi calculada com base no método $\Delta\Delta CT$, utilizando como referência interna genes constitutivos (proteínas ribossômicas mitocondriais). A normalização foi realizada com base na expressão obtida nos diferentes grupos experimentais e períodos de reparação. Todas as reações foram conduzidas em quadruplicata para garantir reprodutibilidade e robustez estatística dos resultados.

RESULTADOS QPCR TEMPO REAL – PERÍODO 10 DIAS

Expressão Gênica – Runx2

Foram adotados como grupos controle os grupos **BUFFER** e **CO-DNA-Sr**, que receberam, respectivamente, os tampões TRIS-Ca²⁺ e TRIS-Sr²⁺ — veículos utilizados na formulação dos hidrogéis de DNA. Além disso, como o DNA funcionalizado com estrôncio (Sr) foi produzido na proporção 1:3, o grupo **DNA 1/3** foi incluído para avaliação comparativa do desempenho da funcionalização com Sr²⁺.

Na análise de expressão do gene **Runx2**, marcador precoce de diferenciação osteoblástica, observou-se maior expressão relativa no grupo BUFFER. Em comparação aos demais grupos experimentais, os níveis de expressão de Runx2 foram significativamente reduzidos nos grupos DNA 1/3, CO-DNA Sr e DNA Sr.

Diferenças estatísticas significantes foram identificadas entre os seguintes pares de grupos:

- BUFFER vs DNA 1/3
- BUFFER vs CO-DNA Sr
- BUFFER vs DNA Sr

Estes dados sugerem que a presença do hidrogel, tanto funcionalizado quanto não funcionalizado, influencia negativamente a expressão do fator de transcrição Runx2, ao menos no período analisado.

Gráfico 1. Expressão relativa do gene Runx2 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

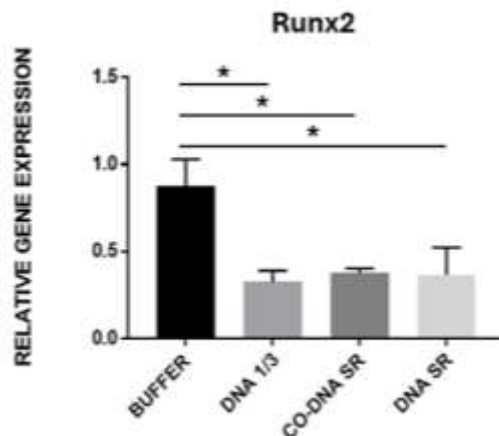


Gráfico 1. Expressão relativa do gene Runx2 nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido pelo pós-teste de Tukey, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

Expressão Gênica – IBSP

A expressão do gene IBSP (Bone Sialoprotein), um marcador intermediário da mineralização óssea, foi significativamente maior no grupo BUFFER, quando comparado aos demais grupos experimentais.

Diferenças estatísticas significantes foram observadas entre os seguintes pares de grupos:

- BUFFER vs DNA 1/3
- BUFFER vs CO-DNA Sr
- BUFFER vs DNA Sr
- DNA 1/3 vs CO-DNA Sr
- DNA 1/3 vs DNA Sr

Esses resultados sugerem que, embora a expressão de IBSP tenha sido reduzida na presença dos hidrogéis de DNA, a funcionalização com estrôncio promoveu recuperação parcial da expressão desse gene, especialmente no grupo CO-DNA Sr.

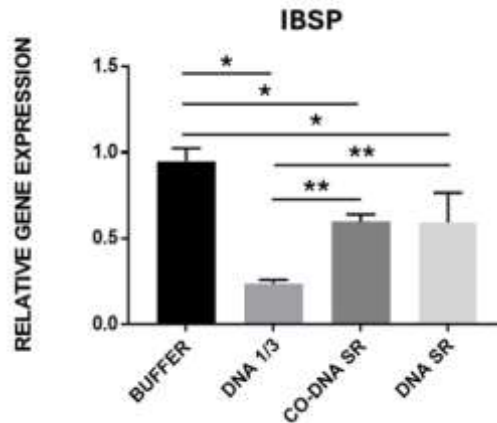


Gráfico 2. Expressão relativa do gene IBSP nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Tukey. Nível de significância adotado: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Expressão Gênica – Osteocalcina (OCN)

A análise da expressão do gene OCN (osteocalcina), um marcador tardio de diferenciação osteoblástica e mineralização, demonstrou que o grupo DNA Sr apresentou os maiores níveis de expressão gênica relativa entre todos os grupos avaliados.

Diferenças estatisticamente significantes foram identificadas entre os seguintes pares:

- BUFFER vs DNA 1/3
- BUFFER vs DNA Sr
- DNA 1/3 vs DNA Sr
- CO-DNA Sr vs DNA Sr
-

Estes resultados indicam que a funcionalização do hidrogel de DNA com estrôncio promoveu um estímulo relevante à expressão de OCN, evidenciando seu potencial papel anabólico no processo de formação óssea.

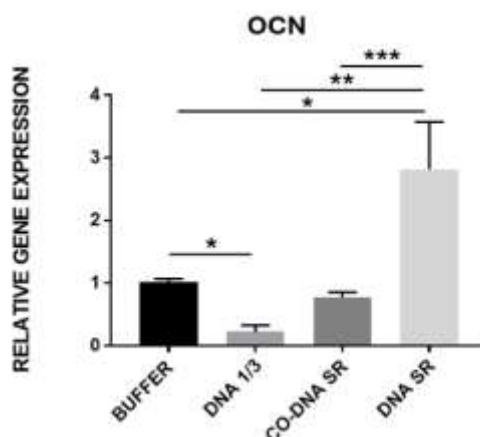


Gráfico 3. Expressão relativa do gene OCN nos diferentes grupos experimentais. Análise estatística realizada por ANOVA one-way, seguida de pós-teste de Tukey. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Expressão Gênica – Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) é um marcador clássico da atividade osteoblástica, especialmente nas fases iniciais da mineralização. O grupo DNA Sr apresentou os maiores níveis de expressão gênica relativa de ALP entre todos os grupos experimentais.

Foi observada diferença estatisticamente significante entre os grupos:

- CO-DNA Sr vs DNA Sr (***)

Esse resultado indica que a funcionalização do hidrogel de DNA com estrôncio promoveu um aumento expressivo na atividade osteogênica, evidenciada pela elevação da expressão de ALP.

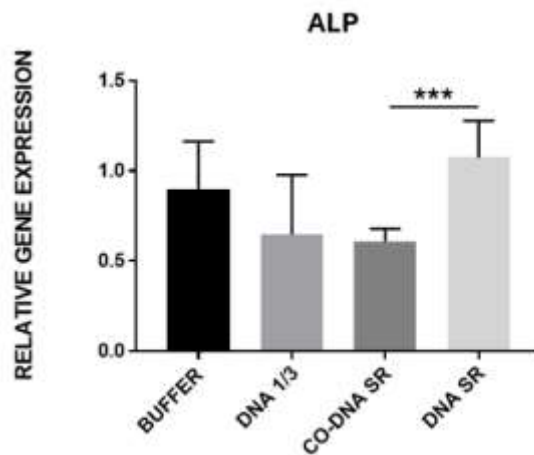


Gráfico 4. Expressão relativa do gene **ALP** nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,001$ (***).

Expressão Gênica – TRAP

O gene TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) está relacionado à atividade osteoclástica e à reabsorção óssea. Na presente análise, o grupo BUFFER apresentou os maiores valores de expressão gênica relativa de TRAP.

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos:

- BUFFER vs DNA 1/3 (*)
- BUFFER vs DNA Sr (*)

Esses achados indicam que os hidrogéis de DNA, especialmente quando funcionalizados com estrôncio, contribuíram para a diminuição da atividade osteoclástica no local de reparo, sugerindo um possível efeito anti-reabsortivo do biomaterial.

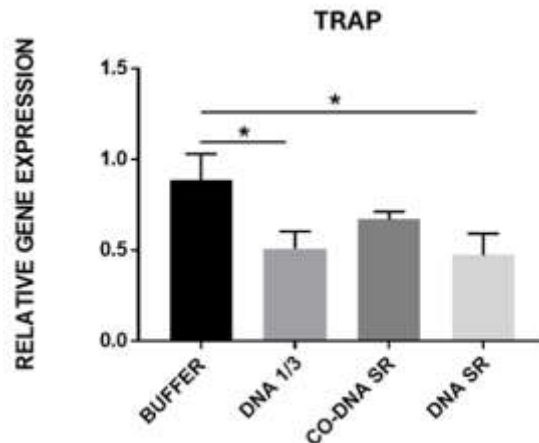


Gráfico 5. Expressão relativa do gene TRAP nos diferentes grupos experimentais. Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,05$ (*).

Análise Tridimensional – Microtomografia Computadorizada (Micro-CT) – 28 dias

As calvárias destinadas à análise tridimensional foram previamente reduzidas e armazenadas em álcool 70%. Para avaliação da neoformação óssea, as amostras foram submetidas à varredura em sistema de microtomografia computadorizada (SkyScan), com cortes de 9 μ m, uso de filtros de cobre e alumínio, e rotação de 0,3 mm por passo.

As imagens adquiridas foram processadas no software NRecon, onde foi determinada a região de interesse (ROI). A reconstrução e o posicionamento padronizado das imagens tridimensionais foram realizados no Data Viewer, permitindo visualização nos planos transversal, longitudinal e sagital. Posteriormente, a análise quantitativa foi conduzida no software CTAnalyser (CTAn), com ROI de 0,5 mm ao redor de todo o defeito.

O intervalo de limiar (threshold) utilizado foi de 25 a 90 tons de cinza, o que possibilitou a quantificação precisa do volume de osso neoformado.

Foram analisados os seguintes parâmetros morfométricos:

- BV/TV (%): volume ósseo / volume total da ROI
- Tb.Th: espessura trabecular
- Tb.N: número de trabéculas
- Tb.Sp: separação entre trabéculas

Os dados foram submetidos a análise estatística no software GraphPad Prism 7.01, após teste de homoscedasticidade, utilizando

ANOVA one-way seguida do pós-teste de Tukey (nível de significância $p < 0,05$).

Volume Ósseo (BV/TV)

Os grupos tratados com hidrogéis de DNA apresentaram aumento na porcentagem de volume ósseo em relação aos controles, com destaque para o grupo DNA 1/3, que obteve os maiores valores médios. Diferenças estatísticas significantes foram observadas entre os pares:

- BUFFER vs DNA 1/3 (*)
- BUFFER vs CO-DNA Sr (*)
- DNA 1/3 vs CO-DNA Sr (**)
- DNA 1/3 vs DNA Sr (**)
- CO-DNA Sr vs DNA Sr (***)

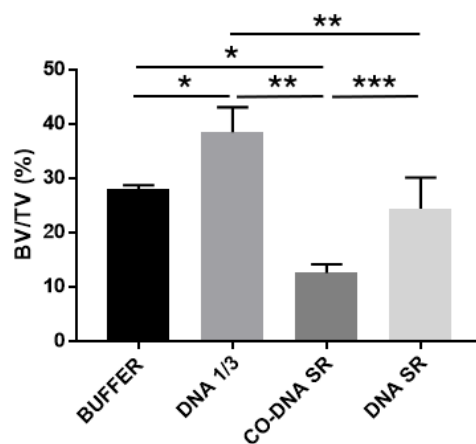


Gráfico 6. Porcentagem de volume ósseo (BV/TV) nos diferentes grupos experimentais obtida por micro-CT. Análise estatística por ANOVA one-way, seguida do pós-teste de Tukey. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Espessura Trabecular (Tb.Th)

A espessura trabecular (Tb.Th) é um parâmetro estrutural importante na caracterização da qualidade óssea. Entre os grupos avaliados, o grupo DNA 1/3 apresentou os maiores valores médios de Tb.Th.

Diferenças estatísticas significantes foram observadas entre os grupos:

- BUFFER vs DNA 1/3 (*)
- DNA 1/3 vs CO-DNA Sr (**)
- DNA 1/3 vs DNA Sr (**)

Estes dados indicam que o hidrogel de DNA na proporção 1:3 favoreceu uma formação trabecular mais espessa, característica desejável em processos de regeneração óssea.

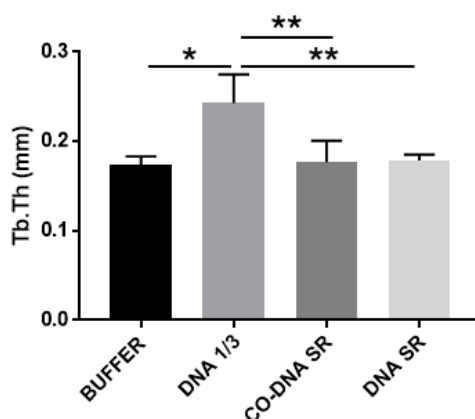


Gráfico 7. Espessura trabecular (Tb.Th) nos diferentes grupos experimentais. Os valores foram obtidos por análise microtomográfica (micro-CT), processados via ANOVA one-way e pós-teste de Tukey. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**).

Número de Trabéculas (Tb.N)

O número de trabéculas por milímetro (Tb.N) é um parâmetro morfométrico associado à densidade trabecular e à integridade estrutural do tecido ósseo. O grupo DNA 1/3 apresentou os maiores valores médios de Tb.N entre os grupos analisados.

Diferenças estatísticas significantes foram observadas entre:

- BUFFER vs CO-DNA Sr (**)
- DNA 1/3 vs CO-DNA Sr (*)
- CO-DNA Sr vs DNA Sr (***)
-

Os resultados demonstram que tanto o DNA 1/3 quanto o DNA Sr favoreceram a manutenção ou aumento do número de trabéculas, ao contrário do grupo CO-DNA Sr, que apresentou menor desempenho.

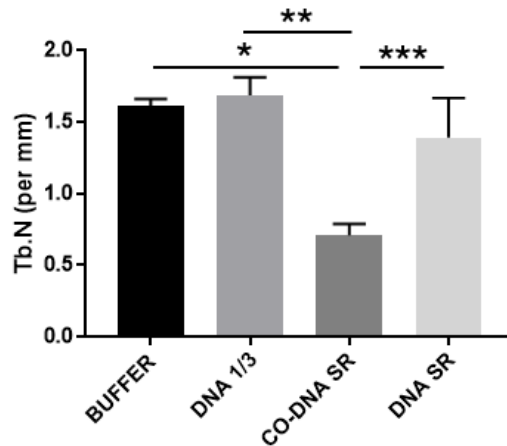


Gráfico 8. Número de trabéculas (Tb.N) por milímetro nos diferentes grupos experimentais. Os valores foram obtidos por micro-CT e analisados por ANOVA one-way, com pós-teste de Tukey. Níveis de significância: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Separação Trabecular (Tb.Sp)

A separação trabecular (Tb.Sp) é um parâmetro morfológico que avalia a distância média entre as trabéculas, sendo inversamente proporcional à densidade óssea trabecular. O grupo **CO-DNA Sr** apresentou os maiores valores médios de Tb.Sp entre os grupos avaliados.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre:

- **BUFFER vs CO-DNA Sr (*)**

Esse aumento na separação entre trabéculas no grupo CO-DNA Sr pode sugerir uma menor capacidade de manutenção da arquitetura trabecular em comparação ao grupo controle.

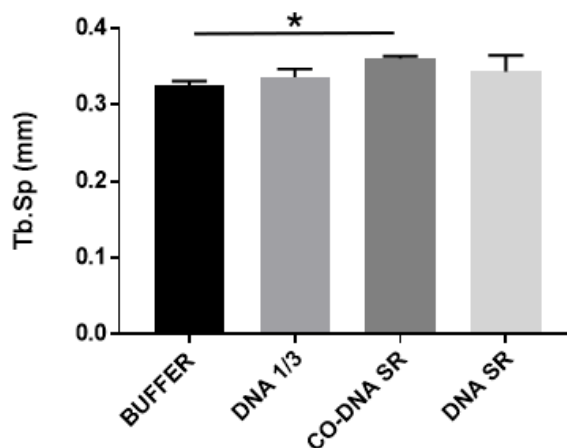


Gráfico 9. Separação trabecular (Tb.Sp) nos diferentes grupos experimentais. Análise realizada por micro-CT e submetida ao teste ANOVA one-way com pós-teste de Tukey. Nível de significância: $p < 0,05$ (*).

6. DISCUSSÃO

A proposta de utilizar DNA como material de construção em nanoescala surgiu no início da década de 1980, por iniciativa do Prof. Ned Seeman, a partir de suas propriedades únicas, como pareamento específico de bases, sequenciamento programável e estrutura secundária previsível (Chen et al., 2022). Desde então, diversos arranjos bidimensionais e tridimensionais foram construídos com sucesso, consolidando o DNA como um bloco estrutural versátil na nanotecnologia.

A programabilidade do DNA permite, além do controle estrutural, o ajuste de propriedades macroscópicas dos hidrogéis formados, como permeabilidade, comportamento mecânico e dinâmica molecular (Li et al., 2024). Em comparação com outros tipos de hidrogéis, os hidrogéis de DNA oferecem vantagens singulares, incluindo elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade controlada e propriedades mecânicas ajustáveis (Peng et al., 2024). Essas características os tornam candidatos promissores como scaffolds na engenharia de tecidos, especialmente por sua semelhança funcional com a matriz extracelular (Chen et al., 2022).

Para avaliação da biocompatibilidade e desempenho biológico desses materiais, modelos ortotópicos animais representam uma abordagem experimental mais translacional (Spicer et al., 2012). O modelo de defeito crítico em calvária, utilizado neste estudo, é amplamente validado para a investigação da regeneração óssea, pois evita a necessidade de estabilização mecânica, comum em modelos de fraturas em ossos longos, e permite análises histológicas, microtomográficas e moleculares reprodutíveis (Samsonraj et al., 2017).

Neste contexto, os hidrogéis de DNA investigados mostraram não apenas potencial como matriz de cultura in vitro, mas também eficácia na reparação de defeitos ósseos críticos (Wu et al., 2024). A presença de células MCO dispersas sobre os hidrogéis indica adesão e possível migração celular, sugerindo boa integração celular e compatibilidade com o microambiente (Athanasiadou et al., 2023). Essa interação celular, por sua vez, é dependente da permeabilidade molecular do hidrogel — uma propriedade essencial para aplicações biomédicas e já descrita como diferencial dos hidrogéis de DNA (Li et al., 2024).

A aplicação desses hidrogéis na regeneração óssea visa superar limitações dos enxertos convencionais, como escassez de doador, risco de infecção e integração limitada ao sítio receptor (Athanasiadou et al., 2023). Nos ensaios in vitro, observamos a degradação dos hidrogéis em presença de soro, provavelmente atribuída à ação de nucleases. Tal fenômeno também pode ocorrer in vivo, embora o perfil de degradação seja influenciado por concentrações variáveis de DNase e seus inibidores nos diferentes compartimentos fisiológicos (Athanasiadou et al., 2023).

Nos experimentos in vivo, os hidrogéis de DNA foram aplicados em defeitos críticos de calvária sem induzir resposta inflamatória significativa. Nas análises microtomográficas, foi possível observar formação de osso trabecular nos grupos tratados com os hidrogéis, com melhora nos parâmetros de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Tb.N) e espessura trabecular (Tb.Th), em comparação ao grupo controle. No entanto, a funcionalização com estrôncio não promoveu melhora adicional nesses parâmetros, sendo os melhores resultados observados no grupo tratado com DNA não funcionalizado.

Por outro lado, a análise de expressão gênica por PCR em tempo real revelou que a adição de estrôncio estimulou marcadores relacionados à mineralização óssea, como IBSP e ALP, além de promover maior expressão de osteocalcina (OCN), o que sugere um potencial efeito anabólico e antirreabsortivo do estrôncio. Ainda, a menor expressão de

TRAP nos grupos com hidrogel funcionalizado indica possível inibição da reabsorção óssea.

Diante das limitações dos métodos convencionais de administração de fármacos — frequentemente marcados por efeitos colaterais sistêmicos e baixa eficácia terapêutica local —, os hidrogéis de DNA despontam como sistemas promissores de liberação controlada (Wu et al., 2024; Athanasiadou et al., 2023). Sua capacidade de reter e liberar biomoléculas de forma localizada e sustentada pode não apenas otimizar o efeito terapêutico, mas também mitigar a toxicidade.

O estrôncio foi escolhido por seu reconhecido efeito anabólico sobre o tecido ósseo (Liu et al., 2022), embora seu uso sistêmico seja limitado por eventos adversos (Tarantino et al., 2017). Neste cenário, a administração local surge como alternativa viável. Apesar dos resultados microtomográficos não indicarem melhora com a funcionalização, os dados moleculares sugerem que o estrôncio incorporado ao hidrogel atua positivamente sobre a biologia óssea, indicando que ajustes na concentração ou tempo de liberação poderão potencializar os efeitos observados em estudos futuros.

Referências Bibliográficas

- Athanasiadou D, Meshry N, Monteiro NG, Ervolino-Silva AC, Chan RL, McCulloch CA, Okamoto R, Carneiro KMM. DNA hydrogels for bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(17):e2220565120. doi: 10.1073/pnas.2220565120.
- Chen C, Zhou J, Chen J, Liu H. Advances in DNA Supramolecular Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromol Biosci*. 2022;22(12):2200152. doi: 10.1002/mabi.202200152.
- Li Y, Chen R, Zhou B, Dong Y, Liu D. Rational Design of DNA Hydrogels Based on Molecular Dynamics of Polymers. *Adv Mater*. 2024;36(7):2307129. doi: 10.1002/adma.202307129.
- Liu L, Zhang Z, Aimaijiang M, Liu M, Huang L, Pan Z, Liu S, Qi S, Zhang X, Wang H, Li D, Zhou Y. Strontium-Incorporated Carbon Nitride

Nanosheets Modulate Intracellular Tension for Reinforced Bone Regeneration. *Nano Lett.* 2022;22(23):9723–9731. doi: 10.1021/acs.nanolett.2c04078.

- Peng G, Li W, Peng L, Li R, Wang Z, Zhou Y, et al. Multifunctional DNA-Based Hydrogel Promotes Diabetic Alveolar Bone Defect Reconstruction. *Small.* 2024;20(10):2305594. doi: 10.1002/smll.202305594.
- Samsonraj RM, Dudakovic A, Zan P, Pichurin O, Cool SM, van Wijnen AJ. A Versatile Protocol for Studying Calvarial Bone Defect Healing in a Mouse Model. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(11):686–693. doi: 10.1089/ten.TEC.2017.0234.
- Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918–1929. doi: 10.1038/nprot.2012.113.
- Tarantino U, Iolascon G, Cianferotti L, et al. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. *J Orthop Traumatol.* 2017;18(Suppl 1):3–36. doi: 10.1007/s10195-017-0474-7.
- Wu R, Li W, Yang P, Shen N, Yang A, Liu X, et al. DNA hydrogels and their derivatives in biomedical engineering applications. *J Nanobiotechnol.* 2024;22(1):518. doi: 10.1186/s12951-024-02412-0.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Scaffolds de Hidrogéis de DNA como estratégia para otimizar o drug delivery de BMP-2: estudos pré clínicos em ratas osteoporóticas**", Processo FOA nº 700-2024, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 21 de Outubro de 2024.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Novembro de 2026.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Dezembro de 2026.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**DNA Hydrogel Scaffolds as a Strategy to Optimize BMP-2 Drug Delivery: Preclinical Studies in Osteoporotic Rats**", Protocol FOA nº 700-2024, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 21, 2024.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 07, 2026.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 07, 2026.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

7. ORIENTAÇÕES

8. DISCIPLINAS MINISTRADAS COM A RESPECTIVA CARGA HORÁRIA E/OU A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE EXTENSÃO.

9. COMENTÁRIOS DO SUPERVISOR