



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Tese de Doutorado

**“Síntese de Partículas Esféricas e Submicrométricas de Vidro Bioativo com a Incorporação de Estrôncio e Icariin e Avaliação do seu Potencial Osteogênico em Células Tronco Mesenquimais de Ratas com Osteoporose”**

Autora: Layla Mosqueira Moura

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Novembro 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Layla Mosqueira Moura

**“Síntese de Partículas Esféricas e Submicrométricas de Vidro Bioativo com a Incorporação de Estrôncio e Icarin e Avaliação do seu Potencial Osteogênico em Células Tronco Mesenquimais de Ratas com Osteoporose”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Ciência dos Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

**Belo Horizonte**

**Escola de Engenharia da UFMG**

**2019**

M929s	<p>Moura, Layla Mosqueira.</p> <p>Síntese de partículas esféricas e submicrométricas de vidro bioativo com a incorporação de estrôncio e icariin e avaliação do seu potencial osteogênico em células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose [recurso eletrônico] / Layla Mosqueira Moura. - 2019.</p> <p>1 recurso online (141 f. : il., color.) : pdf.</p> <p>Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira. Coorientadora: Rogéria Serakides.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.</p> <p>Anexos e apêndices: f. 137-141.</p> <p>Bibliografia: f. 114-136. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Células tronco mesenquimais - Teses. 4. Estrôncio - Teses. 5. Osteoporose - Teses. 6. Vidros bioativos - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães. II. Serakides, Rogéria, 1971-. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 620(043)</p>
-------	--



Tese intitulada "**Síntese de Partículas Esféricas e Submicrométricas de Vidro Bioativo com a Incorporação de Estrôncio e Icarin e Avaliação do seu Potencial Osteogênico em Células Tronco Mesenquimais de Ratas com Osteoporose**", área de concentração: Ciência e Eng. Materiais, apresentada pela candidata **Layla Mosqueira Moura**, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup> Marivalda de Magalhães Pereira  
Orientadora - PhD (UFMG)

Prof<sup>a</sup> Rogéria Serakides  
Coorientadora - PhD (UFMG)

Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes  
Dr. (UFMG)

Prof. Natália de Melo Ocarino  
Dr. (UFMG)

Prof. Sidney Nicodemos da Silva  
Dr. (CEFET-MG)

Luciana Maria Silva  
Dr<sup>a</sup> (FUNED)

Prof. Rodrigo Lambert Oréfice  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Metalúrgica, Materiais e de Minas/UFMG

Belo Horizonte, 26 de novembro de 2019

## AGRADECIMENTOS

Seria impossível, concluir essa etapa sem agradecer a todos que fizeram parte dela, direta ou indiretamente. Gostaria de agradecer a minha família, meu marido Lincoln, por todo apoio, todos os sacrifícios, os momentos de ausência, mas, também por todas as alegrias e aventuras que vivemos e viveremos juntos. Essa é só mais uma delas que chega ao fim. À minha filha Cecília, a minha melhor surpresa, obrigada pelo simples fato de existir em minha vida, dedico essa vitória a você e seu pai.

Gostaria de agradecer aos meus pais por todo o apoio e suporte, por acreditar no meu potencial, se cheguei até aqui, vocês têm uma grande participação nesse processo. Aos meus irmãos, cada um em um canto do mundo, como eu gostaria de vocês aqui, obrigada pelo fato de eu saber que nunca estarei sozinha.

Gostaria de agradecer a minha segunda família, Alzibeli, não sei o que seria de mim sem você, Giovanna, Ivan e Fernanda por todo o apoio e incentivo.

Aos meus amigos, como sou grata, pelo apoio nas horas difíceis, pelas risadas, despedidas, reencontros. Muitos estão distantes, mas nem assim menos presentes. Agradeço por tudo, inclusive por acreditarem em mim nos momentos que eu não conseguia acreditar. A Lol, Mari, Bruno, Bruna, Felipe, Metal e todos os outros que me acompanharam de alguma maneira nessa jornada, muito obrigada.

À minha orientadora Marivalda, muito obrigada pela oportunidade, pelo suporte e pelas grandes emoções vividas nessa reta final.

À minha coorientadora Rogéria, agradeço por todo o apoio e por sempre ter palavras de apoio cheias de otimismo mesmo para os desafios mais complexos.

Aos grandes mestres que tive durante a vida e que continuam me inspirando diariamente, Luciana e Sidney, muito obrigada por toda a ajuda e disponibilidade.

Agradeço as pessoas que foram essenciais ao longo do processo e que me auxiliaram a manter o pé no chão, a me encontrar e redescobrir. Muito obrigada Gilberto, Bárbara e Luciano.

Aos amigos do Lab Bio, como eu tive sorte de encontrar vocês. Obrigada por todo o apoio, pelos momentos de alegria e pelos de tristeza. Vocês realmente são os grandes presentes que ganhei durante o doutorado. À Ana Celeste, Fabi, Agda, Sandhrinha, Andréia, Cheisy, Priscilla, Ingrid, Diogo, Amanda, Iuri e especialmente Breno e Talita, muito obrigada.

Ao professor Eduardo, por todo o suporte e disponibilidade para realizar as análises de FTIR. Aos professores Rodrigo e Herman, pela disponibilidade de recursos e infraestrutura para análises.

Agradeço ao pessoal do PPGEM, Mário, Anderson, Isadora, Enil pelas conversas e toda a ajuda que vocês me deram e aos funcionários Cida, Patrícia, agradeço por todo auxílio.

À Cláudia, Felipe e Hellen pelas análises de ICP-OES realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAQ – DEMET - UFMG) e Samuel pelo auxílio nas análises de DRX.

Ao pessoal do Núcleo de células tronco (NCT) da Escola de Veterinária da UFMG, Amanda, Profa. Natália, Fabrício, Kênia, Lorena, Débora, Fabi e Bruno agradeço por toda ajuda e companhia nas extrações, cultivos e finais de semana cheios de análises.

Ao pessoal do laboratório de Sinalização de Cálcio (ICB-UFMG), a professora Maria de Fátima, pela disponibilização do laboratório e a Andressa, Rodrigo, Antônio, Dabny e Sandhrinha (de novo!) pelas risadas e por toda ajuda.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao PPGEM agradeço pela oportunidade, apoio e suporte absoluto ao desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos agradeço imensamente.

## RESUMO

A osteoporose é a doença metabólica que mais frequentemente afeta o tecido ósseo. Um dos grandes desafios relacionados à doença são as fraturas a ela associadas e seus tratamentos convencionais. Uma das dificuldades clínicas presentes nesses tratamentos terapêuticos estão relacionadas à sua baixa biodisponibilidade referente aos fármacos utilizados e uma das opções para a melhora desse problema seria a utilização de sistemas para a liberação local de agentes terapêuticos. A utilização dos vidros bioativos como sistemas multifuncionais de liberação, permite a combinação dos efeitos presentes em íons e fármacos, com as vantagens relativas a esse material inorgânico. Entre os agentes que podem ser utilizados no reparo ósseo estão o íon estrôncio (Sr) e o fitofármaco icariin, que possuem o potencial de prevenir a perda e/ou estimular a neoformação óssea. Inicialmente a influência da incorporação de diferentes concentrações de Sr na estrutura e propriedades dos vidros bioativos foi avaliada. Partículas submicrométricas e esféricas de vidro bioativo contendo Sr com a capacidade de liberação controlada de íons em meio fisiológico foram obtidas. As análises da composição química confirmaram a presença de  $Sr^{2+}$  nas amostras que também apresentaram alta área superficial específica e grande volume de mesoporos. Foi possível observar que a adição de Sr causou alterações nas características físico-químicas dos vidros bioativos. Devido à importância do cálcio no processo de diferenciação, foram realizados os ensaios biológicos somente nas partículas contendo íons estrôncio na composição. Os resultados *in vitro* mostraram que as partículas não apresentaram efeitos negativos na viabilidade celular e foram capazes de melhorar o potencial de diferenciação das células tronco da medula óssea de ratas com osteoporose (CTM-MO). Essas mesmas partículas foram, com sucesso, incorporadas com icariin, sendo observado que a quantidade de estrôncio presente na composição teve influência na eficiência de incorporação e liberação do fitofármaco. Os ensaios de diferenciação com as partículas contendo  $Sr^{2+}$  e icariin mostraram que esses materiais possuem capacidade de melhorar a diferenciação de CTM-MO de ratas com osteoporose, porém são necessários mais estudos com o intuito de compreender melhor os mecanismos dessas propriedades. Sendo assim, as partículas estudadas apresentam grande potencial para a utilização como um sistema multifuncional para a liberação de estrôncio e icariin.

**Palavras-chave:** Osteoporose, vidro bioativo, estrôncio, icariin, sistemas de entrega, célula tronco mesenquimal, diferenciação osteogênica.

## ABSTRACT

Osteoporosis is the metabolic disease that most often affects bone tissue. One of the major challenges related to the disease is its associated fractures and its conventional treatments. One of the difficulties present in these treatments is related to their low bioavailability and one of the options to improve this problem would be the use of systems for the local release of therapeutic agents. The use of bioactive glasses as multifunctional release systems allows the combination of the effects present in ions and drugs, with the advantages related to this inorganic material. Among the agents that can be used for bone, the repair is strontium ion and phytopharmaceutical icariin, which have the potential to prevent bone loss and / or increase bone formation. Initially, the influence of the incorporation of different Sr concentrations on the structure and properties of bioactive glasses was evaluated. Submicron and spherical particles of Sr containing bioactive glass with controlled ion release capacity in the physiological medium were obtained. The chemical composition analysis confirmed the presence of  $\text{Sr}^{2+}$  in the samples that also presented high surface area and mesopores. It was observed that the addition of Sr caused changes in the characteristics of bioactive glasses. Due to the importance of calcium in the differentiation process, biological tests were performed only on the particles containing this ion in composition. The results showed that the particles had no negative effects on cell viability and were able to improve the differentiation potential of rat osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. These same particles were successfully incorporated with icariin, and it was observed that the amount of strontium present in the composition influenced the efficiency of incorporation and release of this phytopharmaceutical. Differentiation assays with  $\text{Sr}^{2+}$  and icariin-containing particles showed that these materials have the ability to improve differentiation of BMSC of osteoporotic rats but further studies are needed to better understand the mechanisms of these properties. Thus, the studied particles have great potential for use as a multifunctional system for the co-release of strontium and icariin.

**Key-words:** Osteoporosis, bioactive glass, strontium, icariin, delivery systems, osteogenic differentiation



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Origem das principais células envolvidas no processo de remodelação óssea. .....	29
<b>Figura 2</b> Corte sagital de osso longo mostrando sua estrutura.....	30
<b>Figura 3</b> Composição e estrutura multi-escala do osso. ....	31
<b>Figura 4</b> Fases e representação da remodelação óssea. ....	32
<b>Figura 5</b> Modelo para a regulação da renovação óssea pelo estrogênio.....	34
<b>Figura 6</b> Relação entre tempo e parâmetros relacionados a consolidação de fraturas normais e osteoporóticas.. ....	37
<b>Figura 7</b> Estrutura da rede do vidro bioativo. ....	43
<b>Figura 8</b> Estrutura química do icariin. ....	51
<b>Figura 9</b> Principais efeitos de icariin em células tronco mesenquimais de medula óssea e cadeias de sinalização envolvidas.....	52
<b>Figura 10</b> Fluxograma das etapas realizadas no trabalho.....	54
<b>Figura 11</b> Curva de trabalho de Icariin em DMSO para a realização do ensaio de incorporação. ....	67
<b>Figura 12</b> Curva de trabalho de Icariin e SBF para o estudo de liberação de icariin. ...	69
<b>Figura 13</b> Imagens das partículas de vidro bioativo obtidas por MEV. A: VB; B: VBSr5; C: VBSr10 e D: VBSr16. ....	73
<b>Figura 14</b> Imagens das partículas de vidro bioativo obtidas por MET. A/B: VB; C/D: VBSr5; E/F: VBSr10 e G/H: VBSr16.....	74

<b>Figura 15</b> Morfologia das partículas de vidro bioativo obtidas por MFA. A: VB; B: VBSr5; C: VBSr10 e D: VBSr16. ....	75
<b>Figura 16</b> Isotermas de adsorção de nitrogênio e distribuição do diâmetro médio de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.....	78
<b>Figura 17</b> Padrões de Difração de Raios-X (DRX) obtidos para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.....	80
<b>Figura 18</b> Espectros de FTIR obtidos para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16. ....	82
<b>Figura 19</b> Concentração de Si, P, Ca e Sr em SBF por diferentes períodos de tempo. ....	84
<b>Figura 20</b> Espectro de FTIR das amostras de vidro antes (0d) e após (14d) imersão em SBF.....	87
<b>Figura 21</b> Padrões de DRX de vidros bioativos imersos por duas semanas em SBF..	89
<b>Figura 23</b> Imagens de MEV e resultados de EDS.....	91
<b>Figura 22</b> Imagens de MEV e resultados de EDS. A,B: VB pré ensaio SBF; A',B': VB pós ensaio SBF, C,D: VBSr5 pré ensaio SBF; C',D': VBSr5 pós ensaio SBF .....	92
<b>Figura 24</b> Gráfico de viabilidade celular obtida pelo ensaio de MTT. ....	95
<b>Figura 25</b> Imagens de CTM-MO expostas ao extrato de partículas de vidro bioativo com e sem adição de Sr. Apresentando a fluorescência verde (células viáveis – primeira coluna) e fluorescência vermelha (células mortas – segunda coluna.....	97
<b>Figura 26</b> A/B: Conversão do MTT em cristais de formazan (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os	

extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. C/D Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (C) e 14 (D) dias de cultivo. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. 99

**Figura 27** (a) Nódulos mineralizados (setas) nas CTM-MO de ratas: (A) adultas sem osteoporose; (B) adultas com osteoporose sem tratamento; (C) com osteoporose tratadas com o extrato de VB; (D) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5; (E) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10. Número médio de nódulos de mineralização por campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico em 14 dias de cultivo. \*p < 0.05.....101

**Figura 28** Eficiência da incorporação de Icarin pelas amostras VB, VBSr5 e VBSr10. ....102

**Figura 29** Imagens de microscopia de força atômica das partículas antes e após incorporação com Icarin. A: VB; B: VB1ca; C: VBSr5, D: VBSr51ca; E: VBSr10; F: VBSr101ca.....104

**Figura 30** Caracterização das partículas após a incorporação com icariin. Espectros de FTIR, A: VB/VB1ca; B: VBSr5/VBSr51ca; C: VBSr10/VBSr101ca.....105

**Figura 31** Perfis de liberação de A: liberação cumulativa (%) em função do tempo e B: concentração liberada de icariin (µM) de icariin em função do tempo a partir das partículas VB1ca, VBSr51ca e VBSr101ca, no período de 21 dias (504 horas). ....106

**Figura 33** Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB1ca, VBSr51ca e VBSr101ca em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. \*p < 0.05. ....110

**Figura 32** Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os

extratos das partículas VBIca, VBSr5Ica e VBSr10Ica em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. \*\*p < 0,01 \*\*\*p < 0,001 ..... 110

**Figura 34** (a) Nódulos mineralizados (setas) nas CTM-MO de ratas: (A) adultas sem osteoporose; (B) adultas com osteoporose sem tratamento; (C) com osteoporose tratadas com o extrato de VBIca; (D) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5Ica; (E) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10Ica. (b) Número médio de nódulos de mineralização por campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VBIca, VBSr5Ica e VBSr10Ica em meio de diferenciação osteogênico após 14 dias de cultivo. \*p < 0.05 \*\*p < 0,01 ..... 112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Estudos com a associação de fármacos com sistemas de entrega para tratamentos locais em modelos animais.....	39
<b>Tabela 2</b> Identificação das amostras com suas composições nominais e as quantidades de nitrato de cálcio e estrôncio utilizadas nas sínteses das partículas .....	56
<b>Tabela 3</b> Identificação dos grupos experimentais .....	64
<b>Tabela 4</b> Identificação dos grupos experimentais .....	70
<b>Tabela 5</b> Composição química nominal e composição química obtida através da técnica de ICP-OES das partículas de vidro obtidas .....	71
<b>Tabela 6</b> Comparação dos diâmetros de VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16 obtidos pelas técnicas DLS, MET e AFM e valores de potencial Zeta.....	76
<b>Tabela 7</b> Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.....	77
<b>Tabela 8</b> Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54,CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas adultas. ....	94
<b>Tabela 9</b> Coeficientes de correlação e constantes das taxas de liberação das amostras VB1ca, VBSr51ca e VBSr101ca, obtidas através do modelo matemático de Higuchi...108	

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BET	Brunauer-Emmet-Teller
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BMP-2	Proteína morfogenética óssea tipo 2
CaP	Fosfato de cálcio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
CTM-MO	Células tronco mesenquimais de medula óssea
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios - X
EDS	Espectrômetro/espectrometria de energia dispersiva
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FTIR	Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxiapatita carbonatada
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
OVX	Ovariectomizados
PBS	Tampão fosfato-salino
PGE2	Prostaglandina E2
PTH	Paratormônio
RE	Receptores de estrogênio
SBF	Fluido corporal simulado
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCP	Fosfato tricálcio
TEOS	Tetraetil ostosilicato
TEP	Trietil fosfato
UV-Vis	Espectrofotometria de UV-visível

VEGF      Fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1	Objetivo geral .....	24
2.2	Objetivos específicos .....	24
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>26</b>
3.1	O tecido ósseo .....	26
3.1.1	Células do tecido ósseo .....	26
3.1.2	Estrutura óssea .....	29
3.1.3	Manutenção do tecido ósseo na fase adulta – Remodelação óssea .....	31
3.2	Osteoporose .....	35
3.2.1	As fraturas osteoporóticas .....	35
3.2.2	Tratamentos para osteoporose .....	37
3.2.3	Tratamento local de fraturas osteoporóticas .....	38
3.3	Vidro bioativo .....	41
3.3.1	Vidros bioativos com a incorporação de íons terapêuticos .....	45
3.3.2	Vidro como sistema de entrega de agentes terapêuticos .....	47
3.4	Estrôncio .....	48
3.5	Icariin .....	50
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>54</b>
4.1	Síntese das partículas submicrométricas de vidro bioativo com incorporação de estrôncio .....	55
4.2	Caracterização das partículas de vidro bioativo com adição de estrôncio .....	56
4.2.1	Estudo da composição química por ICP-OES .....	56
4.2.2	Avaliação das propriedades morfológicas e texturais .....	57
4.2.3	Avaliação estrutural .....	58
	Difração de raios X (DRX) .....	58
	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	58



4.2.4	Avaliação da bioatividade e liberação iônica em SBF .....	59
4.3	Ensaio biológicos .....	59
4.3.1	Indução da osteoporose pela ovariectomia .....	59
4.3.2	Extração de células-tronco mesenquimais de medula óssea .....	60
4.3.3	Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais de medula óssea.....	60
4.3.4	Protocolo de congelamento e descongelamento de células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea .....	61
4.3.5	Obtenção dos extratos das partículas .....	61
4.3.6	Ensaio citotoxicidade e viabilidade celular .....	62
4.3.7	Ensaio de diferenciação osteogênica .....	63
4.3.12	Análise estatística .....	66
4.4	Avaliação da eficiência de incorporação e perfis de liberação de icariin a partir de partículas de vidro bioativo contendo estrôncio.....	66
4.6	Estudo da liberação de icariin das partículas de vidro com estrôncio .....	68
4.6.2	Avaliação da liberação cumulativa de icariin .....	69
4.6.3	Ensaio de diferenciação osteogênica das partículas de vidro com estrôncio e icariin .....	70
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
5.1	Estudo da composição química por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).....	71
5.1.1	Avaliação das propriedades morfológicas e texturais .....	73
5.1.2	Avaliação estrutural.....	79
5.1.3	Avaliação da liberação iônica e bioatividade em SBF .....	83
5.2	Ensaio biológicos .....	93
5.2.1	Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea.....	93
5.2.2	Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular .....	95
5.3	Ensaio de diferenciação .....	98

5.4	Avaliação da eficiência de incorporação e liberação de icariin .....	102
5.4.1	Avaliação da eficiência de incorporação das partículas .....	102
5.4.2	Caracterização das partículas de vidro bioativos e estrôncio após a incorporação de Icariin .....	104
5.4.3	Avaliação da liberação cumulativa de icariin .....	106
5.4.4	Ensaio de diferenciação osteogênica – partículas com estrôncio e icariin.....	109
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Contribuições originais ao conhecimento .....</b>	<b>116</b>
<b>8</b>	<b>Sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>117</b>
	<b>Anexo I.....</b>	<b>134</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>135</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é considerada a doença metabólica que mais afeta o tecido ósseo e tem como consequência o aumento do risco de fraturas, principalmente de ossos longos e vértebras. São evoluções típicas da doença a redução da massa óssea e a deterioração da microarquitetura do tecido que levam à diminuição da resistência do osso (BARRY et al., 2016; MILADI et al., 2013). Essa doença se caracteriza por uma menor síntese de matriz óssea causada por insuficiência osteoblástica. Como os osteoblastos se originam a partir da diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea, fatores que comprometem essa diferenciação osteogênica também podem causar osteoporose. Entre esses fatores estão as deficiências dos hormônios sexuais, a deficiência dos hormônios tireoidianos e de crescimento, deficiência proteica e diminuição dos movimentos locomotores (BOELONI et al., 2015a).

Em relação a sua incidência, a osteoporose pode afetar os homens (até 7%), porém é mais frequente nas mulheres (até 17%), principalmente a partir dos 40 anos. Após essa idade o volume de massa óssea começa a diminuir lentamente, e na mulher, a queda é acelerada causada pela diminuição dos níveis de estrogênio no período pós-menopausa. A incidência da osteoporose vem aumentando em função da maior longevidade alcançada pela população feminina em todo o mundo, podendo acometer até 70% das mulheres acima de 80 anos ('WHO Technical Report, 2003).

No Brasil, faltam estudos mais abrangentes e representativos de incidência da osteoporose. O país apresenta grande miscigenação racial e distribuição regional heterogênea, o que implica em diferentes fatores de risco. Alguns estudos locais mostram grandes variações de prevalência por apresentarem diferentes metodologias de estudo. Essas variações podem variar de 13,9 a 28,8% em mulheres acima de 50 anos, e chegar até 72,7% em mulheres acima de 80 anos. Considerando que a estimativa da população feminina acima de 50 anos no Brasil representa, em média, 20% da população total de mulheres, atualmente temos um pouco mais de 21 milhões de mulheres nessa fase da vida (FONTES; ARAÚJO; SOARES, 2012; PINHEIRO et al., 2010; RODRIGUES CAMARGO et al., 2005) .

As fraturas são um dos grandes problemas relacionados à osteoporose e sua ocorrência resulta em perda da mobilidade e da autonomia, dor, incapacidade física e até mesmo

ao aumento da mortalidade. Além disso, dependendo da intensidade da osteoporose, em caso de fraturas pode haver uma piora caso ocorra o atraso na consolidação da fratura, uma não consolidação ou falha na fixação de implantes e dessa forma, podem ser necessárias hospitalizações prolongadas e cirurgias invasivas (HOLROYD; COOPER; DENNISON, 2008; KYLLÖNEN et al., 2015).

O tratamento convencional da osteoporose inclui medidas farmacológicas, tais como terapia anti-reabsortiva com o uso dos bisfosfonatos, reposição hormonal, calcitonina, além do paratormônio e seus análogos (MILADI et al., 2013). Esse tipo de tratamento visa a prevenção de fraturas, manutenção da integridade estrutural do osso e a diminuição da morbidade e da mortalidade relacionadas a esse tipo de doença (LECART; REGINSTER, 2011; MILADI et al., 2013; ROUSH, 2011). É necessário enfatizar que todas essas terapias apresentam problemas relacionados à baixa biodisponibilidade, um parâmetro que avalia a quantidade e a velocidade de um fármaco que chega em seu local de ação, o que justifica a necessidade de se buscar meios de combinar a utilização desses agentes terapêuticos com sistemas carreadores, que ofereçam proteção contra a inativação do fármaco e, ao mesmo tempo, reduzam sua toxicidade (KHACHANE; DATE; NAGARSENKER, 2011; MAZZAFERRO et al., 2012; RAFFIN et al., 2012).

O tratamento de fraturas osteoporóticas é relatado como sendo um desafio pois devido a fragilidade dos ossos o prognóstico dessas fraturas é imprevisível e pode gerar, com frequência, falhas na fixação de implantes. Além disso, há também o desequilíbrio natural na remodelação acarretando em um longo período de recuperação com o risco de não haver completa consolidação do osso (BRODERICK et al., 2013; KANAKARIS et al., 2009; LILL et al., 2003).

Considerando os problemas de baixa biodisponibilidade presentes nos tratamentos convencionais e dos desafios presentes no tratamento de fraturas osteoporóticas, acredita-se que a liberação local de agentes com o potencial de estimular a formação de tecido ósseo pode aumentar as perspectivas de melhora da consolidação das fraturas. A liberação local ofereceria uma melhora da resistência e da qualidade óssea, além de reduzir o período de reparo e impedir a não consolidação da fratura (KYLLÖNEN et al., 2015). Um meio de possibilitar a liberação local desses fármacos é através da veiculação de agentes terapêuticos, convencionais ou novos, em sistemas

de liberação. Isso permitiria liberá-los de maneira prolongada no local de ação, com a redução e até mesmo a suspensão dos efeitos colaterais sistêmicos. A incorporação de fármacos anti-osteoporóticos nesses sistemas, melhoraria o potencial terapêutico e o tempo de ação desses fármacos (BARRY et al., 2016; SHUID et al., 2013).

É esperado que um sistema de entrega de fármacos para o tecido ósseo apresente as seguintes características: possibilidade de ser injetado no local de ação, atóxico, biodegradável, capacidade de incorporar grandes quantidades de fármacos, capacidade de reter o fármaco no local de ação e liberá-la de maneira controlada no tecido (LIU et al., 2016; RAMANLAL CHAUDHARI et al., 2012; SHUID et al., 2013). Biocerâmicas como hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcico (TCP) e vidros bioativos tem sido muito utilizados na medicina, principalmente para a regeneração óssea, já que apresentam boa compatibilidade devido à similaridade com a fase inorgânica do tecido ósseo (JONES, 2013; RABIEE et al., 2015). Os vidros bioativos são materiais promissores para a utilização em terapias para a regeneração óssea devido à sua conhecida habilidade de se ligar fortemente ao osso e estimular o crescimento ósseo na implantação *in vivo* (HENCH, 2009). Existem evidências que, *in vitro*, os produtos da dissolução dos vidros bioativos são capazes de melhorar a adesão, a proliferação e a diferenciação de osteoblastos e também induzir, a diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea em osteoblastos pela regulação e ativação de genes presentes nessas células. (ALINE et al., 2012, 2014; GOMIDE et al., 2012; VALERIO et al., 2004)

Muitas abordagens têm sido investigadas por meio da incorporação de vários íons metálicos na rede dos vidros bioativos com o intuito de aumentar a sua bioatividade. É possível também obter respostas biológicas específicas, em ambientes fisiológicos relevantes tendo como principal objetivo o aumento dos efeitos dos vidros bioativos no estímulo à osteogênese, à angiogênese e às propriedades antibacterianas (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; RABIEE et al., 2015). Em pesquisas anteriores foram estudados os efeitos multifuncionais de vidros bioativos preparados com a incorporação de diferentes íons e carregados com fármacos e fatores de crescimento. Foi observado que é possível realizar essa liberação simultânea e combinar os efeitos desses agentes com os efeitos já conhecidos dos vidros bioativos na osteogênese (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; WU; CHANG, 2014).

Entre os íons utilizados, o estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) apresenta, tal como o cálcio, grande afinidade pelo tecido ósseo e tem sido utilizado no tratamento da osteoporose, demonstrando efetividade na redução do risco às fraturas. A ação do Sr está ligada à inibição da reabsorção óssea (ALEGRE et al., 2012; LI et al., 2010; MARIE, 2006; WEI et al., 2014). A desvantagem associada ao seu uso está relacionada à sua biodisponibilidade, como ocorre também com outros tratamentos convencionais. Por causa disso, a liberação local e direta dos íons Sr no osso poderia ser uma alternativa em relação à administração sistêmica. Sendo assim, a incorporação de Sr em biomateriais, com a finalidade de tratar fraturas osteoporóticas é uma área de interesse (WEI, L. et al., 2014).

Uma variedade de moléculas de origem tanto natural quanto sintética tem sido explorada como alternativas viáveis aos fatores de crescimento. Até o momento, foram identificadas várias dessas moléculas que podem ser utilizadas no reparo de fraturas ósseas osteoporóticas e incluem a sinvastatina, ranelato de estrôncio, agonistas do receptor da prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ), a melatonina e o icariin (KYLLÖNEN et al., 2015; SHUID et al., 2013).

Outra classe interessante de pequenas moléculas que possuem o potencial de prevenir a perda óssea e aumentar a regeneração do tecido é baseada na medicina chinesa e em compostos derivados de plantas. A vantagem de explorar substâncias naturais é a possibilidade de reduzir os efeitos colaterais presentes nos agentes sintéticos. Acredita-se que os baixos níveis de atividade estrogênica no soro induzida por compostos de plantas do gênero *Epimedium sp.* possam ser suficientes para evitar a osteoporose e reduzir ou cessar efeitos adversos, tais como o aumento do risco de câncer de mama e do endométrio, tromboembolismos, dentre outros (INDRAN et al., 2016).

O fitofármaco icariin, substância derivada do grupo de plantas do gênero *Epimedium*, apresentou efeitos benéficos na densidade óssea em ensaios clínicos de administração sistêmica realizados em mulheres em período pós-menopausa e demonstrou resultados promissores quando o fármaco foi combinado a sistemas de liberação para o tratamento de fraturas em modelos animais saudáveis, sem osteoporose. De acordo com Kyllönen et al., 2015, seria importante o desenvolvimento de estudos para a utilização desses sistemas de liberação com a incorporação de icariin voltado para o tratamento local de fraturas osteoporóticas (JIA et al., 2012; KYLLÖNEN et al., 2015; ZHANG; QIN; SHI, 2007).

Sendo assim, considerando que as células tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO) de um paciente com osteoporose apresentam redução significativa no potencial osteogênico, é pressuposto que a utilização de partículas de vidro bioativo com incorporação de íons estrôncio e do fitofármaco icariin poderia estimular e aumentar a diferenciação osteogênica dessas células *in vitro*. Portanto, o presente trabalho enfoca no desenvolvimento de partículas submicrométricas de vidro bioativo como um sistema de liberação de íons estrôncio e do fármaco icariin e a avaliação do efeito deste sistema no potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose comparado com o potencial osteogênico de CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose (saudáveis) e com osteoporose sem os tratamentos. O caráter inovador desse estudo está na obtenção dessas partículas bioativas multifuncionais com a incorporação conjunta de íon estrôncio e icariin aliada ao estudo dos seus efeitos em células-tronco da medula óssea oriundas de ratas com osteoporose.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização físico-química e biológica de partículas esféricas e submicrométricas de vidro bioativo, com a incorporação de diferentes concentrações de íons estrôncio e do fitofármaco icariin e avaliação do efeito do extrato dessas partículas no potencial de diferenciação osteogênica reduzido de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratas com osteoporose.

### 2.2 Objetivos específicos

- Síntese das partículas esféricas submicrométricas de vidro bioativo com diferentes concentrações de íons estrôncio (0, 5, 10 e 16%mol) através de uma rota sol-gel modificada com a utilização do CTAB como template;
- Caracterizar as partículas de vidro bioativo com estrôncio;
- Avaliar da liberação iônica e bioatividade das partículas em SBF;
- Incorporar icariin na concentração de 200 $\mu$ M nas partículas de vidro bioativo com 0, 5 e 10%mol de estrôncio;
- Caracterizar as partículas incorporadas por meio das técnicas de MFA e FTIR;
- Avaliar a eficiência da incorporação e os perfis de liberação de icariin pelas partículas por meio da técnica de Espectroscopia Ultravioleta Visível (UV-VIS);
- Obter células-tronco mesenquimais da medula de ossos com osteoporose a partir da indução da osteoporose por castração em modelos animais;
- Avaliar a citotoxicidade das partículas com 0, 5, 10 e 16%mol de Sr<sup>+2</sup> através das técnicas de MTT e Live/Dead®;



- Avaliação do efeito do extrato das partículas contendo cálcio no potencial de diferenciação osteogênico reduzido de CTM-MO de ratas com osteoporose por meio dos ensaios de MTT, atividade da fosfatase alcalina e quantificação de nódulos de mineralização.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O tecido ósseo

O esqueleto, apesar de sua rigidez, é uma estrutura dinâmica, metabolicamente ativo e funcionalmente diverso. Ele fornece pontos de apoio para a fixação dos músculos, o que permite a locomoção, oferece suporte e proteção para órgãos vitais e é o local onde está se encontra a medula hematopoiética. Metabolicamente, possui funções tanto no metabolismo mineral via homeostase do cálcio e fosfato e também no equilíbrio ácido-base, via tampão de íons hidrogênio (CLARKE, 2008; KULAR et al., 2012). Estudos recentes sugeriram que o osso possui também um importante papel endócrino na fertilidade, metabolismo da glicose, regulação do apetite e função muscular (DIGIROLAMO; CLEMENS; KOUSTENI, 2012; OLDKNOW; MACRAE; FARQUHARSON, 2015).

Ao longo da vida o esqueleto é renovado através de um processo chamado remodelação óssea. Esse processo envolve, resumidamente, a reabsorção do tecido através dos osteoclastos e a formação de novo tecido ósseo através dos osteoblastos (BOELONI et al., 2009; OCARINO et al., 2008). Existem outras células e mecanismos envolvidos na remodelação óssea que serão descritos a seguir.

##### 3.1.1 Células do tecido ósseo

Dentro do tecido ósseo existem quatro principais tipos celulares: os osteoblastos que são formadores de ossos, os osteoclastos que absorvem o tecido e os osteócitos. Uma breve descrição dessas células e suas principais funções estão descritas no Quadro 1. Além disso, a origem desses tipos celulares está apresentada na Figura 1.

**Quadro 1** As principais células do tecido ósseo e suas funções

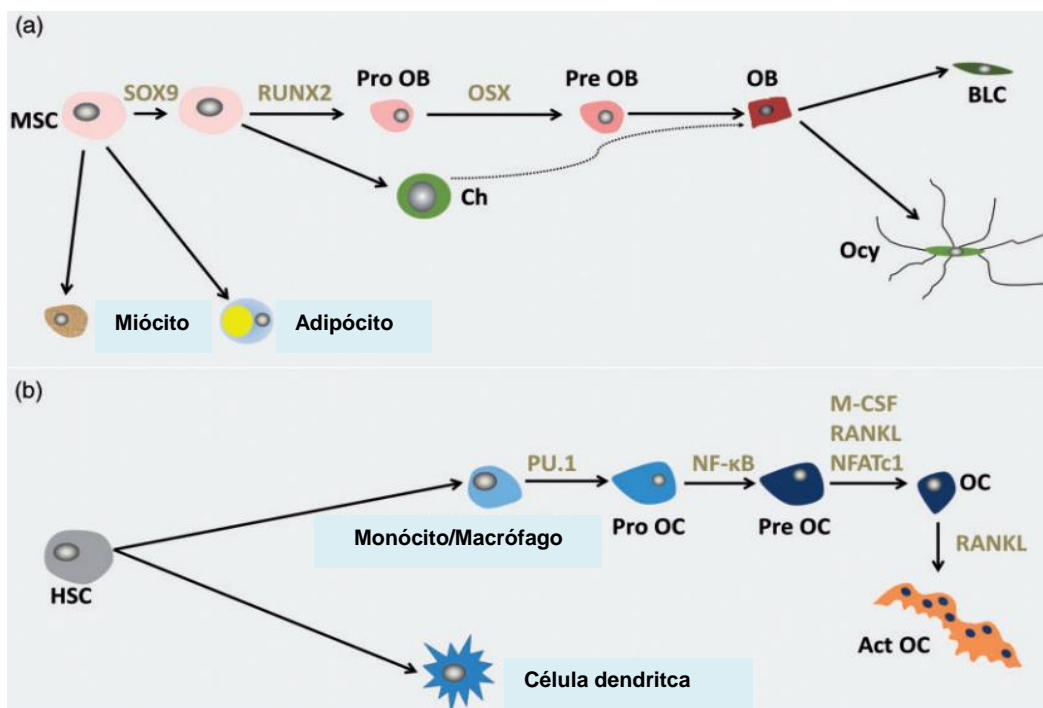
Tipo celular	Descrição	Principais funções	Referências
<b>Osteoblastos</b>	Diferenciam-se a partir de células-tronco mesenquimais podendo também derivar de	Secretam uma matriz rica em colágeno tipo I e regulam a sua mineralização.	(LIU; MALAVAL; AUBIN, 1997;

	<p>células de revestimento. Quando ativos, possuem os complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos aumentados para uma síntese rápida de osteóides.</p> <p>Os osteoblastos possuem três possíveis destinos: podem se tornar células de revestimento, osteócitos ou entram em apoptose</p>		MURSHED et al., 2005)
<b>Osteoclastos</b>	<p>São células multinucleadas formadas através da fusão de precursores da linhagem monócitos/ macrófagos. Os podossomos facilitam a adesão à superfície do osso onde é formada uma zona que permite um isolamento do meio ácido através do qual o osteoclasto possa dissolver os minerais e digerir a matriz óssea</p>	<p>A porção mineral do osso é dissolvida por uma secreção de ácido hidrolórico e a matriz óssea é quebrada por uma secreção de enzimas proteolíticas, incluindo a Catepsina K.</p>	(M.P.; J.G., 2008; PATRICK ROSS, 2013).
<b>Osteócitos</b>	<p>São osteoblastos diferenciados que estão presentes em lacunas do</p>	<p>Mecanossensores que transduzem sinais de carga óssea para</p>	(BONEWALD, 2011; CHEN;

	<p>tecido ósseo e compreendem mais de 90% de todas as células ósseas adultas. Exibem processos dendríticos longos que ramificam em canalículos através da matriz óssea interconectando osteócitos e conectando os osteócitos a células de revestimento e células da medula óssea em uma complexa rede intercelular.</p>	<p>conciliar a modelagem e remodelação óssea, regulando a ação dos osteoclastos e osteoblastos. Estão envolvidos na homeostase mineral.</p>	<p>SENDA; KUBO, 2015)</p>
--	---	---	---------------------------

Observa-se, na figura 1 (a) que as células tronco mesenquimais (CTM) podem formar adipócitos, condrócitos (Ch) ou precursores de osteoblastos (Pro OB), pré-osteoblastos (Pre OB) e então osteoblastos (OB). Osteoblastos maduros podem se diferenciar em células de revestimento (BLC) ou osteócitos (Ocy). Os principais reguladores de transcrição da diferenciação em osteoblasto estão indicados: Sry-box 9 (SOX9), fator de transcrição relaciona ao runt 2 (Runx2), Osterix (OSX) (CROCKETT et al., 2011; KENKRE; BASSETT, 2018; KULAR et al., 2012).

Na Figura 1(b), as células-tronco hematopoiéticas (CTH), especificamente os precursores miéloide comprometidos, se diferenciam em monócitos/macrófagos ou células dendríticas. Os monócitos/macrófagos se diferenciam, então, em progenitores de osteoclastos (Pro OC), pré osteoclastos (Pre OC) e depois osteoclastos. A formação de osteoclastos ativos (Act OC) é estimulado pelo ligante RANK. Nesse processo, as mais importantes citocinas e fatores de transcrição estão também indicados na figura abaixo PU box-binding (PU.1), fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e fator nuclear de células T ativadas (NFARc1) e RANKL (CROCKETT et al., 2011; KENKRE; BASSETT, 2018; KULAR et al., 2012).

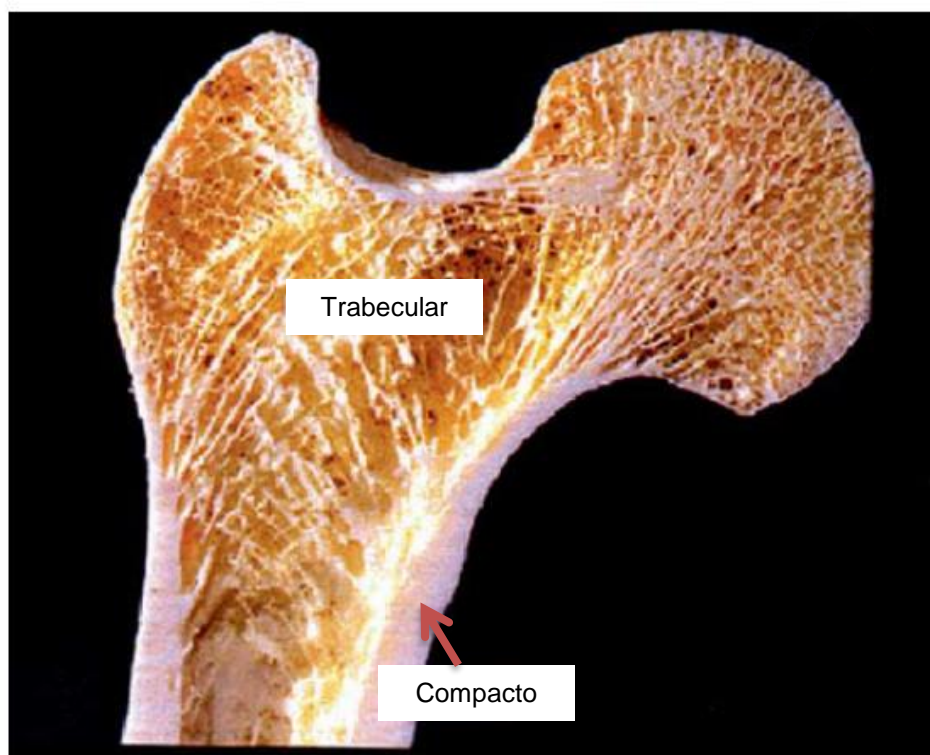


**Figura 1** Origem das principais células envolvidas no processo de remodelação óssea. Adaptado de (KENKRE; BASSETT, 2018)

### 3.1.2 Estrutura óssea

Existem, no esqueleto humano, dois tipos básicos de tecido ósseo, cada um possuindo um diferente papel e função (Figura 2). O primeiro tipo é o tecido ósseo cortical, adequado para as funções mecânicas, estruturais e de proteção. Além de ser o principal componente dos ossos longos, está presente nas superfícies protetoras de todos os ossos. Sua atividade metabólica é relativamente baixa (CHRISTENSON, 1997; DATTA et al., 2008; IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015).

O segundo tecido ósseo é denominado de tecido ósseo esponjoso ou trabecular. Comparado com o osso cortical, o trabecular possui uma atividade metabólica relativamente alta e é também menos denso. Microscopicamente, esse tecido ósseo possui uma aparência similar a colmeias de abelhas, sendo que essa estrutura é responsável pelo aumento da área superficial, o que é importante, considerando que o metabolismo ósseo ocorre somente em sítios presentes nas superfícies. Sendo assim, essa estrutura confere ao osso trabecular uma alta atividade metabólica (CHRISTENSON, 1997; DATTA et al., 2008; IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015).

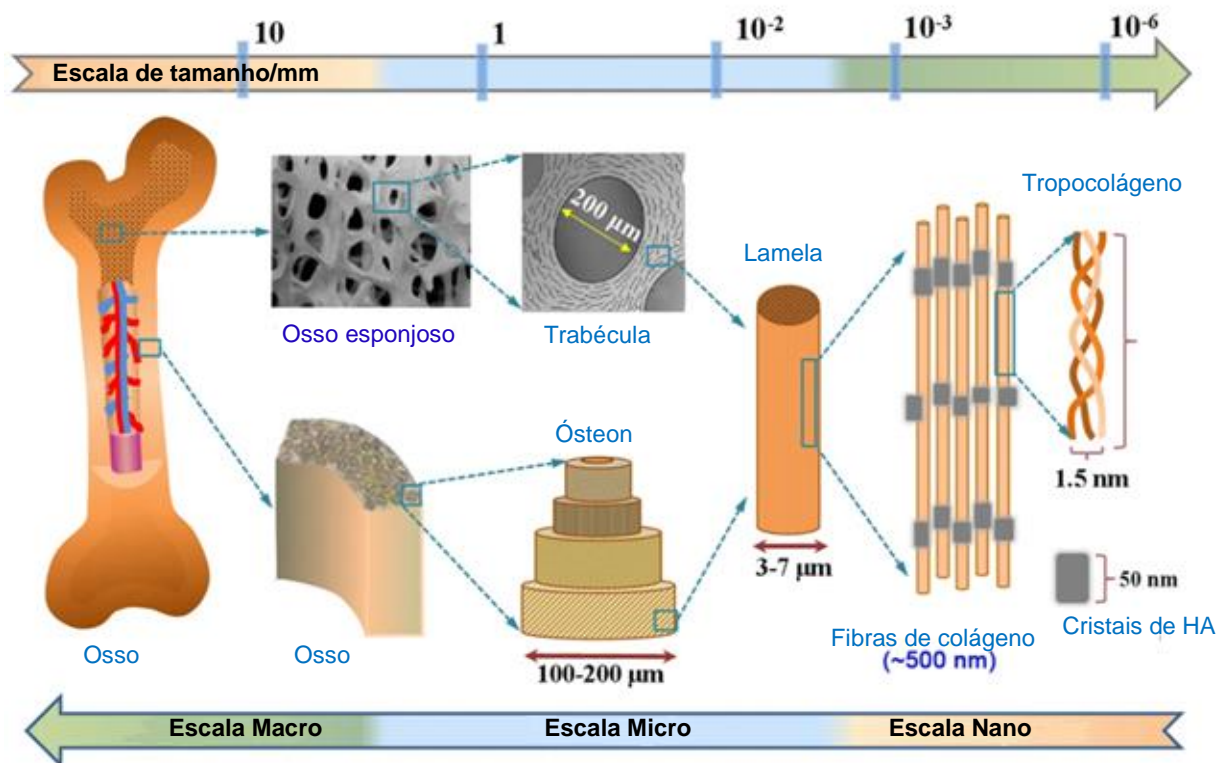


**Figura 2** Corte sagital de osso longo mostrando sua estrutura. Estão identificados o osso compacto e o trabecular. Adaptado de (SAFADI et al., 2014).

Em relação à porção orgânica, o colágeno tipo I compreende mais de 90% da matriz óssea. Mesmo sendo um tecido conectivo e estar presente em outros tecidos, o osso tem uma proporção muito maior dessa proteína e uma maior rotatividade (KULAR et al., 2012).

A fim de entender as propriedades excepcionais do tecido ósseo é necessário examinar o seu mais básico nível de organização, a matriz nano-estruturada de cristais de hidroxiapatita (HA) incorporados dentro de uma matriz de colágeno (Figura 3). Os cristais de HA encontram-se orientados e alinhados com as moléculas de colágeno, que se arranjam em fibrilas auto-organizadas; essas, por sua vez, se organizam em camadas paralelas dando origem as lamelas, que se dispõem concentricamente em torno dos vasos sanguíneos para formar os ósteons. Finalmente, os ósteons podem se organizar de forma mais densa, originando o osso cortical; ou de forma menos compacta, originando o osso esponjoso ou trabecular (OLSZTA et al., 2007; SADAT-SHOJAI et al., 2013)

É importante enfatizar que essa arquitetura nano-estruturada, é a essência do tecido ósseo que confere ao tecido ósseo suas propriedades mecânicas e de bioreabsorção (OLSZTA et al., 2007).



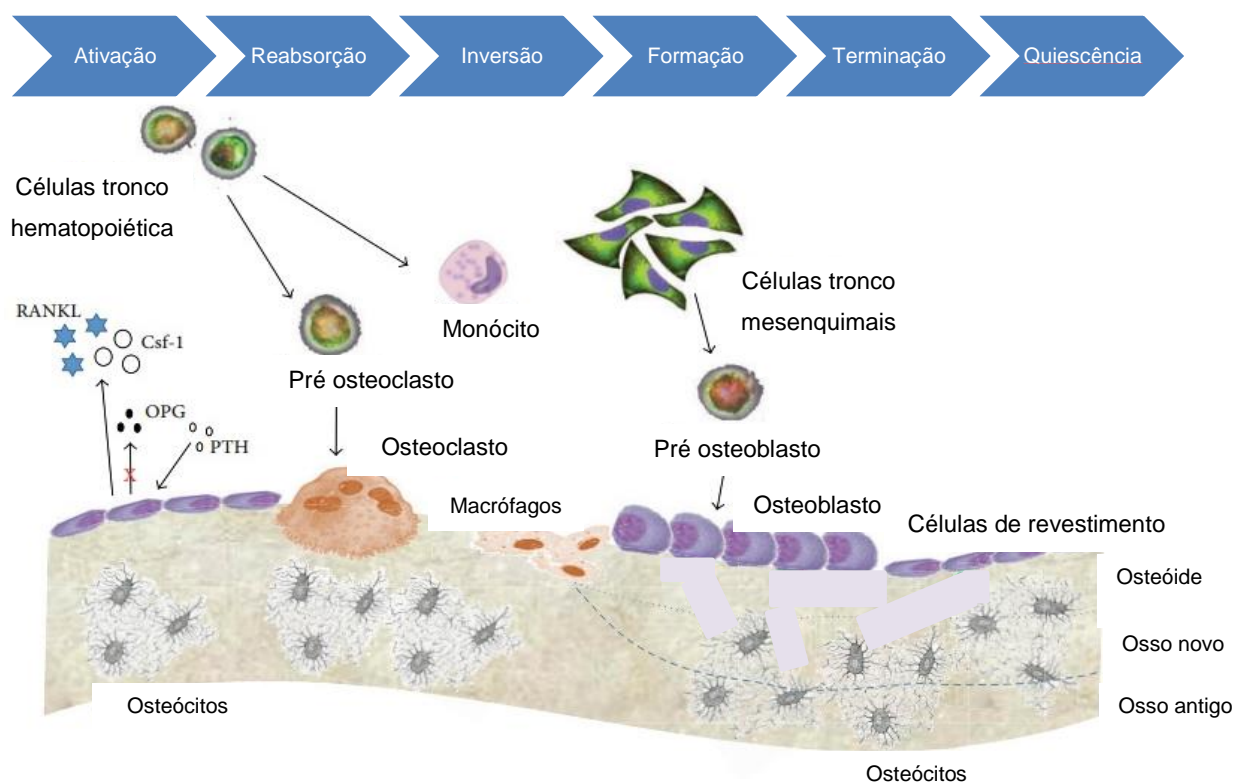
**Figura 3** Composição e estrutura multi-escala do osso. Adaptado de (GAO et al., 2017).

### 3.1.3 Manutenção do tecido ósseo na fase adulta – Remodelação óssea

Para a manutenção de sua integridade estrutural e cumprimento de seu papel na homeostase mineral, o tecido ósseo é continuamente moldado e reparado através de um processo chamado remodelação. A remodelação óssea é um processo complexo e regulado e é realizado, principalmente, por dois tipos celulares: os osteoclastos e osteoblastos (KULAR et al., 2012).

A Figura 4 ilustra as principais etapas da remodelação óssea, a ativação descreve o início da remodelação em uma superfície óssea previamente quiescente. Precursores de osteoclastos da linhagem monócito-macrófago são recrutados e se ligam a matriz óssea, criando uma zona de vedação. Dentro deste compartimento, ocorre a reabsorção, onde os osteoclastos criam um meio ácido através da ativação de bombas de prótons e enzimas, como as metaloproteases, que são secretadas para dissolver e

digerir tanto os componentes minerais quanto os componentes orgânicos do osso. Assim que a reabsorção é finalizada, os osteoclastos entram em apoptose e a unidade de remodelação óssea passa pela reversão. A lacuna gerada pelo processo descrito anteriormente é revestida com células, incluindo os pré-osteoblastos recrutados para a fase de formação desse ciclo. Os osteoblastos são responsáveis pela produção de matriz óssea e subsequentemente pela regulação da mineralização. Durante esse processo, os osteoblastos são incorporados dentro da matriz, formando os osteócitos que agem como sensores mecânicos e desempenham um importante papel regulador na renovação óssea (CROCKETT et al., 2011; KENKRE; BASSETT, 2018; PEEL, 2009; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).



**Figura 4** Fases e representação da remodelação óssea. Adaptado de QIN; HU, 2014.

Em adição à atividade dos osteoblastos e osteoclastos, existem outros elementos que estão envolvidos na regulação do ciclo da remodelação óssea. O controle dos processos anabólico e catabólico do tecido ósseo são influenciados por fatores locais representados pelas citocinas tais como as interleucinas IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11; fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento como o fator de transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento

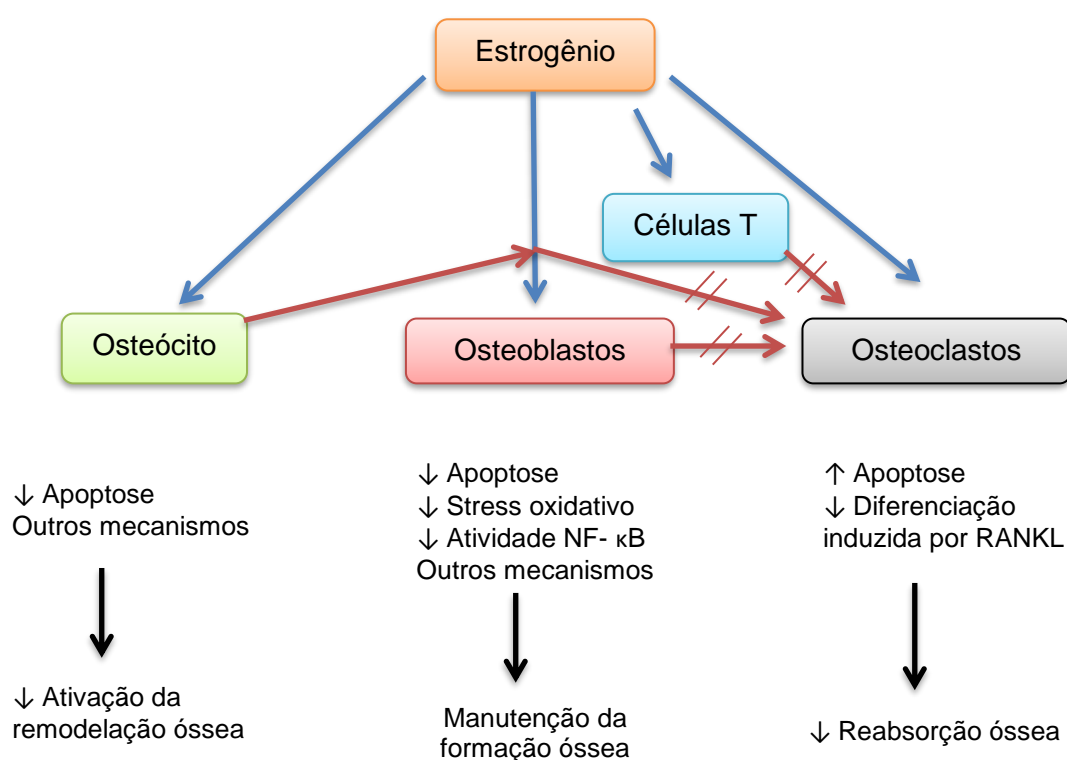


derivado de plaquetas (PDGF); moléculas de sinalização como ativador do receptor de fator-kB (RANK); o ligante de RANK, osteoprotegerina (OPG); moléculas de sinalização Wnt; óxido nítrico; comunicações intercelulares e estímulo mecânico. Adicionalmente, o controle sistêmico desses processos é exercido pela ação de fatores de crescimento como o IGF e de hormônios como o paratormônio (PTH), hormônio do crescimento (GH), 1,25-diidroxicolecalciferol, calcitonina, glicocorticóides, andrógenos e de hormônios tireoidianos. Dos fatores citados, o PTH, a 1,25-diidroxicolecalciferol e a calcitonina são os principais reguladores da homeostasia mineral, enquanto que o estrógeno, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) influenciam o metabolismo ósseo, controlando, de forma diferenciada, a reabsorção e a aposição ósseas. (BARRY et al., 2016; BOELONI, 2012; BOELONI et al., 2013; OCARINO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2003; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

Entre esses elementos que influenciam diretamente no processo de remodelação óssea está o estrogênio. Esse hormônio é um regulador chave no metabolismo ósseo tanto em mulheres quanto em homens. Um modelo da regulação estrogênica na renovação óssea através de efeitos nos osteócitos, osteoblastos e células T foi proposto por KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012 e está apresentado na Figura 5. Conforme apresentado na figura, o estrogênio tem efeitos diretos nos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos e efeitos inibitórios bloqueando a ativação dos osteoclastos tanto diretamente ou por via osteoblastos e células T. A principal ação do estrogênio no esqueleto é inibir a reabsorção óssea enquanto mantém a renovação do tecido. Além disso, o estrogênio age também aumentando a diferenciação das CTM-MO em osteoblastos (CAULEY, 2014; KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012).

A deficiência de desse hormônio está diretamente associada ao aumento da incidência de osteoporose em mulheres pós-período de menopausa (AZIZIYEH et al., 2019; BACCARO, 2015). O receptor de estrogênio (RE) é um tipo de receptor hormonal nuclear que possui um importante papel na manutenção do equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea (YUAN et al., 2015). Estudos indicaram que o RE é expresso em osteoblastos e apresenta um efeito na regulação da diferenciação desse tipo celular (MARTIN et al., 2015). Certa concentração de estradiol (1-10 nmol/L) pode promover a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea e a diferenciação condrogênica (RODRIGUEZ et al., 2008). LI et al., 2013 indicou que o estrogênio foi capaz de aumentar o potencial e a ativar a  $\beta$ -catenina em célula tronco

mesenquimais de ratas ovariectomizadas *in vitro*. É possível concluir que o efeito direto que o estrogênio possui também na proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO), indica que elas também possuem um papel importante no processo de renovação óssea. As CTM-MO agem, no processo de remodelação óssea, como fontes progenitoras para os osteoblastos, que são responsáveis por parte do equilíbrio homeostático. Além disso, regulam também a osteoclastogênese através da expressão de RANKL e OPG (BIELBY; JONES; MCGONAGLE, 2007).



**Figura 5** Modelo para a regulação da renovação óssea pelo estrogênio. As setas azuis representam efeitos diretos do estrogênio; setas vermelhas indicam a ativação de osteoclastos através de osteócitos, osteoblastos e células T que são bloqueados/controlados pelo estrogênio. Figura adaptada de (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012).

Apesar de todos os efeitos positivos observados, a terapia de reposição hormonal causa efeitos adversos a longo prazo. As incidências de doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral e câncer de mama apresentaram um aumento em mulheres na pós-menopausa tratadas com estrogênio (WANG et al., 2016a). Esses efeitos colaterais

fazem com que ocorra uma maior busca de métodos alternativos para suprir a deficiência desse hormônio.

Um desequilíbrio no processo de remodelação, onde há o favorecimento tanto das atividades dos osteoclastos quanto dos osteoblastos, levam a várias condições clínicas, com doenças que incluem a osteopenia, osteoporose e osteopetrose (IÑIGUEZ-ARIZA; CLARKE, 2015; KULAR et al., 2012; WEI et al., 2014).

### **3.2 Osteoporose**

Enquanto há um aumento da população mundial que está envelhecendo, a incidência da osteoporose é crescente. A osteoporose é uma doença metabólica generalizada, caracterizada por menor aposição óssea decorrente de insuficiência osteoblástica que leva ao aumento da fragilidade do osso e também ao risco de fraturas, principalmente nos ossos longos e vértebras. A menor síntese de matriz óssea presente nessa doença é causada pela falha das funções osteoblásticas e por causa disso, qualquer fator que reduz a atividade de síntese dos osteoblastos pode levar à osteoporose. Incluem-se nesses fatores a deficiência dos hormônios sexuais, deficiência dos hormônios tireoidianos e de crescimento, deficiência proteica e diminuição dos movimentos locomotores (BARRY et al., 2016; MILADI et al., 2013; RIBEIRO et al., 2003).

As CTM-MO parecem estar envolvidas na gênese da osteoporose causada pela castração em modelos animais, uma vez que essas células oriundas de ossos com osteoporose tem menor potencial de diferenciação em osteoblastos (BOELONI et al., 2013). Rodriguez et al., (2000), observou que as CTM-MO de pacientes com osteoporose apresentam deficiência na produção de colágeno I. Além disso, Ocarino et al., (2008), observou que em ratas ovariectomizadas, as CTM-MO possuem potencial de diferenciação reduzido, caracterizado por menor síntese de nódulos mineralizados, confirmando que fatores ligados à diferenciação osteogênica das CTM são também relacionados ao desenvolvimento de osteoporose.

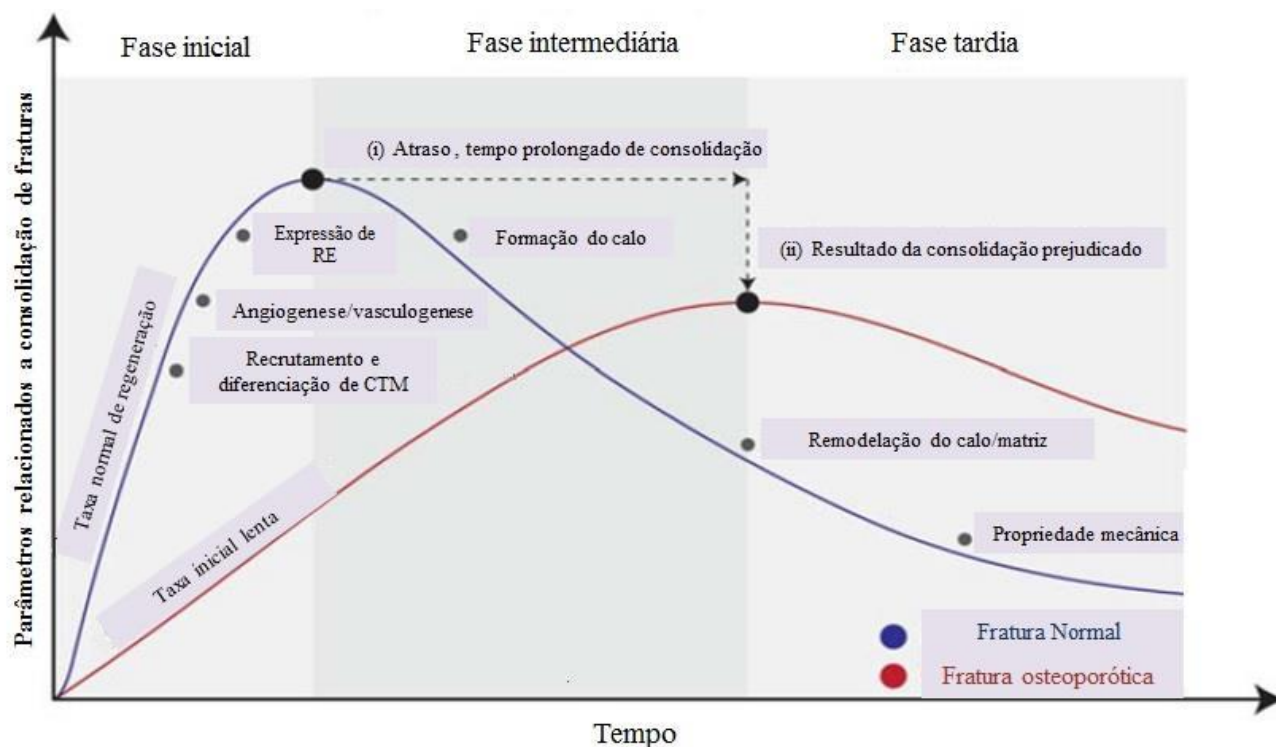
#### **3.2.1 As fraturas osteoporóticas**

O reparo de fraturas ósseas tem sido amplamente estudado, porém menor atenção tem sido dada para as fraturas osteoporóticas. No geral, o processo de consolidação de uma

fratura osteoporótica segue o mesmo processo de ossos normais, dependendo da interação de fatores biomecânicos, celulares e moleculares. Esse processo é iniciado com uma resposta inflamatória e com a formação de um hematoma no local da fratura. A liberação de fatores inflamatórios, de crescimento e outros fatores de regulação ativam as células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO), o que contribui para a progressão do calo fibrocartilaginoso para o calo ósseo. Além disso, o reparo da fratura é essencialmente dependente de uma estabilidade adequada, formação de novos vasos e remodelação do calo pelos osteoclastos. (CHEUNG et al., 2016; KYLLÖNEN et al., 2015).

No osso osteoporótico, os mecanismos envolvidos na consolidação das fraturas são debilitados. Os fatores que prejudicam a regeneração das fraturas osteoporóticas são multifatoriais e incluem a redução do recrutamento, proliferação e diferenciação das CTM-MO, redução da angiogênese, que prejudica a revascularização do calo ósseo, entre outros. Esses fatores são os responsáveis pelas diferenças presentes entre os tempos de reparo de fraturas ósseas normais e osteoporóticas, e estão representados na Figura 6. Nos gráficos é possível observar que as fraturas nos ossos osteoporóticos apresentam um tempo maior de consolidação quando comparadas às fraturas nos ossos normais (CHEUNG et al., 2016).

A ocorrência de uma fratura osteoporótica pode ser devastadora para um paciente idoso e muitas vezes resultam em perda da mobilidade e autonomia, dor, incapacidade física e até mesmo em mortalidade. Essa situação pode apresentar piora caso ocorra atraso no reparo, não consolidação da fratura ou falha na fixação de implantes, sendo necessárias hospitalizações prolongadas e cirurgias invasivas (HOLROYD; COOPER; DENNISON, 2008; KYLLÖNEN et al., 2015).



**Figura 6** Relação entre tempo e parâmetros relacionados a consolidação de fraturas normais e osteoporóticas. Fonte: Adaptado de (CHEUNG et al., 2016).

Considerando que a população idosa deverá dobrar até 2050 e que conseqüentemente a ocorrência de fraturas osteoporóticas poderá aumentar consideravelmente, as questões e problemas relacionados à consolidação da fratura osteoporótica estão se tornando uma preocupação emergente da saúde pública (CHEUNG et al., 2016).

### 3.2.2 Tratamentos para osteoporose

Em adição às medidas não farmacológicas como uma dieta adequada com ingestão de cálcio e vitamina D e modificações no estilo de vida como a interrupção do tabagismo, redução da ingestão de bebidas alcólicas e prática regular de atividade física, as opções para o tratamento convencional da doença incluem a utilização de terapia anti-reabsortiva e anabólica (MILADI et al., 2013).

A terapia anti-reabsortiva inclui essencialmente os bisfosfonatos, terapia de reposição hormonal, reposição de cálcio e vitamina D, moduladores seletivos de estrogênio e calcitonina e enquanto que a anabólica inclui o paratormônio e seus análogos. Além desses, o ranelato de estrôncio é um fármaco de larga utilização por inibir a reabsorção

óssea e estimular a formação do tecido ósseo (LECART; REGINSTER, 2011; MILADI et al., 2013; ROUSH, 2011).

Todas essas terapias mencionadas apresentam algum problema relacionado à metabolização dos fármacos, diminuição da sua biodisponibilidade além dos efeitos colaterais. A maioria dos fármacos anti-osteoporóticos são administrados via oral ou rota intravenosa e com essas formas de entrega, a quantidade de fármaco que alcança o osso é imprevisível. Apesar de a osteoporose ser uma doença óssea, os fármacos administrados nessas rotas irão percorrer todo organismo antes de alcançar os ossos. Por meio da via oral, esses fármacos são absorvidos no trato gastrointestinal e sujeitos a efeitos de primeira passagem, ou seja, redução de sua concentração inicial antes mesmo de alcançar a circulação sistêmica (AZEVEDO et al., 2010; SHUID et al., 2013).

### **3.2.3 Tratamento local de fraturas osteoporóticas**

Uma das alternativas mais promissoras para se evitar a perda dos fármacos pelo metabolismo de primeira passagem está ligada aos avanços observados no desenvolvimento de novos sistemas de entrega. A utilização de carreadores de fármacos fornece vantagens já que eles entregam o fármaco diretamente no sítio de ação, protegem os fármacos da inativação de primeira passagem, aumentando assim sua biodisponibilidade e reduzindo efeitos colaterais típicos das administrações farmacológicas que alcançam níveis sistêmicos (KHACHANE; DATE; NAGARSENKER, 2011; MAZZAFERRO et al., 2012; RAFFIN et al., 2012).

A identificação de agentes promotores e indutores da osteogênese com o potencial de estimular a formação de tecido ósseo têm aumentado as possibilidades para a melhora do reparo das fraturas. A liberação local desses agentes nas fraturas seria responsável pelo rápido aumento da qualidade óssea e da resistência (KYLLÖNEN et al., 2015).

Idealmente, um sistema de entrega de fármacos para ossos devem possuir as seguintes características: podem ser injetados no local de ação, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis e devem apresentar capacidade de incorporar grandes quantidades de fármacos e de reter o fármaco no local de ação, liberando-o no osso de maneira controlada (LIU et al., 2007; RAMANLAL CHAUDHARI et al., 2012; SHUID et al., 2013).

Alguns estudos com a associação de fármacos e sistemas para entrega locais foram apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** Estudos com a associação de fármacos com sistemas de entrega para tratamentos locais em modelos animais.

<b>FÁRMACO</b>	<b>SISTEMAS</b>	<b>APLICAÇÃO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<b>Ranelato de estrôncio/Sr<sup>+2</sup></b>	Recobrimentos para implantes produzidos com hidroxiapatita ou vidro bioativo contendo íons Sr.	Avaliação da ação dos materiais estudados como recobrimentos para implantes em defeitos femorais de coelhos, com o intuito de diminuir a inflamação crônica relacionada a implantes e que pode levar a osteoporose.	(SABAREESWARAN et al., 2013; YANG et al., 2012)
<b>PTH/ terapatide</b>	<i>Scaffolds</i> de vidro bioativo e álcool polivinílico (PVA) com incorporação do fármaco	Aplicação dos <i>scaffolds</i> com a incorporação do fármaco em defeitos femorais não críticos em coelhos.	(COLETTA et al., 2014)
	Nanopartículas de quitosana com a incorporação do fármaco	Avaliação <i>in vitro</i> do potencial de liberação do fármaco a partir do sistema, para futura aplicação como tratamento da osteoporose.	(NARAYANAN et al., 2012)
<b>Bisfosfonatos</b>	Recobrimento de implantes com PDLLA (ácido polilático) com a incorporação de ácido zoledrônico	Liberação do fármaco no local a partir de recobrimentos de implantes inseridos em fraturas da tíbia de ratos.	(GREINER et al., 2008)
	Modificações de superfícies de implantes com a utilização de colágeno	Avaliação da modificação dos implantes em fraturas da tíbia de ratas com osteoporose	(STADLINGER et al., 2013)

	e condroitina incorporados com sinvastatina ou ácido zoledrônico		
<b>Sinvastatina</b>	Hidrogel biodegradável de gelatina como sistema de entrega de sinvastatina para a cicatrização de fraturas	Aplicação do hidrogel puro e com incorporação do fármaco em fraturas de fêmur de ratos	(FUKUI et al., 2012)
	Esponjas de colágeno e hidrogel comercial Medgels® incorporados com sinvastatina	Avaliação do efeito dos carreadores com o fármaco no reparo de defeitos críticos de ossos nasais de ratos	(MUKOZAWA et al., 2011)
<b>Icariin/Icaritin</b>	<i>Scaffolds</i> de PLGA (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), TCP com a incorporação de icaritin	Avaliação da capacidade de reparo dos <i>scaffolds</i> em defeitos críticos em coelhos	(CHEN et al., 2013)
<b>bFGF</b>	Sistema injetável a base de colágeno com a incorporação de bFGF	Aplicação e avaliação desse sistema em defeitos no fêmur de ratos	(SAITO et al., 2014)
<b>BMP-2</b>	Comparação de <i>scaffolds</i> compósitos de microesferas de poliuretano e PLGA e esponjas colágeno como sistemas de entrega de rhBMP-2 (BMP-2 recombinante)	Os <i>scaffolds</i> produzidos foram utilizados em defeitos críticos femorais em ratos e seus resultados comparados	(BROWN et al., 2011)

No caso da entrega de agentes terapêuticos, a morfologia, tamanho e estrutura dos materiais podem afetar a cinética de liberação dos fármacos. Nesse sentido, o uso de partículas de tamanhos na faixa macro, micro ou nano, como carreadores é uma



maneira atrativa de preparar um sistema de entrega versátil que pode ser utilizado sozinho ou combinado em compósitos, hidrogéis ou até como recobrimento de implantes. Um exemplo de material que possui tais características é o vidro bioativo, capaz de ser produzido em várias faixas de tamanhos e de incorporar compostos em sua estrutura (KYLÖNEN et al., 2015; HU et al., 2013; LEI et al., 2009).

### 3.3 Vidro bioativo

Os primeiros biomateriais e implantes foram selecionados com o intuito de serem inertes a fim de evitar qualquer reação do organismo. Mais recentemente, a utilização de materiais bioativos que “provocam uma resposta biológica específica na interface do material resultando na formação de uma ligação entre o tecido e o material”, tem sido favorecida e entre esses materiais estão os vidros bioativos. Ao contrário de inertes, os vidros bioativos interagem com o tecido, resultando na formação de uma forte ligação interfacial entre o implante (vidro bioativo) e o osso. Entre os vários tipos estão os vidros, principalmente os que pertencem ao sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ , que são benéficos para o reparo ósseo ou substituição de tecidos ósseos doentes ou danificados (JONES, 2013; SABOORI et al., 2009). Adicionalmente, eles degradam com o tempo, permitindo a liberação controlada de íons terapêuticos e permitindo a regeneração do osso ao invés de substituí-lo, permitindo o reestabelecimento das funções e estado originais do osso (BRAUER, 2015; JONES, 2013; KAUR et al., 2014).

O primeiro e mais conhecido vidro bioativo apresenta a composição molar 46,1%  $\text{SiO}_2$ , 24,4%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 26,9%  $\text{CaO}$  e 2,6%  $\text{P}_2\text{O}_5$  e é conhecido como Bioglass® ou 45S5 e foi desenvolvido pelo pesquisador Larry Hench em 1969. Foi observado que esse vidro formava uma forte ligação com o tecido ósseo. Essa descoberta deu início à área das cerâmicas bioativas com vários materiais novos e produtos sendo obtidos a partir dos vidros bioativos e também das vitrocerâmicas e cerâmicas, como a hidroxiapatita sintética e outros fosfatos de cálcio (JONES, 2013).

O vidro bioativo pode ser obtido por duas grandes rotas, a rota de fusão e a rota sol-gel. No entanto, as pesquisas relacionadas à síntese do vidro se inclinam para a produção pela rota sol-gel, que se dá em temperatura ambiente enquanto que no método por fusão são empregadas temperaturas acima de  $1300^\circ\text{C}$  (JONES, 2013). O desenvolvimento da rota sol-gel possibilitou a extensão da bioatividade para

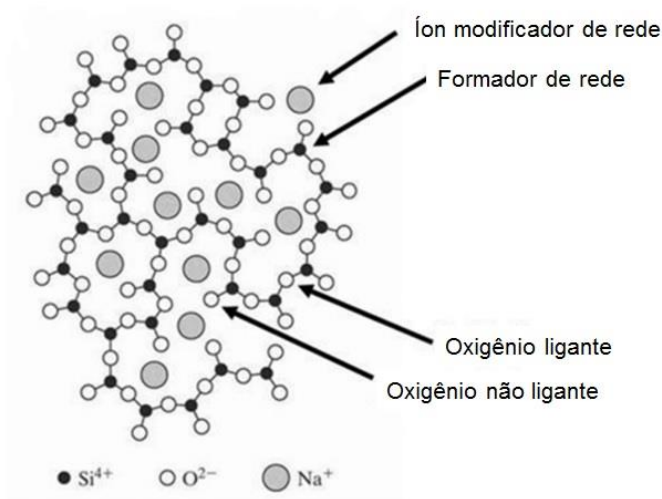
formulações com até 90% de  $\text{SiO}_2$ . Além disso, a rota permite maior controle dos parâmetros de síntese e obtenção de vidros com maior pureza, poros nanoestruturados distribuídos uniformemente e grande área superficial (DE OLIVEIRA et al., 2013; ROMÁN; PADILLA; VALLET-REGÍ, 2003).

A rota sol-gel consiste basicamente na hidrólise (em temperatura ambiente) dos precursores alcóxidos para a formação de uma solução coloidal (sol) a base de sílica. Em seguida, essas nanopartículas se reorganizam, por meio de reações de condensação, para a formação de uma rede tridimensional interconectada (gel). O processo de condensação leva à formação de água e álcool, que permanecem nos poros do gel. Dessa forma, na etapa posterior, o material é submetido ao processo de secagem, onde o líquido é removido originando uma estrutura com poros micro ou nanométricos e interconectados. Em seguida é feita a estabilização térmica do material, que é submetido a temperaturas mais altas (600 - 800°C), onde ocorre a dessorção dos grupos silanol (-SiOH) da superfície da rede provocando aumento na densidade, resistência e dureza do vidro (JONES, 2009).

O vidro bioativo pode ser encontrado na forma de partículas esféricas, ideais para utilização na área biomédica, pois podem ser usadas como reforço em estruturas poliméricas e na entrega de agentes terapêuticos. O método de Stöber (STÖBER; FINK; BOHN, 1968) foi o pioneiro e tem sido amplamente utilizado para a produção de partículas esféricas e monodispersas de vidro bioativo, sendo possível por meio desse método a produção de partículas submicrométricas com tamanho reduzido e área superficial específica elevada (HU et al., 2013; LABBAF et al., 2011).

Em relação à sua estrutura, a rede dos vidros bioativos é formada basicamente por dois componentes, denominados formadores de rede e modificadores de rede e suas propriedades como a taxa de dissolução e a taxa de formação da camada de hidroxiapatita são resultados diretos de sua estrutura atômica, como representado na Figura 7. Os formadores de rede são os principais componentes da estrutura do vidro, contribuindo para a formação da rede tridimensional, podendo formá-la sem a necessidade de componentes adicionais. São exemplos normalmente utilizados a sílica ( $\text{SiO}_2$ ), o pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e o trióxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ). Já os modificadores de rede são os que interrompem essa estrutura tridimensional vítrea formada, tendo como

exemplos o cálcio, o sódio, entre outros (FAURE et al., 2015; JONES, 2013; WU et al., 2011a).



**Figura 7** Estrutura da rede do vidro bioativo. Fonte: adaptado de Nandi et al., 2016

Vidros bioativos baseados em silicatos são os mais empregados atualmente. A unidade básica desses vidros é o  $\text{SiO}_4$  tetraédrico, que pode ser conectado com outro tetraedro a partir das ligações Si-O-Si, denominadas de oxigênios ligantes em ponte. Cada ânion de oxigênio é coordenado por dois cátions de silício, correspondendo aos vértices do tetraedro, impedindo o empacotamento de camadas de ânions e resultando em estruturas relativamente abertas (FAURE et al., 2015; TILOCCA; CORMACK, 2007).

Outras composições de vidros bioativos possuem além da  $\text{SiO}_2$ , o  $\text{P}_2\text{O}_5$  como segundo formador de rede. Vários trabalhos indicam que o fósforo está presente na estrutura dos vidros bioativos na forma de ortofosfato em vez de fazer parte na rede do silicato (BRAUER et al., 2012; ROBIN et al., 2004; ZHONG; GREENSPAN, 2000) e por causa disso, o fosfato é rapidamente liberado pela estrutura do vidro quando exposto ao meio aquoso. Essa liberação de íons fosfato favorece a rápida formação da camada de fosfato de cálcio amorfo, que se cristaliza e dá origem a hidroxiapatita (FAROOQ et al., 2012a; KWUN et al., 2010).

O segundo componente da estrutura de vidros são os modificadores de rede, que alteram a estrutura convertendo oxigênios ligantes em oxigênios não ligantes e são exemplos de modificadores o sódio, o cálcio, o estrôncio entre outros (FAURE et al.,

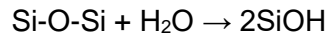
2015; ZHONG; GREENSPAN, 2000). Quando íons são substituídos por outros que possuem a mesma valência, porém tamanhos diferentes (por exemplo, estrôncio por cálcio, ou potássio por sódio), a rede tende a se expandir ou se tornar mais compacta, dependendo do tamanho do cátion, podendo afetar a solubilidade e a bioatividade do vidro. No entanto é difícil prever exatamente as alterações na estrutura quando há substituições de íons modificadores de rede tornando essencial a análise estrutural do vidro bioativo (FAURE et al., 2015; GOH et al., 2014; JONES, 2013).

Sabe-se que o conhecimento da estrutura dos vidros bioativos é importante para a obtenção de composições alternativas e para o entendimento de seu comportamento. A conectividade da rede (NC) é uma ferramenta importante que é utilizada para prever algumas propriedades do vidro como a bioatividade, reatividade, solubilidade e temperatura de transição vítrea e é definida como sendo o número médio de oxigênios ligantes que estão ligados a um átomo formador de rede, sendo que NC menores indicam a há a formação de uma estrutura mais fragmentada (AZEVEDO et al., 2010; BRAUER, 2015; JONES, 2013). A sílica apresenta conectividade de rede 4, enquanto vidros bioativos normalmente apresentam conectividade entre 2 e 3, porém os vidros com NC maiores que 2,6 podem apresentar redução da bioatividade devido a menor taxa de dissolução. O NC diminui com a adição de mais cátions modificadores de rede a estrutura de vidros bioativos (FAURE et al., 2015; KWUN et al., 2010; TILOCCA, 2010).

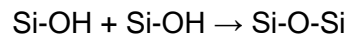
A substituição de cátions modificadores de rede também pode afetar a estrutura de vidros, mesmo quando a conectividade permanecer constante. Se, por exemplo, o óxido de sódio é substituído por óxido de cálcio numa base molar isso afeta as propriedades do vidro como densidade, dureza, e temperatura de cristalização, apesar da conectividade da rede e a polimerização dos silicatos serem mantidos (ROBIN et al., 2004).

Por todos esses fatores, quando implantado, o vidro bioativo induz uma série de reações na interface biomaterial/tecido, levando à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA). Essas reações podem ser resumidas em cinco estágios apresentados a seguir (JONES, 2013; PEREIRA; HENCH, 2004; SARAVANAPAVAN et al., 2003).

1. Troca iônica de  $\text{Na}^+$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$  pertencentes ao vidro por  $\text{H}^+$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  do fluido corporal.
2. Perda de sílica solúvel do material na forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  para a solução e formação da camada de silanol ( $\text{Si-OH}$ ).



3. Policondensação: repolimerização da camada rica em  $\text{SiO}_2$  na superfície do material.



4. Migração dos grupos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  para a superfície através da camada rica em sílica e posterior crescimento da camada rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  pela incorporação do  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  da solução.
5. Cristalização da camada amorfa de  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  pela incorporação de  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  provenientes da solução, originando a camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA).

A camada de HCA que é formada na superfície do vidro bioativo tem a composição semelhante à do osso e é a responsável pelas interações com o tecido hospedeiro. Uma série de eventos biológicos ocorre na superfície dessa camada, incluindo a adsorção de fatores de crescimento, adesão de células progenitoras, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular óssea, seguida de mineralização e formação do novo tecido ósseo (JONES, 2013; PEREIRA; HENCH, 2004). Sabe-se que produtos de dissolução iônica liberados de vidros bioativos tem mostrado uma capacidade de induzir resposta celular intrínseca, influenciando a diferenciação e proliferação de células envolvidas no processo de formação do osso (PEREIRA; CLARK; HENCH, 1994).

### 3.3.1 Vidros bioativos com a incorporação de íons terapêuticos

As estruturas de vidros bioativos permitem uma grande flexibilidade em sua composição, já que não são dependentes de uma estequiometria específica, permitindo a incorporação de várias concentrações de íons com atividades fisiológicas e

propriedades terapêuticas. Esses íons são liberados durante o processo de dissolução do material e tem a capacidade de executar uma ação terapêutica no corpo humano (FAROOQ et al., 2012b; FAURE et al., 2015). Com o intuito de controlar a bioatividade dos vidros bioativos, no sentido de obter uma resposta biológica específica, em ambientes fisiológicos relevantes, muitas abordagens têm sido investigadas por meio da incorporação de vários íons metálicos na rede dos silicatos. O principal objetivo é aumentar os efeitos dos vidros bioativos em estimular a osteogênese, a angiogênese e as propriedades antibacterianas (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; RABIEE et al., 2015).

Uma crescente evidência na literatura indica que os estudos dos efeitos dos produtos de dissolução dos materiais inorgânicos são peças fundamentais para entender o comportamento desses materiais *in vitro* e *in vivo* e para aplicações na engenharia de tecidos. Uma vez que muitos oligoelementos, tais como estrôncio (Sr), cobre (Cu), zinco (Zn) ou cobalto (Co), presentes no corpo humano são conhecidos pelos seus efeitos ósseos anabólicos, novas abordagens para aumentar a bioatividade de materiais tem sido investigadas por meio da introdução de íons terapêuticos (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011).

Taherkhani e Moztaizadeh, (2016), estudaram o efeito da adição de estrôncio na estrutura e nas propriedades biológicas de vidros bioativos obtidos via sol-gel e os materiais estudados apresentaram bioatividade e biocompatibilidade. Para a obtenção desses vidros o cálcio foi gradativamente substituído pelo estrôncio em percentuais de 0, 5, 10, 25, 50 e 100%mol. Na análise de cristalinidade, não foram observados picos cristalinos significativos nas amostras com estrôncio até 5%mol, mas foi observado que com o aumento do conteúdo de Sr na composição do vidro, a tendência a cristalização é aumentada.

O mecanismo de bioatividade, como já descrito anteriormente, inclui uma sequência de reações que ocorrem na superfície dos vidros bioativos. Essa sequência de reações interfaciais resulta na formação de uma forte ligação entre o osso e o vidro bioativo. Devido às semelhanças em seus raios iônicos, o estrôncio pode desempenhar uma função semelhante a do cálcio nessas reações. Ainda nos trabalhos de Taherkhani e Moztaizadeh, (2016) a bioatividade do sistema foi estudada com a imersão dos materiais em fluido corporal simulado (SBF) e a presença do Sr acelerou significativamente a formação da camada de hidroxiapatita na superfície das partículas.

Foi observado que os picos de hidroxiapatita tornam-se mais pronunciados com o aumento do conteúdo de estrôncio em comparação ao cálcio, indicando que a presença de Sr acelerou a cinética do processo de deposição da hidroxiapatita nas superfícies dos vidros. Essas observações foram feitas também por Fredholm et al., 2012. Além da hidroxiapatita, também foi relatado a formação de uma camada de apatita de estrôncio. Estudos envolvendo a resposta de osteoblastos a esses materiais indicaram um efeito positivo com o aumento da atividade metabólica dessas células (TAHERKHANI; MOZTARZADEH, 2016).

Após a análise de diversos estudos onde os vidros bioativos com estrôncio são sintetizados, é possível notar que é difícil estabelecer uma comparação direta entre os sistemas investigados (KARGOZAR et al., 2019). Isso ocorre devido a grande variação de composições e também da rota de síntese escolhida fazendo com que as pesquisas de vidros bioativos com Sr apresentem uma grande heterogeneidade de composições e conseqüentemente propriedades.

Um exemplo é o efeito do conteúdo de estrôncio na formação da camada de hidroxiapatita, que continua sendo um aspecto em aberto na literatura (FIORILLI et al., 2018). Alguns estudos mostram que quantidades relativamente altas de estrôncio aumentam a formação de HA devido à diminuição da conectividade da rede de sílica (AREPALLI et al., 2016; TAHERKHANI; MOZTARZADEH, 2016), enquanto outros relatam que a substituição molar parcial de Ca por Sr induziu uma diminuição da liberação de íons cálcio para o SBF causando, conseqüentemente, uma redução da habilidade de formar apatita (HU et al., 2017; MOGHANIAN; FIROOZI; TAHRIRI, 2017; NADRAH et al., 2013).

De acordo com KARGOZAR et al., 2019, os novos estudos deveriam focar na comparação direta de composições semelhantes produzidas pela mesma rota. Esses estudos seriam capazes de fornecer uma valiosa contribuição para esclarecer esses aspectos peculiares presentes nas pesquisas realizadas.

### **3.3.2 Vidro como sistema de entrega de agentes terapêuticos**

A utilização dos vidros bioativos como sistemas de entrega de fármacos permite a combinação da eficácia dos fármacos, com as vantagens inerentes a esse material

inorgânico. Cada vez mais pesquisas têm demonstrado os efeitos da liberação de fármacos a partir de vidros bioativos. EL-KADY; FARAG; EL-RASHEDI, (2016), apresentaram a entrega múltipla de íons lítio e fármacos a partir de nanopartículas de vidro. Já os estudos de WU e colaboradores, (2013) demonstraram a liberação de doxorubicina a partir do vidro bioativo, que inibiu a viabilidade de células cancerígenas. O sistema de entrega de ampicilina utilizado por WU et al. (2012) apresentou efeito antibacteriano potencializado, e o sistema de liberação do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) estimulou a proliferação de células tronco nos estudos realizados por Perez et al. (2014).

Em adição, estudos prévios mostraram que íons liberados pelos vidros bioativos são capazes de estimular a diferenciação osteogênica e a regeneração óssea (DE OLIVEIRA et al., 2013; HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; RABIEE et al., 2015; VALERIO et al., 2004). Em alguns estudos recentes, materiais compostos de vidros bioativos mesoporosos foram preparados com a incorporação de diferentes íons tais como lítio, estrôncio, zinco, e cobre e carregados com fármacos ou fatores de crescimento como gentamicina, dexametasona e VEGF. Os efeitos multifuncionais desses vidros foram estudados e foi observado que os íons terapêuticos e os fármacos ou fatores de crescimento podem ser eficientemente entregues de forma simultânea a partir de sistemas compostos de vidro bioativo, o que pode aumentar a regeneração de defeitos ósseos críticos (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; WU; CHANG, 2014).

### **3.4 Estrôncio**

O estrôncio é um elemento do grupo 2A da tabela periódica, biologicamente benéfico e abundante nos tecidos humanos e suas propriedades biológicas estão relacionadas à sua correspondência química com o cálcio. Devido a essa similaridade, uma alta concentração de estrôncio pode acumular no osso e substituir o Ca em processos metabólicos no tecido ósseo. O estrôncio pode ser utilizado para tratar e prevenir a osteoporose devido a sua capacidade de estimular a formação de osso e prevenir a reabsorção mediada por osteoclastos (MEUNIER et al., 2004; O'DONNELL et al., 2010; PORS NIELSEN, 2004; SAIDAK; MARIE, 2012).

O ranelato de estrôncio tem sido nos últimos anos um fármaco muito utilizado no tratamento da osteoporose e tem demonstrado ser efetivo na redução do risco de



fraturas em pacientes por liberar íons de estrôncio (Sr) que possuem grande afinidade com o tecido ósseo. Em contraste com os outros tratamentos para a osteoporose, a ação do Sr está ligada à prevenção da perda óssea, mediada por osteoclastos, além de estimular a formação de osso (ALEGRE et al., 2012; LI et al., 2010; MARIE, 2005; WEI et al., 2014).

Da mesma forma que ocorre em outros tratamentos convencionais, a desvantagem do uso do Sr está relacionada à sua baixa biodisponibilidade quando administrado oralmente, sendo essa menor que 20%. Sendo assim, uma liberação local e direta de íons Sr no osso, pode ser uma alternativa em relação à administração sistêmica e por isso, a incorporação desses íons em biomateriais carreadores, com a finalidade de prevenir ou tratar fraturas ósseas osteoporóticas é de grande interesse (WEI, L. et al., 2014).

Como já abordado anteriormente, a incorporação de íons terapêuticos em vidros bioativos tem sido uma área de estudo para o desenvolvimento de materiais destinados ao reparo e regeneração óssea. Sabe-se que quando o Ca é substituído por Sr em uma base molar, a rede estrutural do vidro não será significativamente alterada e a bioatividade será mantida. A resposta *in vitro* é de fato maior, devido ao efeito biológico do estrôncio nas células progenitoras do tecido ósseo. Além disso, por ser um pouco maior que o Ca, o Sr expande a rede, aumentando a taxa de dissolução de íons, o que tem um efeito significativo nas células ósseas *in vitro* e *in vivo* (O'DONNELL; HILL, 2010; RABIEE et al., 2015).

O estudo de Gentleman e colaboradores, (2010) mostrou que os íons estrôncio liberados de vidros bioativos, aumentaram a atividade metabólica dos osteoblastos. Além disso, eles diminuem a atividade de osteoclastos reduzindo a atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente e inibindo a reabsorção de filmes de fosfato de cálcio. Foi observado também aumento da proliferação e da atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos cultivados em contatos com esses vidros modificados, o que possibilitou a conclusão de que a substituição do cálcio pelo estrôncio em vidros bioativos poderia ser uma estratégia efetiva para desenvolver materiais destinados ao reparo e regeneração óssea.

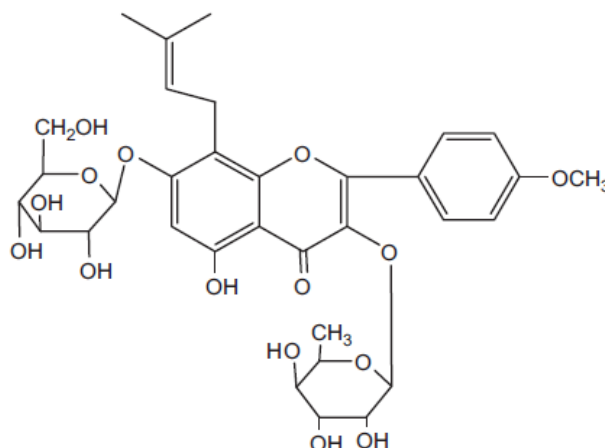
Em vários estudos com vidros produzidos por meio da rota sol-gel com a incorporação de estrôncio, foi observado que quando esse íon está presente na composição em um percentual de 5% molar há aumento do potencial osteogênico. Por esse motivo essa composição foi considerada como ideal (HESARAKI et al., 2010b; LI et al., 2010; SOLGI et al., 2017; WEI et al., 2014). Apesar de existirem muitos estudos que apresentam os efeitos positivos dos vidros com estrôncio na osteogênese e regeneração de defeitos ósseos, são poucos os estudos realizados com vidros obtidos via rota sol-gel (HESARAKI et al., 2010b) e com o uso de partículas submicrométricas visando avaliar o potencial osteogênico de células tronco mesenquimais osteoporóticas.

### 3.5 Icariin

Existem atualmente muitos agentes sintéticos desenvolvidos para o tratamento da osteoporose incluindo, como abordado anteriormente, o estrógeno nas terapias de reposição hormonal, os moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERMs), os bisfosfonatos, a calcitonina, dentre outros. Cada um desses tratamentos está associado a efeitos colaterais como o aumento do risco de câncer de mama e do endométrio, tromboembolismos, hipercalcemia e devido a isso, seria de grande interesse explorar substâncias naturais, especialmente os compostos provenientes de plantas e que seriam capazes de prevenir a perda óssea e aumentar a neoformação óssea com a diminuição desses efeitos colaterais (NIAN et al., 2009). Recentemente esses compostos foram isolados e seus efeitos terapêuticos avaliados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (JIA et al., 2012; KYLLÖNEN et al., 2015).

Fitoestrógenos são substâncias não esteroidais derivadas de plantas que possuem semelhanças estruturais ou funcionais com o estrógeno circulante. Estudos mostraram que alguns desses compostos possuem efeitos benéficos em diversas desordens, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, Alzheimer e osteoporose, apresentando menores efeitos colaterais que o estrogênio endógeno (WEI et al., 2016).

Um dos compostos bastante estudado é o icariin (Figura 8), principal glicosídeo flavonóide isolado de plantas do gênero *Epimedium*. Esse fitoestrógeno flavonóide apresentou efeitos benéficos na densidade óssea em um ensaio clínico realizado por ZHANG e colaboradores, 2007, em mulheres em período pós-menopausa.

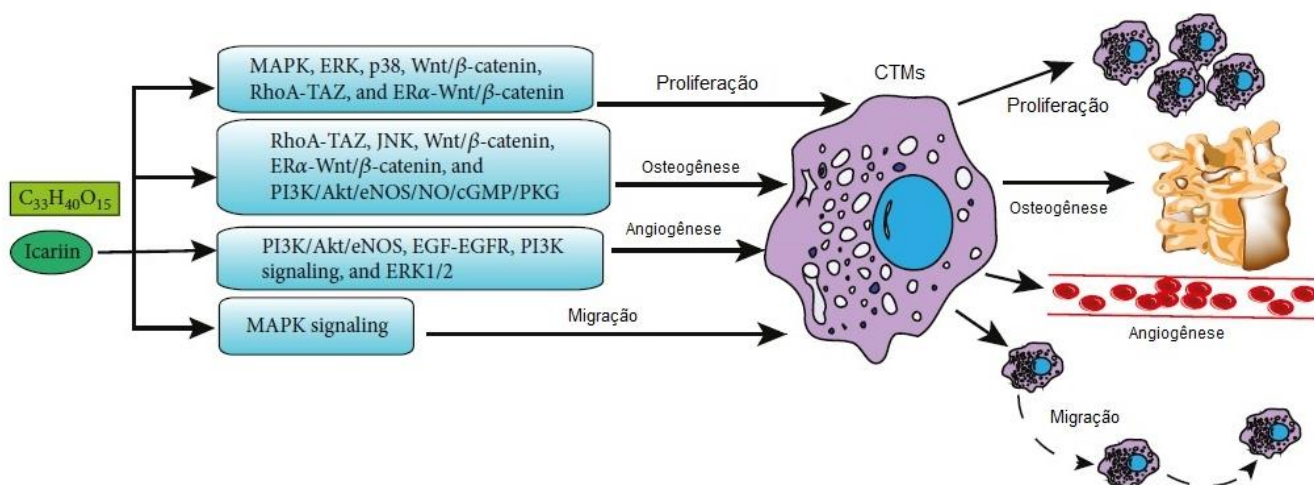


**Figura 8** Estrutura química do icariin. Fonte: NIAN, H. et al., 2009

Tanto o icariin, quanto seu metabólito ativo icaritin, quando administrados por via oral, apresentaram efeitos terapêuticos em modelos animais ovariectomizados. Apesar dos resultados promissores, o mecanismo de ação, dosagem, eficácia e segurança de icariin e icaritin no tratamento da osteoporose ainda deve ser melhor delineado, no entanto, os estudos relacionados a esse fármaco já conseguem definir uma faixa de concentração ideal para obtenção dos efeitos terapêuticos (NIAN et al., 2009; PENG et al., 2013; ZHAO et al., 2010).

Além dos estudos realizados a nível sistêmico, o icariin tem sido incorporado a biomateriais com o objetivo de desenvolver sistemas osteopromotores. Muitos dos sistemas estudados são *scaffolds* rígidos mais adequados para o reparo de defeitos ósseos segmentais do que para o tratamento de fraturas osteoporóticas (KYLÖNEN et al., 2015).

Em relação aos efeitos de icariin nas CTM-MO, foi relatado que ele pode promover a proliferação e diferenciação osteoblástica e inibir a diferenciação adipogênica, o que faz dele uma opção para a terapia regenerativa. Vários estudos mostram que múltiplas cadeias de sinalização estão envolvidas nos efeitos de icariin, o que indica múltiplos alvos terapêuticos (Figura 9) (LI et al., 2015a; WANG, 2018; ZHANG et al., 2017).



**Figura 9** Principais efeitos de icariin em células tronco mesenquimais de medula óssea e cadeias de sinalização envolvidas. Adaptado de (YANG et al., 2019).

A incorporação de icariin em *scaffolds* de quitosana e nano-hidroxiapatita (FAN et al., 2012) mostrou que esse sistema além de preservar a atividade do fármaco, foi capaz de estimular a atividade da fosfatase alcalina e a formação de módulos mineralizados em células tronco mesenquimais de ratos. Outro estudo avaliou o potencial do cimento ósseo de CaP injetável (HUANG et al., 2013) como sistema de entrega de icariin e vancomicina. Esse sistema apresentou biocompatibilidade *in vitro* e foi utilizado para reparar defeitos ósseos contaminados com *Staphylococcus aureus* em coelhos. Após 12 semanas, os defeitos estavam completamente reparados com aumento significativo do osso lamelar comparado ao controle. Os resultados desses estudos indicam o potencial da utilização do icariin combinado a sistemas de entrega para estimular a neoformação óssea.

WU et al., (2015) avaliou em duas etapas, o potencial osteogênico e angiogênico de grânulos de hidroxiapatita carregados com icariin. Primeiramente, foi avaliado o efeito *in vitro* de icariin em células tronco mesenquimais de ratos e os resultados demonstraram o aumento significativo do potencial osteogênico dessas células com aumento da atividade da fosfatase alcalina, da expressão dos fatores de transcrição relacionados à Runx-2 (Runx2), ALP, colágeno tipo I, osteocalcina além do aumento da secreção da proteína osteocalcina. Além disso, o icariin induziu a expressão de genes angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina-1 (ANG1) nas CTM de ratos.

A segunda parte do estudo de Wu et al., (2015) foi a fabricação de sistemas de entrega de grânulos micro/nanométricos de hidroxiapatita para a incorporação e liberação de icariin em modelos de defeitos femorais em ratos. Esses sistemas foram capazes de promover a neoformação óssea e a formação de vasos sanguíneos. Essa avaliação foi realizada por meio de medidas por microtomografia de raios-X (micro-CT), marcações fluorescentes e testes histológicos. Nesse estudo foram apresentadas duas concentrações ideais para a utilização do icariin, com o fármaco isolado na proporção de 20 $\mu$ M para os testes *in vitro* e com o fármaco adsorvido ao biomaterial para os testes *in vivo* na concentração de 2000 $\mu$ M.

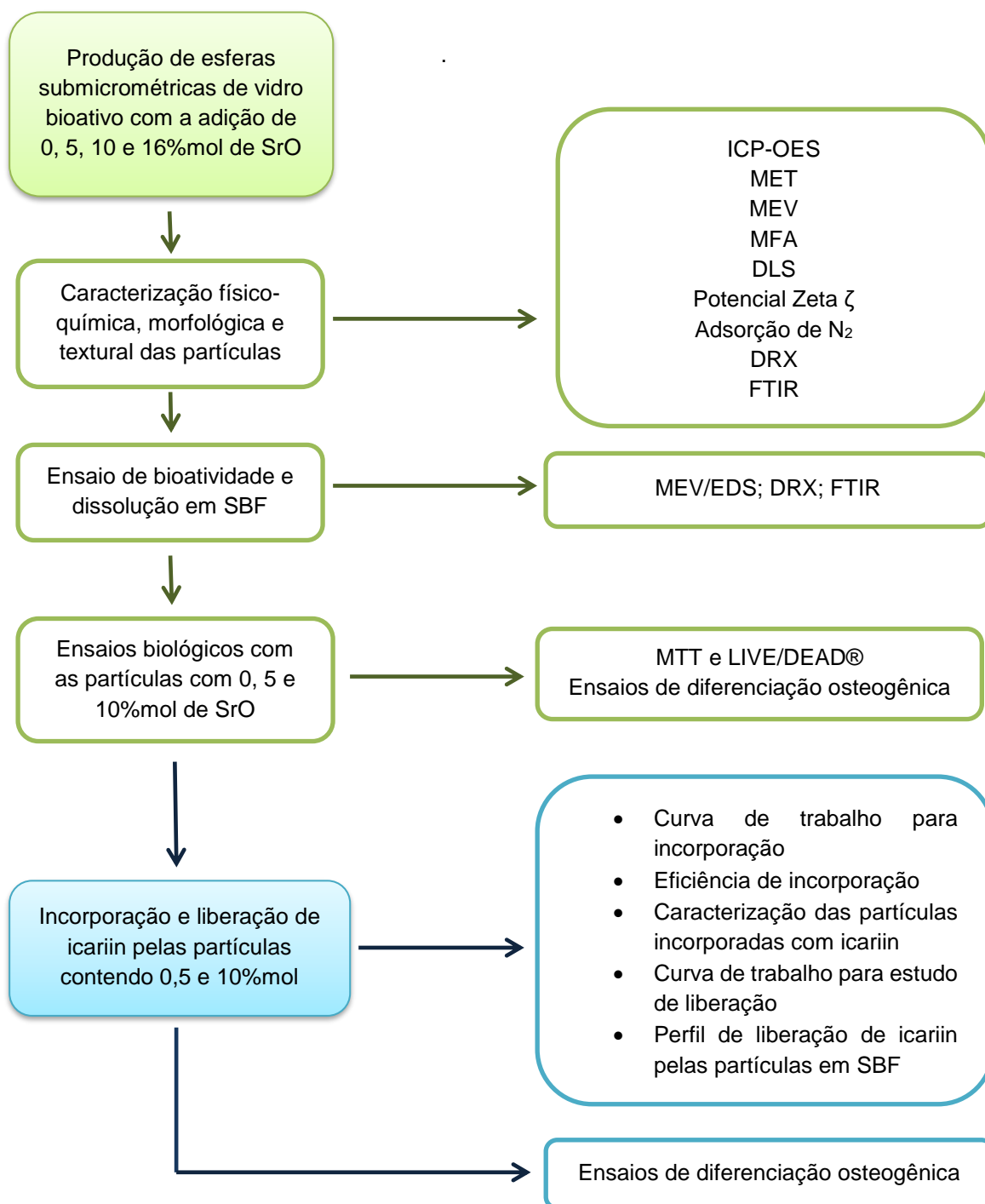
Atualmente existem dois estudos onde os vidros bioativos são associados à icariin, no mais recente, *scaffolds* de vidro bioativos com gelatina foram produzidos para a liberação de icariin e mostraram que o sistema foi capaz de manter a liberação e não foram realizados ensaios biológicos (REITER et al., 2019).

No trabalho de XU et al., 2018 também foram produzidos *scaffolds* combinando micropartículas de vidro bioativo e quitosana para a liberação de icariin e para a avaliação da diferenciação osteogênica e diferenciação óssea do sistema. Foi observada uma liberação controlada de icariin pelos *scaffolds*, devido a estrutura porosa e as interações por ligações de hidrogênio. O icariin liberado mostrou ser capaz de regular as expressões dos genes relacionados à diferenciação osteogênica, COL e RUX2, e também de proteínas como ALP e p-Smad1/5. As imagens de micro-CT revelaram que os *scaffolds* contendo icariin aceleraram a formação óssea quando comparados a sistemas sem o fármaco.

Baseado nos resultados promissores apresentados em estudos anteriores com a utilização sistêmica desse fármaco em mulheres pós-menopausa e estudos com a associação de icariin a sistemas de entrega para tratamento de fraturas em modelos animais saudáveis, foi realizado o estudo da combinação de icariin com partículas submicrométricas esféricas de vidro bioativo contendo estrôncio e foi realizada a avaliação do efeito desses sistemas no potencial de diferenciação osteogênica reduzida de CTM-MO de ratas com osteoporose.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas que foram desenvolvidas no trabalho estão descritas, resumidamente, no fluxograma abaixo (Figura 10).



**Figura 10** Fluxograma das etapas realizadas no trabalho.

#### 4.1 Síntese das partículas submicrométricas de vidro bioativo com incorporação de estrôncio

Para a obtenção das partículas de vidro bioativo com a incorporação de íons estrôncio, foi utilizada uma adaptação da metodologia descrita por LI et al., 2015. O método sol-gel foi modificado com a utilização do surfactante catiônico CTAB (brometo de cetiltrimetilamonio), que age como *template* para a formação das partículas esféricas. Inicialmente 4,6mM (0,4073g) de CTAB (*Vetec*) foram dissolvidos em 165mL de água deionizada e 78mL de álcool etílico absoluto 99,8% (*Neon*) com agitação magnética. Após a completa dissolução, foram adicionados, em sequência, com intervalo de 30 minutos e agitação magnética:

- 2,79mL de Hidróxido de amônio, (27% NH<sub>3</sub>, Synth);
- 3mL de TEOS - Tetraetilortosilicato, (Sigma-Aldrich), como precursor de SiO<sub>2</sub>;
- 0,230mL de TEP - Trietil fosfato (Sigma-Aldrich), como precursor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,
- Xg de Nitrato de cálcio tetra hidratado (Synth), como precursor de CaO;
- Yg de Nitrato de estrôncio, como precursor de SrO;
- Os valores de X e Y estão identificados na Tabela 2

A solução resultante foi agitada por mais 3 horas, à temperatura ambiente, sendo possível observar a formação de um precipitado branco. Esse precipitado foi filtrado, lavado com etanol, água deionizada e seco à temperatura ambiente por 24 horas. As amostras foram obtidas após a remoção do CTAB por calcinação a 650°C por 3 horas (2°C/min). A identificação das partículas, suas composições nominais e as diferenças nas quantidades de reagentes utilizadas em cada síntese estão identificadas na Tabela 2.

**Tabela 2** Identificação das amostras com suas composições nominais e as quantidades de nitrato de cálcio e estrôncio utilizadas nas sínteses das partículas

Identificação das amostras	Composição nominal (%mol)				Nitrato de cálcio (Xg)	Nitrato de estrôncio (Yg)
	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SrO		
VB	80	16	4	-	0,64	-
VBSr5	80	11	4	5	0,43	0,17
VBSr10	80	6	4	10	0,23	0,34
VBSr16	80	-	4	16	-	0,55

#### 4.2 Caracterização das partículas de vidro bioativo com adição de estrôncio

As caracterizações físico-químicas das partículas de vidro bioativo VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16 foram realizadas através das técnicas descritas a seguir.

##### 4.2.1 Estudo da composição química por ICP-OES

A composição química das amostras foi avaliada pelo método de fusão do metaborato de lítio e espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Um total de 0,1g de cada amostra a ser avaliada foi transferido para um cadinho de grafite contendo 0,7g de metaborato de lítio anidro. Após essa etapa, mais 0,7g de metaborato de lítio anidro foi transferido para o cadinho de grafite e foi então fundido a 950°C por 10min. O cadinho foi removido da mufla, a mistura homogeneizada e fundida mais uma vez a 950°C por 10min. Em seguida, a mistura foi transferida para um becker contendo 100mL de solução de 10% HNO<sub>3</sub>, mantida sobre agitação durante 20 minutos e a solução avaliada por ICP-OES. O equipamento Perkin-Elmer Optima 7300 DV ICP-OES foi utilizado para determinar as concentrações de Si, Ca, P e Sr das partículas obtidas e as proporções de SiO<sub>2</sub>, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e SrO calculadas.



## **4.2.2 Avaliação das propriedades morfológicas e texturais**

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia das partículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) FEI-INSPECT S50, operando a 20kV, equipado com um Espectrômetro de Energia Dispersiva (EDS), para avaliar qualitativamente a composição química das amostras. Previamente à realização da análise, as amostras foram recobertas com uma camada de carbono por pulverização catódica.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A morfologia e o tamanho das partículas foram avaliados com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120Kv), operado a 120kV. As partículas de vidro bioativo foram dispersas em etanol na proporção de 0,1mg.mL<sup>-1</sup>. Após 30 minutos em banho ultrassônico uma gota da solução foi dispensada em grade de cobre de 400mesh. Os diâmetros das partículas foram medidos a partir das micrografias do MET e as medidas, em média 100 por amostra, realizadas com a utilização do programa ImageJ (Freeware National Institutes of Health).

### **Microscopia de Força Atômica (MFA)**

A topografia e a morfologia foram analisadas por MFA no equipamento XE-70 (Park Systems, Coreia do Sul), utilizando ponta de Si tipo 39 PPP-NCHR, no modo de não contato, com força constante de 42N/m e frequência 330kHz. O preparo das partículas para análise foi realizado pela adição do material, na forma de pó, em álcool etílico na concentração 0,1mg.mL<sup>-1</sup>. Após 30 minutos em banho ultrassônico, uma gota da dispersão foi dispensada sob uma lamínula de mica para análise.

### **Espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

A distribuição do tamanho de partícula foi analisada por DLS usando o instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, EUA) com um comprimento de onda de luz laser de 660nm (laser de diodo vermelho de 35mW) usando um mínimo de dez

repetições. Para isso, as partículas foram dispersas em metanol ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos e a solução coloidal foi analisada.

### **Análise do Potencial Zeta**

As partículas de vidro foram dispersas em água deionizada ( $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos. O potencial zeta das dispersões a  $25^{\circ}\text{C}$  foi medido usando o instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, EUA), com um comprimento de onda de luz laser de  $660\text{nm}$  (laser de diodo vermelho de  $35\text{mW}$ ) e usando um mínimo de dez repetições.

### **Propriedade texturais**

Amostras foram desgaseificadas por 24 horas a  $200^{\circ}\text{C}$  previamente às análises. As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas em equipamento Quantachrome NOVA 2200 ver. 6.11, à  $77\text{K}$ . A área superficial específica (SSA - *specific surface area*) foi determinada por método Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando os pontos de adsorção com pressão relativa entre 0.01 e 0.30, enquanto que o diâmetro e distribuição de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) aplicado às curvas de dessorção.

#### **4.2.3 Avaliação estrutural**

##### **Difração de raios – X (DRX)**

As amostras foram submetidas a análises por Difração de raios X (DRX) para análise da estrutura dos materiais. Os espectros foram coletados no equipamento Phillips PW1700 utilizando radiação  $\text{Cu-K}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418\text{\AA}$ ) a  $40\text{kV}/40\text{mA}$ . Os dados foram coletados entre  $4,05^{\circ}$  e  $89,95^{\circ}$  com passo de  $0,06^{\circ}$  e tempo de aquisição de  $1,5\text{s}$ .

##### **Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de FTIR foi realizada pela técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance-Refletância total Atenuada*) entre  $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ , em equipamento Bruker Alpha, equipado com cristal de diamante. Foram realizadas 128 varreduras em cada amostra

com a resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  com o objetivo de caracterizar os grupos funcionais presentes em todas as amostras analisadas.

#### **4.2.4 Avaliação da bioatividade e liberação iônica em SBF**

Inicialmente, amostras na proporção de  $1,5\text{mg/ml}^{-1}$  foram imersas em 30mL de SBF e mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 4, 8 e 24h e também por 3, 7 e 14 dias (MAÇON et al., 2015). A cada período de tempo, alíquotas de 2mL foram retiradas da solução e 2mL de SBF novo foram repostos. Essas alíquotas foram diluídas em 8mL de  $\text{HNO}_3$  2%p/p. A diluição em ácido nítrico possui como funções terminar qualquer reação e estabilizar as soluções além de diluir as soluções para que se adequem à concentração e volume necessários para a análise. A finalidade da análise por ICP foi determinar a liberação de Si, P, Ca e Sr em todas as amostras produzidas, imersas em SBF por períodos determinados. As suspensões obtidas após o período final de liberação foram filtradas, o pó coletado foi seco e analisado através de MEV/EDS, DRX e FTIR.

### **4.3 Ensaios biológicos**

Os procedimentos descritos a seguir foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo número 202/2017 (ANEXO 1).

Previamente aos ensaios descritos a seguir, foram realizados ensaios de diferenciação utilizando a metodologia de contato direto com os materiais e que foram apresentados no APÊNDICE A.

#### **4.3.1 Indução da osteoporose pela ovariectomia**

Foram utilizadas 12 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas, numa proporção de quatro ratas/caixa, recebendo ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em um regime de 12 horas de luz e 12 horas no escuro. Foram separadas, em dois grupos, sendo um grupo sem osteoporose e um grupo com osteoporose. As ratas do grupo com osteoporose foram submetidas à ovariectomia bilateral com anestesia geral (associação de 40mg/kg de quetamina com 10g/kg de xilazina). A remoção dos ovários foi realizada

por duas incisões laterodorsais de aproximadamente um centímetro de extensão na região abdominal com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e da pele com fio catgut e sutura padrão em ponto simples separado.

Dez semanas após a ovariectomia, tempo suficiente para que ocorra a indução da osteoporose (DINIZ et al., 2009), os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de anestesia Tiopental (100mg/kg) via intraperitoneal. Após a parada cardíaca, os fêmures foram retirados e a medula óssea foi colhida para a extração das CTM-MO.

#### **4.3.2 Extração de células-tronco mesenquimais de medula óssea**

As amostras da medula óssea foram obtidas dos fêmures de ratas adultas com e sem osteoporose. Os fêmures foram dissecados a partir do músculo e tecido conjuntivo ligado, em condições assépticas, e as epífises removidas. A medula óssea foi lavada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). As células liberadas foram suspensas em meio de indiferenciação [(DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) com adição de antibióticos [60µg/l gentamicina, + 25µg/l anfotericina B, 10,000U/ml penicilina, e 10,000µg/ml estreptomicina (Merck, Hohenbrunn, Germany)] e colocadas em frasco de cultura de 75cm<sup>2</sup> com 10mL de meio de cultura.. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. A população não aderente foi removida e a camada aderente lavada duas vezes com meio de cultura novo. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana durante o cultivo.

#### **4.3.3 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais de medula óssea**

Após o cultivo das CTM-MO em DMEM por quatro passagens, as células das ratas adultas com e sem osteoporose foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços com concentração de 1X10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação para cada grupo experimental. As alíquotas das células foram incubadas com os anticorpos primários individuais e os controles por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas com os anticorpos secundários (Alexa Flúor 488,

Molecular Probes, Oregon, USA) por 30 minutos a 4°C. As leituras foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACScan (Fluorescence Activated Cell Analyser – FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA), utilizando o comprimento de onda de 530nm e os dados foram analisados utilizando o programa Cellquest (Becton Dickinson). Os anticorpos primários que foram utilizados são: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD54 (clone 1A29 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD90 (clone Ox-7 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

#### **4.3.4 Protocolo de congelamento e descongelamento de células mesenquimais indiferenciadas de medula óssea**

Devido à necessidade de repetição dos ensaios realizados, as CTM-MO foram congeladas de acordo com o procedimento a seguir. Esse processo ocorreu quando as CTM-MO estavam na terceira passagem. As células cultivadas em frasco de 75cm<sup>2</sup>, foram colhidas através de tratamento com tripsina/EDTA, suspensas em 10mL de meio DMEM, colocadas em tubo Falcon® e centrifugadas a 1380rpm por 5 minutos. Após esse período, o meio de cultura foi descartado e as células foram suspensas em 6mL de meio de congelamento que consiste em SFB (Gibco) com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth). Esse volume foi distribuído em criotubos de 1mL (1mL/criotubos) que foram mantidos por 30 minutos a -20°C e em seguida armazenados em freezer -80°C.

Para a utilização, as células foram descongeladas, o volume do criotubo suspenso em 5mL de meio DMEM, que foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 1380rpm por 5 minutos. Após esse período o meio de cultura foi descartado, as células ressuspensas em meio DMEM e colocadas em frasco de cultura de 25cm<sup>2</sup>. Para o descongelamento foi utilizado a proporção de 1 criotubo para cada frasco de 25cm<sup>2</sup>.

#### **4.3.5 Obtenção dos extratos das partículas**

Para obtenção dos extratos dos materiais, as partículas de vidro de cada grupo, na proporção de 100µg/mL, foram imersas em meio DMEM com baixa glicose [enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/mL), anfotericina (25µg/mL)] e mantidas, por um período de 24 horas, a 37°C. Transcorrido esse tempo,

a suspensão foi filtrada em membrana de 0.22 $\mu$ m e armazenada a 4°C para uso posterior.

#### 4.3.6 Ensaio citotoxicidade e viabilidade celular

Os ensaios biológicos foram realizados com as partículas VB, VBSr5 e VBSr10, pois, conforme descrito na literatura o cálcio tem efeitos positivos na diferenciação osteogênica *in vitro*.

Para a análise da citotoxicidade dos extratos das partículas, foi realizado o ensaio de MTT e foram utilizadas as CTM-MO do grupo não ovariectomizado. Esses ensaios foram realizados seguindo as normas da ISO 10993-5:2009 ('Biological evaluation of medical devices: Tests for in vitro cytotoxicity').

Para a realização do ensaio de MTT, as células descongeladas foram suspendidas em meio DMEM suplementando com 10% de soro fetal bovino (Gibco) com adição de antibióticos [60 $\mu$ g/L gentamicina, + 25 $\mu$ g/l anfotericina B, 10,000U/ml penicilina, e 10,000 $\mu$ g/ml estreptomicina (Merck, Hohenbrunn, Germany)]. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Após esse período, as células foram colhidas através de tratamento com tripsina/EDTA, contadas e plaqueadas em foram plaqueadas (1 $\times$ 10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 96 poços com a adição de meio DMEM com 10% de SFB com ou sem a adição dos extratos das amostras.

Controles de células e DMEM com 10% de SFB foram utilizados como referência, como controle positivo foi utilizado o Triton X-100 (1%, Gibco, Nova Iorque, EUA) e como controle negativo lascas estéreis de tubos de Eppendorf de polipropileno (1mg.mL<sup>-1</sup>, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após 72h, o meio foi aspirado e substituído por 60 $\mu$ l de meio de cultura com soro em cada poço. Foram adicionados a cada poço 50 $\mu$ L de reagente MTT (5mg.mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubou-se durante 4h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, 40 $\mu$ l de solução de Isopropanol/4% de HCl foram colocadas em cada poço. Em seguida, 100 $\mu$ l foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância (Abs) em espectrofotômetro (I-Mark, Bio-Rad) com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos como percentagem de células viáveis de acordo com a Equação 1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{absorbância (células tratadas)} \times 100}{\text{absorbância (controle negativo)}} \quad \text{Equação 1}$$

Consideraram-se os valores dos controles referência (poços com células e sem material) como 100% viabilidade celular.

Para a análise da viabilidade celular por imunofluorescência (LIVE/DEAD®), as células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células /poço) em placas de 96 poços com a adição de meio DMEM com 10% de SFB acrescido ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ou não com os extratos das amostras. Após 72h, o meio foi aspirado, as células lavadas 3 vezes com PBS (Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e tratadas por 30 minutos com o kit LIVE/DEAD® viability/cytotoxicity (Life Technologies) de acordo com as especificações do fabricante. As imagens foram obtidas com microscópio invertido (Leica, modelo DMIL-LED, Germany) e fluorescência captada separadamente para calceína ( $530 \pm 12.5 \text{ nm}$ ) e homodímero de etídio ( $645 \pm 20 \text{ nm}$ ).

O programa Prism software (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise estatística dos dados. A análise estatística foi realizada considerando como significância o  $P < 0,05$  e os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  os desvios padrão. Os experimentos foram realizados com  $n=5$ , utilizando o método ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Bonferroni.

#### **4.3.7 Ensaios de diferenciação osteogênica**

Os ensaios de diferenciação osteogênica foram realizados com o objetivo de realizar uma avaliação inicial do efeito de partículas esféricas de vidro bioativo com adição de estrôncio no potencial de diferenciação reduzido de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratas com osteoporose. Os ensaios realizados estão descritos a seguir.

#### **4.3.8 Cultivo em meio de diferenciação osteogênica e extrato dos materiais das CTM-MO**

As células foram descongeladas conforme tópico 4.3.4, foram suspensas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) com adição de antibióticos [60µg/L gentamicina, + 25µg/l anfotericina B, 10,000U/ml penicilina, e 10,000µg/ml estreptomicina (Merck, Hohenbrunn, Germany)]. As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Após esse período, as células foram colhidas através de tratamento com tripsina/EDTA, contadas e plaqueadas em placas de cultura de 6 e 24 poços (1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>).

Após o plaqueamento as células foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênica que consiste em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) + antibiótico/antimicótico + 10Mm β-glicerolfosfato + 50µg/ml ácido ascórbico (Merk) + 10nM dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,USA). Alguns grupos de células de ratas com osteoporose adultas foram tratados com o meio de diferenciação acrescido com o extrato das partículas.

Foram constituídos cinco grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico que estão representados Tabela 3 e descritos a seguir: **1)** Grupo controle com CTM de ratas adultas; **2)** Grupo controle com CTM de ratas adultas com osteoporose; **3)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VB; **4)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5; **5)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10. As células foram cultivadas por 7 e 14 dias e foram obtidos: a conversão do MTT em cristais de formazan, atividade da fosfatase alcalina e avaliação da mineralização.

**Tabela 3** Identificação dos grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Partícula</b>	<b>CTM de ratas sem osteoporose</b>	<b>CTM de ratas com osteoporose</b>
<b>1</b>	-	X	
<b>2</b>	-		X
<b>3</b>	VB		X
<b>4</b>	VBSr5		X
<b>5</b>	VBSr10		X



#### **4.3.9 Teste de conversão do MTT em cristais de formazan**

Foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços células mesenquimais não diferenciadas de medula óssea, de ratas com e sem osteoporose ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). O meio osteogênico acrescido ou não com os extratos das partículas, foi adicionado e as células cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 e 14 dias. Ao término de cada período, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato) com 10% ácido clorídrico (HCl) que permaneceu por 12h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. Foram determinados então, a absorbância média e o desvio padrão em quadruplicata para cada grupo experimental.

#### **4.3.10 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina**

O meio osteogênico acrescido ou não com os extratos das partículas, foi adicionado e as células mesenquimais não diferenciadas de medula óssea, de ratas com e sem osteoporose que foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 e 14 dias. Após esse período, as células foram incubadas com uma solução de 5-bromo,4-cloro,3-indolilfosfato (BCIP) — nitroazul tetrazólio (NBT) (Gibco) por 2 horas a 37°C. Após a incubação, elas foram tratadas por 12h com uma solução de solubilização (dodecil sulfato de sódio (SDS) em 10% de HCL). Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. Foram determinados então, a absorbância média e o desvio padrão em quadruplicata para cada grupo experimental.

#### **4.3.11 Ensaio de mineralização**

Células mesenquimais não diferenciadas de medula óssea, de ratas com e sem osteoporose, foram cultivadas sob lamínulas de vidro estéreis (22x22cm) em placas de cultura de 6 poços ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). O meio osteogênico acrescido ou não com os extratos das partículas foi adicionado e as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>

por 7 e 14 dias. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% e enxaguadas com água deionizada. Após a adição de uma solução de nitrato de prata a 5%, os poços foram lavados com água deionizada e o nitrato de prata residual neutralizado com tiosulfato de sódio a 5%. As células foram contra coradas com eosina. Os números de nódulos foram avaliados por microscopia uma objetiva de 20x. Foram tiradas fotografias, 30 campos por lamínula e os nódulos quantificados com o auxílio do programa ImageJ (Freeware National Institutes of Health). As médias e os desvios padrões foram determinados em triplicata para cada grupo experimental.

#### **4.3.12 Análise estatística**

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e, para cada variável, foram determinados as médias e os desvios padrões. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey utilizando o programa Graphpad Prism 7.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). As diferenças estatísticas significativas foram representadas através de \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### **4.4 Avaliação da eficiência de incorporação e perfis de liberação de icariin a partir de partículas de vidro bioativo contendo estrôncio**

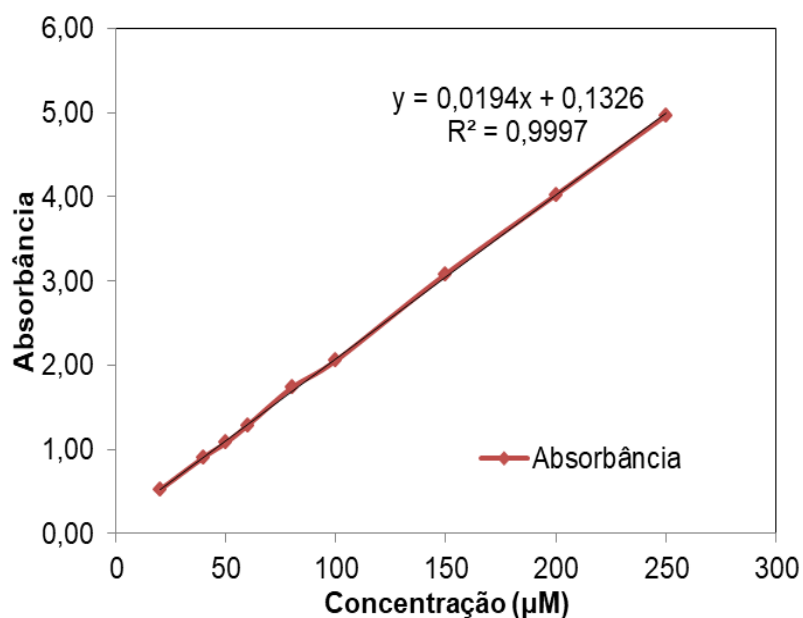
Os estudos a seguir foram realizados com a finalidade de avaliar a capacidade de partículas submicrométricas de vidro bioativo com estrôncio de incorporar e liberar o fitofármaco icariin.

##### **4.4.1 Incorporação de icariin em partículas de vidro com estrôncio**

As partículas VBSr incorporadas com icariin foram preparadas dispersando as amostras ( $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) em uma solução de icariin (Sigma-Aldrich) em DMSO na concentração de  $200\mu\text{M}$  e armazenadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. A metodologia de incorporação e a concentração selecionada foram baseadas nos estudos de WU et al., 2015. Além disso, foi observada uma baixa sensibilidade do equipamento de espectroscopia de UV-vis utilizado para a detecção de icariin, não permitindo realizar o estudo com concentrações menores (limite de detecção  $10\mu\text{M}$ ). Após o período de 24 horas, as amostras foram liofilizadas para a total remoção do solvente.

#### 4.4.1.1 Curva de trabalho para estudo de incorporação

Previamente à avaliação da eficiência de incorporação de icariin pelas partículas, foram obtidas curvas de trabalho para concentrações conhecidas (faixa de 200-10 $\mu$ M) de soluções de icariin. As soluções de diferentes concentrações foram por sua vez obtidas a partir de diluições da solução estoque de icariin em DMSO. Os valores das absorvâncias no comprimento de onda de 268nm foram obtidos por meio da técnica de UV-VIS (WANG et al., 2016b). Esses valores foram utilizados para obtenção da curva de trabalho (Figura 11).



**Figura 11** Curva de trabalho de Icarin em DMSO para a realização do ensaio de incorporação.

#### 4.4.1.2 Avaliação da eficiência de incorporação das partículas

Para a avaliação de eficiência da incorporação de icariin pelas partículas utilizadas, foi realizada a leitura no UV-VIS na faixa de 400-200nm da solução de icariin antes e após a incorporação em partículas de vidro com estrôncio. Para a avaliação da incorporação utilizou-se o sobrenadante, resultante do processo de centrifugação (3.400rpm por 10 minutos), e a eficiência de incorporação foi calculada de acordo com (CAPANEMA et al., 2018; TABIA et al., 2019) utilizando a Equação 2.

$$E_i = \left( \frac{A-B}{A} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde A ( $\mu\text{M}$ ), é a concentração inicial de icariin na solução e B ( $\mu\text{M}$ ), a concentração de icariin na solução após o período de incorporação.

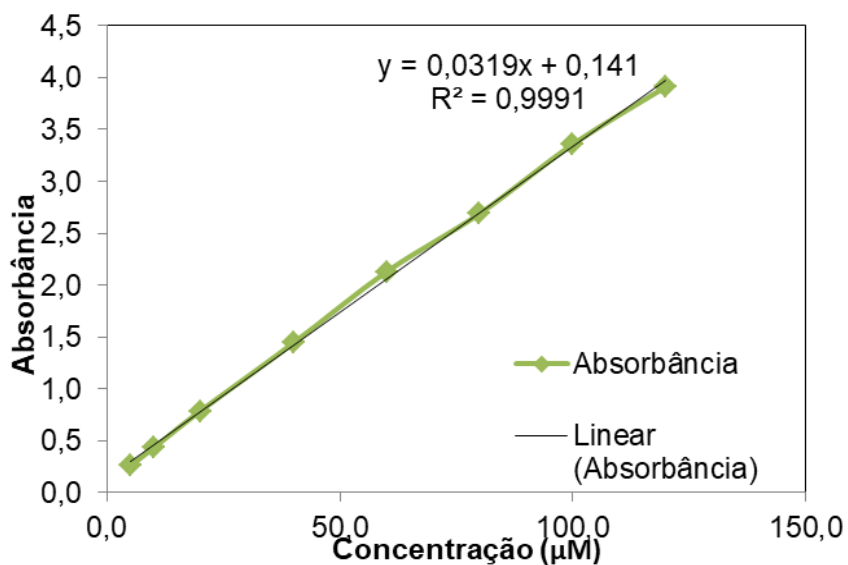
#### **4.5 Caracterização das partículas de vidros bioativos contendo estrôncio após a incorporação de icariin**

Essas caracterizações foram realizadas com a intenção de avaliar alterações químicas e morfológicas das partículas após o processo de liofilização, presente na metodologia de incorporação. As amostras foram caracterizadas por MFA e FTIR conforme metodologias descritas nos tópicos 4.2.2 e 4.2.3.

#### **4.6 Estudo da liberação de icariin das partículas de vidro com estrôncio**

##### **4.6.1 Curva de trabalho para estudo de liberação**

Previamente à avaliação de liberação de icariin pelas partículas, foi produzida a curva de trabalho para concentrações conhecidas do composto químico (faixa de 200-10 $\mu\text{M}$ ). Essas curvas foram obtidas utilizando o SBF como solvente através da técnica de UV-VIS no comprimento de onda de 268nm (WANG et al., 2016b; XIA et al., 2013; ZHANG; WANG; MENG, 2012). As soluções de diferentes concentrações foram obtidas a partir de diluições em SBF da solução estoque de icariin. Foram obtidos valores de absorvância para essas diferentes concentrações e que foram utilizados para obter a curva de trabalho (Figura 12) e a equação utilizada para calcular as concentrações de icariin no ensaio de liberação cumulativa. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



**Figura 12** Curva de trabalho de Icarin e SBF para o estudo de liberação de

#### 4.6.2 Avaliação da liberação cumulativa de icariin

Inicialmente, as partículas foram incubadas com SBF (pH = 7,4) na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup> e mantidas a 37°C. Em períodos de tempo de 1h, 3h, 6h, 24h, 72h, 7d, 14d e 21 dias, as amostras foram centrifugadas (Quimis, Centrifuga para Tubos - Q222T) por 5 minutos a 3.400rpm. 3mL dos sobrenadantes foram retirados e analisados através da espectroscopia de UV-vis e 3mL de novo SBF foram adicionados às amostras. A concentração de icariin liberada por cada amostra foi determinada através de espectrofotometria de UV - visível no comprimento de onda de  $\lambda = 268\text{nm}$ . Os ensaios foram realizados em triplicatas.

A liberação cumulativa de icariin em SBF foi determinada através da Equação 3 abaixo (TABIA et al., 2019; WANG; WANG; ZHANG, 2017):

$$C_{i,cumul} = \frac{V_a}{V_t} \times \sum C_{i-1} + C_i \quad \text{Equação 3}$$

Onde  $C_{i,cumul}$  é a concentração cumulativa,  $C_i$  é a concentração no tempo  $i$ ,  $C_{i-1}$  é a concentração no tempo  $i - 1$ ;  $V_a$  é o volume retirado da solução e  $V_t$  é o volume total da solução.

#### 4.6.3 Ensaios de diferenciação osteogênica das partículas de vidro com estrôncio e icariin

Os ensaios de diferenciação osteogênica foram realizados com o objetivo de realizar uma avaliação inicial do efeito de partículas esféricas de vidro bioativo com adição de estrôncio e icariin (na concentração de 200 $\mu$ M) no potencial de diferenciação reduzido de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratas com osteoporose. Os ensaios realizados estão descritos a seguir.

Os procedimentos realizados já foram descritos anteriormente nos tópicos 4.3 a 4.3.12. A seguir serão descritos os grupos utilizados nesses ensaios. Foram constituídos cinco grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico que estão representados na Tabela 4 e descritos a seguir: **1)** Grupo controle com CTM de ratas adultas sem osteoporose; **2)** Grupo controle com CTM de ratas adultas com osteoporose; **3)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VBIca; **4)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5Ica; **5)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10Ica. As células tratadas foram cultivadas por 7 e 14 dias e foram obtidos: a conversão do MTT em cristais de formazan, atividade da fosfatase alcalina e avaliação da mineralização.

**Tabela 4** Identificação dos grupos experimentais

Grupos	Partícula	CTM de ratas não castradas	CTM de ratas com osteoporose
1	-	X	
2	-		X
3	VBIca		X
4	VBSr5Ica		X
5	VBSr10Ica		X

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo da composição química por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

A análise química quantitativa de vidros bioativos é fundamental para compreender e correlacionar a sua estrutura com a sua composição. As composições químicas (em mol%) das partículas de vidro foram analisadas através da técnica de fusão do metaborato de lítio e ICP-OES. Os resultados obtidos estão na Tabela 5, juntamente com as composições nominais das amostras.

**Tabela 5** Composição química nominal e composição química obtida através da técnica de ICP-OES das partículas de vidro obtidas

Amostras	Composição nominal (%mol)				Composição ICP-OES (%mol)			
	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SrO	SiO <sub>2</sub>	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SrO
<b>VB</b>	80	16	4	-	90,1	9,9	<1,0	-
<b>VBSr5</b>	80	11	4	5	88,9	7,8	<1,0	3,3
<b>VBSr10</b>	80	6	4	10	88,7	4,5	<1,0	6,9
<b>VBSr16</b>	80	-	4	16	88,7	-	<1,0	11,3

Foram observadas diferenças entre as composições nominais e as obtidas por ICP-OES. Processos de filtragem e lavagem são utilizados para a obtenção do precipitado da reação e, em sequência, a obtenção das partículas de vidro bioativo, e podem remover parte dos reagentes e precursores do meio, levando a uma redução do teor de determinados componentes nas mesmas (TSIGKOU et al., 2014).

Espera-se que a substituição de Ca pelo Sr na rede dos vidros bioativos seja facilitada, já que possuem a mesma valência e tamanhos similares de raio iônico, de 1,13Å e 1,00Å para Sr e Ca respectivamente (HESARAKI et al., 2010b). Além disso, espera-se que esses íons se comportem de maneira similar dentro da estrutura dos vidros, atuando como modificadores de rede (MARTIN et al., 2012). No entanto, essa incorporação ocorre por difusão iônica durante o tratamento térmico do material e a diferença observada nos teores de CaO e SrO podem estar relacionados à remoção dos

precursores nitrato de cálcio e nitrato de estrôncio, respectivamente, durante o processo de lavagem, realizado previamente ao tratamento térmico (GREASLEY et al., 2016; LABBAF et al., 2011; LIN et al., 2009).

Sabe-se que a composição final das partículas de vidro é afetada caso o líquido presente nos poros seja removido antes da secagem. No processo de síntese, o nitrato de cálcio, assim como o nitrato de estrôncio, remanescentes na solução presente dentro dos poros, foram provavelmente depositados nas superfícies das partículas de sílica durante a secagem e só entram na rede, por difusão iônica, durante o tratamento térmico do material (GREASLEY et al., 2016; LABBAF et al., 2011; LIN et al., 2009).

Tratando-se do teor de  $P_2O_5$  nas amostras, é necessário considerar que o precursor de fósforo, o TEP, foi adicionado em quantidades muito menores em comparação aos outros reagentes e é um composto que reage mais lentamente que o TEOS (precursor de Si) o que pode ter afetado sua inserção na rede e ter contribuído para as menores frações de  $P_2O_5$  nos vidros sintetizados (BARRIONI et al., 2017). Além disso, sabe-se que pequenas quantidades de fosfato em vidros bioativos formam ortofosfato, que é fracamente ligado à rede do vidro e que se perde rapidamente em dissolução (JONES; HENCH, 2003). No presente estudo, as amostras obtidas não apresentaram quantidades significativas de  $P_2O_5$ . Apesar disso, estudos relatam que o fosfato no sistema ternário não é um componente essencial para a bioatividade e que vidros do sistema binário ( $SiO_2:CaO$ ) apresentam bioatividade tanto *in vivo* quanto *in vitro* (EBISAWA et al., 1990; JONES et al., 2007; LABBAF et al., 2011).

Apesar do elevado teor de  $SiO_2$  observado nas amostras, estudos mostram que, dentro de uma faixa de composição de 50 a 90%mol de  $SiO_2$ , todos os vidros sol-gel apresentam bioatividade com a formação da camada de apatita em SBF, podendo haver uma diminuição da taxa de formação dessa camada proporcional ao aumento de  $SiO_2$  na composição (MARTÍNEZ; IZQUIERDO-BARBA; VALLET-REGÍ, 2000).

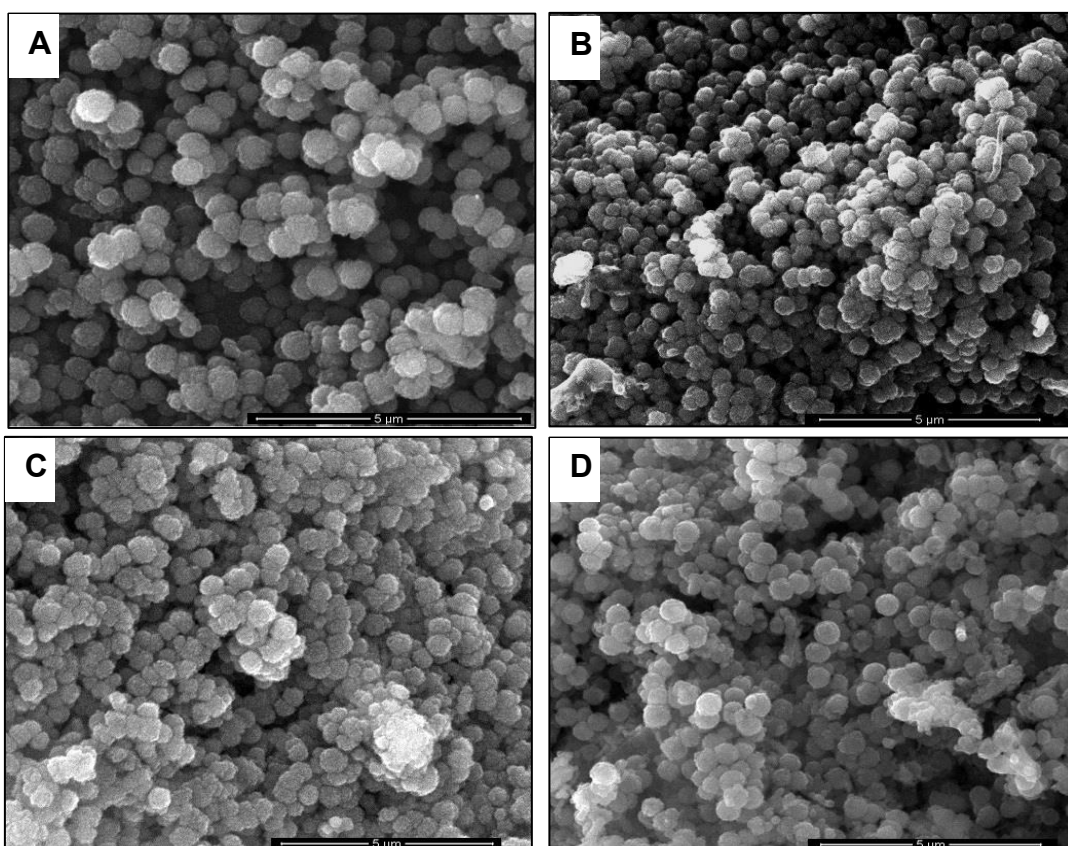
Apesar das diferenças observadas na composição, a incorporação de estrôncio foi efetiva em diferentes concentrações. As concentrações obtidas estão dentro da faixa de concentração observada em estudos (0,6 - 36%mol), onde os efeitos positivos dos vidros bioativos com estrôncio na diferenciação osteogênica *in vitro* foram obtidos (LAO;



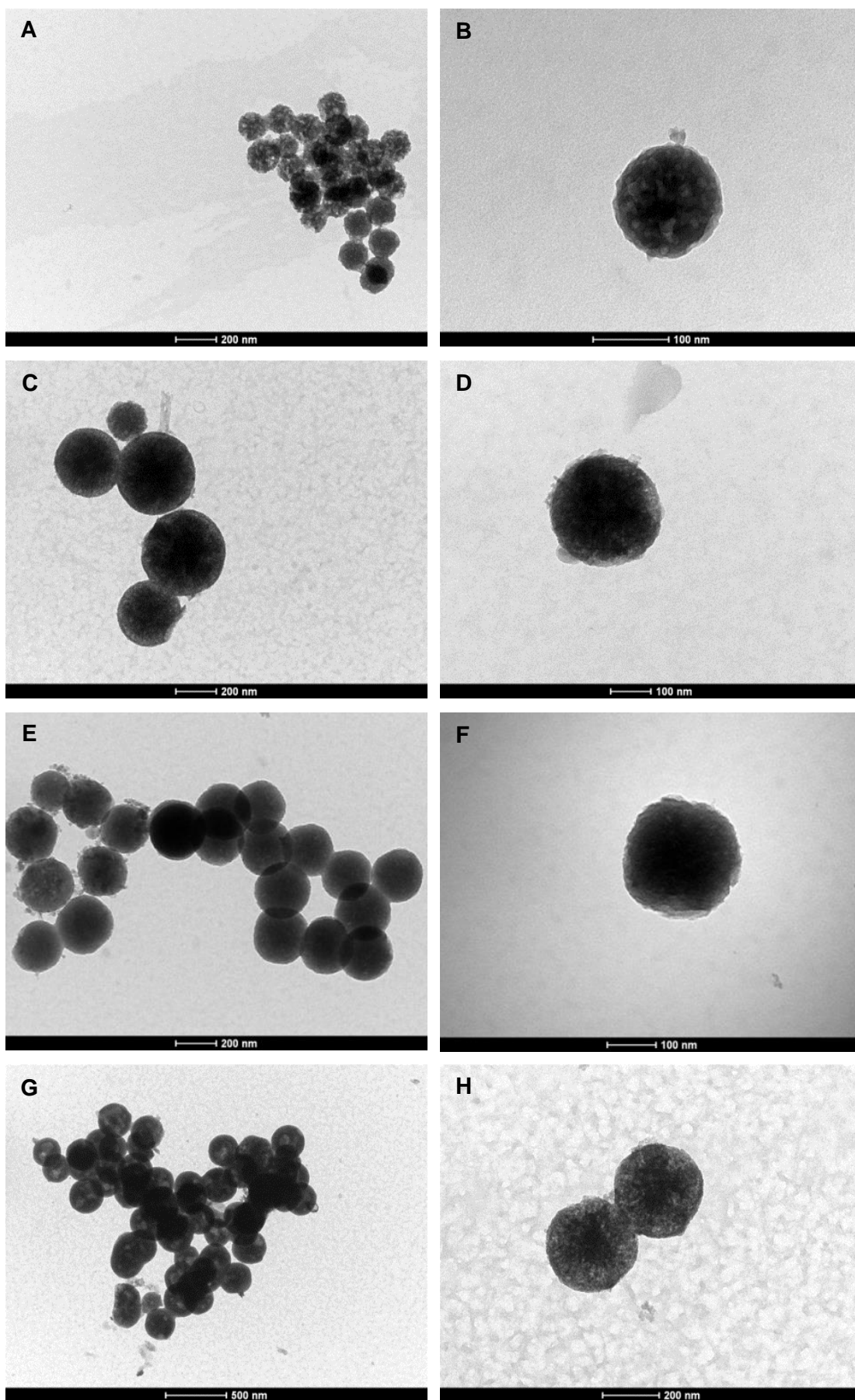
NEDELEC; JALLOT, 2009; TAHERKHANI; MOZTARZADEH, 2016; WU et al., 2012b; ZHANG et al., 2018).

### 5.1.1 Avaliação das propriedades morfológicas e texturais

As morfologias das partículas foram avaliadas por MEV (**Figura 13**), MET (Figura 14) e MFA (Figura 15). Foi notado que todas as amostras possuem morfologia esférica e não foram observadas diferenças morfológicas entre os grupos de partículas. Trabalhos anteriores mostram que quando comparadas às partículas de forma irregular, as esféricas possuem melhores propriedades físico-químicas e biológicas. Além disso, quando consideramos as suas possíveis aplicações para auxiliar no processo de regeneração do tecido ósseo e sua utilização como um material injetável, esse formato melhora a injetabilidade do material, por possuírem melhores propriedades de fluxo (HU et al., 2014a; LEI et al., 2011).

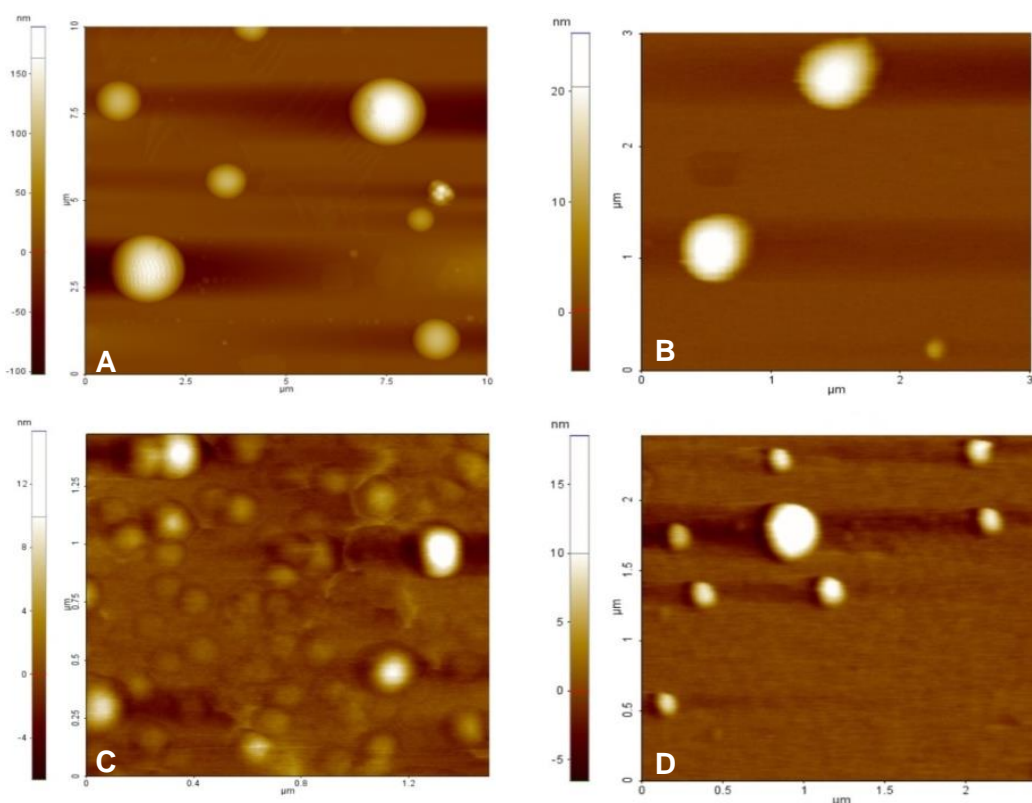


**Figura 13** Imagens das partículas de vidro bioativo obtidas por MEV. A: VB; B: VBSr5; C: VBSr10 e D: VBSr16.



**Figura 14** Imagens das partículas de vidro bioativo obtidas por MET. A/B: VB; C/D: VBSr5; E/F: VBSr10 e G/H: VBSr16.

Ao analisar as imagens do MET, também é possível notar que não há organização de poros presentes nas partículas. Essa organização é observada em partículas de sílica produzidas com a utilização do mesmo surfactante (CTAB) (BHARTI et al., 2013). De acordo com GUO; LÜ; KE, 2019, geralmente a obtenção de mesoporos ordenados com a utilização de CTAB é mais complexa devido ao controle da temperatura e concentrações que são necessários para obter estruturas organizadas através desse surfactante. Nos estudos de LI et al., 2015b, foi observado que os mesoporos ordenados dos vidros bioativos se tornaram desordenados (do tipo *wormlike*) com a diminuição da concentração de CTAB. Para a obtenção de partículas mesoporosas seria necessário chegar às condições ideais para o CTAB ou buscar novos surfactantes.



**Figura 15** Morfologia das partículas de vidro bioativo obtidas por MFA. A: VB; B: VBSr5; C: VBSr10 e D: VBSr16.

Além da morfologia, o tamanho e a dispersão das partículas foram avaliados através das técnicas de DLS, MET e MFA (Tabela 6). A diferença de tamanho observada entre o DLS e as outras técnicas pode ser atribuída ao fato de que essa técnica mede o raio hidrodinâmico, o que também considera os aglomerados presentes. Nesse caso, pode-se dizer que os resultados obtidos das imagens de MET são mais próximos dos

tamanhos reais das partículas avaliadas e as avaliações realizadas com a MFA possuem valores dentro da faixa obtida pela microscopia eletrônica de transmissão (HOO et al., 2008; TSIGKOU et al., 2014).

**Tabela 6** Comparação dos diâmetros de VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16 obtidos pelas técnicas DLS, MET e AFM e valores de potencial Zeta.

<b>Amostras</b>	<b>Diâmetro médio DLS (nm)</b>	<b>Diâmetro médio MET (nm)</b>	<b>Diâmetro médio AFM (nm)</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b> (pH = 7; 25°C)
<b>VB</b>	343 ± 33	154 ± 39	183 ± 180	-21,2 ± 3,3
<b>VBSr5</b>	656 ± 100	267 ± 97	374 ± 184	-17,33 ± 0,39
<b>VBSr10</b>	438 ± 115	252 ± 23	228 ± 169	-22,09 ± 0,75
<b>VBSr16</b>	481 ± 74	259 ± 47	252 ± 152	-20,63 ± 0,82

Na avaliação dos tamanhos das partículas de cada grupo de amostra na Tabela 5, foi observado um aumento no tamanho das amostras que possuem adição de estrôncio (VBSr5, VBSr10 e VBSr16), quando comparadas a que não possui (VB). Essa diferença foi observada por todas as técnicas avaliadas e o aumento pode ser atribuído ao fato do íon Sr<sup>2+</sup> possuir um maior raio iônico que o Ca<sup>2+</sup> que leva a uma rede mais expandida e uma partícula de maior tamanho (FREDHOLM et al., 2012; GENTLEMAN et al., 2010; ZHANG et al., 2018). Mesmo na partícula que não possui o íon cálcio, a incorporação de estrôncio também aumentou o tamanho da partícula.

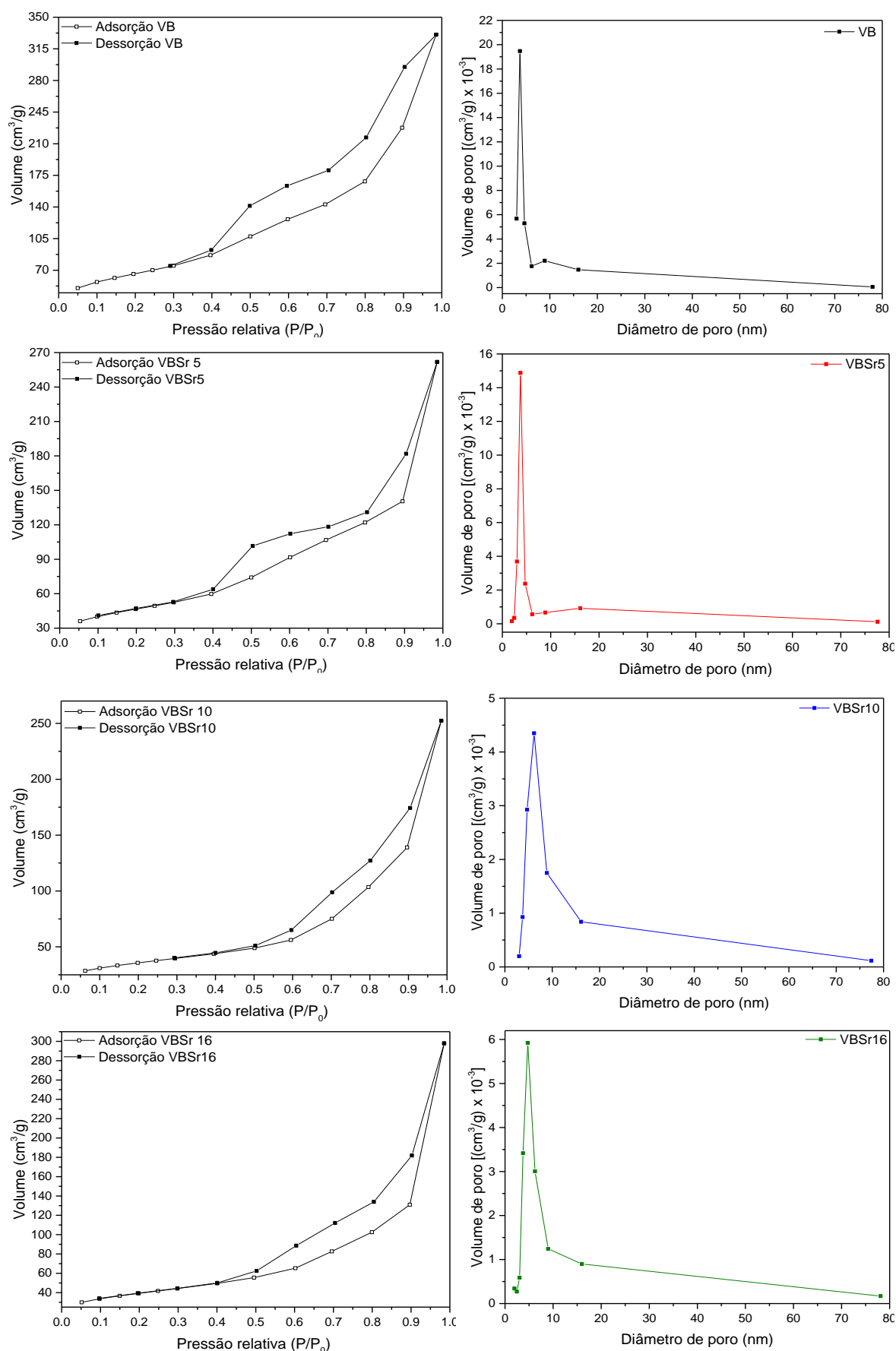
Apesar do aumento do tamanho das partículas observado em todos os grupos contendo Sr, elas mantiveram-se na faixa submicrométrica. Comparadas às micropartículas, as partículas submicrométricas são uma alternativa atrativa para a regeneração, principalmente de tecidos duros já que o menor tamanho e a maior área superficial fazem delas ideais para a injeção em defeitos ósseos ou para a incorporação dentro de uma matriz polimérica para a síntese de *scaffolds* compósitos porosos. Além disso, sabe-se que partículas submicrométricas e com valores altos de área superficial favorecem a incorporação de fármacos, podendo ser mais favoráveis a utilização como sistemas de liberação (HU et al., 2014b; LABBAF et al., 2011).

Outra importante avaliação realizada foi a medida do potencial zeta ( $\zeta$ ), os resultados mostraram que todas as partículas apresentam carga negativa em suas superfícies, conforme resultados apresentados na Tabela 6. Essas são relacionadas aos grupos hidroxilas presentes nas superfícies das amostras e que levam a uma carga negativa em pH acima do ponto isoelétrico (PI) (EL-FIQI et al., 2012). Trabalhos anteriores mostraram que a adesão e a proliferação de biomoléculas e células em partículas são melhoradas quando o potencial  $\zeta$  é negativo (DE OLIVEIRA et al., 2013; DOOSTMOHAMMADI et al., 2011). Além disso, partículas com valores baixos de potencial  $\zeta$ , normalmente na faixa entre 2mV e - 5mV, tendem a coagular ou flocular (DOOSTMOHAMMADI et al., 2011). Uma boa estabilidade é obtida quando o potencial  $\zeta$  está próximo de 30mV (negativo ou positivo) (HONARY; ZAHIR, 2013), o que é desejado principalmente para aplicações terapêuticas. Como observado todas as partículas de vidro bioativo contendo ou não SrO apresentaram valores próximos a - 30mV, o que favorece a utilização das mesmas nas aplicações desejadas.

Análises de adsorção de nitrogênio foram realizadas para avaliar as propriedades texturais dos vidros bioativos. Isotermas representativas da adsorção/dessorção de nitrogênio e as curvas de distribuição de tamanho de poros derivadas da dessorção (modelo BJH) são apresentadas na Figura 16. Os valores de área superficial obtidos pelo método BET e os de volume de poros e diâmetros de poros obtidos pelo algoritmo BJH são apresentados na Tabela 7. Foram identificadas isotermas do tipo IV que são características de materiais mesoporosos (poros entre 2 e 50nm) e histereses do tipo H3 que estão associadas a mesoporos em forma de fenda (THOMMES et al., 2015; WANG; PAN; CHEN, 2019). A adição de estrôncio levou a redução da área superficial e do volume de poros e ao aumento do diâmetro médio de poros conforme apresentado na Tabela 7.

**Tabela 7** Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.

Amostra	Área superficial específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros total (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio de poros (nm)
<b>VB</b>	232,5	0,5	8,7
<b>VBSr5</b>	162,9	0,4	9,9
<b>VBSr10</b>	123,2	0,3	12,6
<b>VBSr16</b>	137,6	0,4	13,7



**Figura 16** Isotermas de adsorção de nitrogênio e distribuição do diâmetro médio de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.

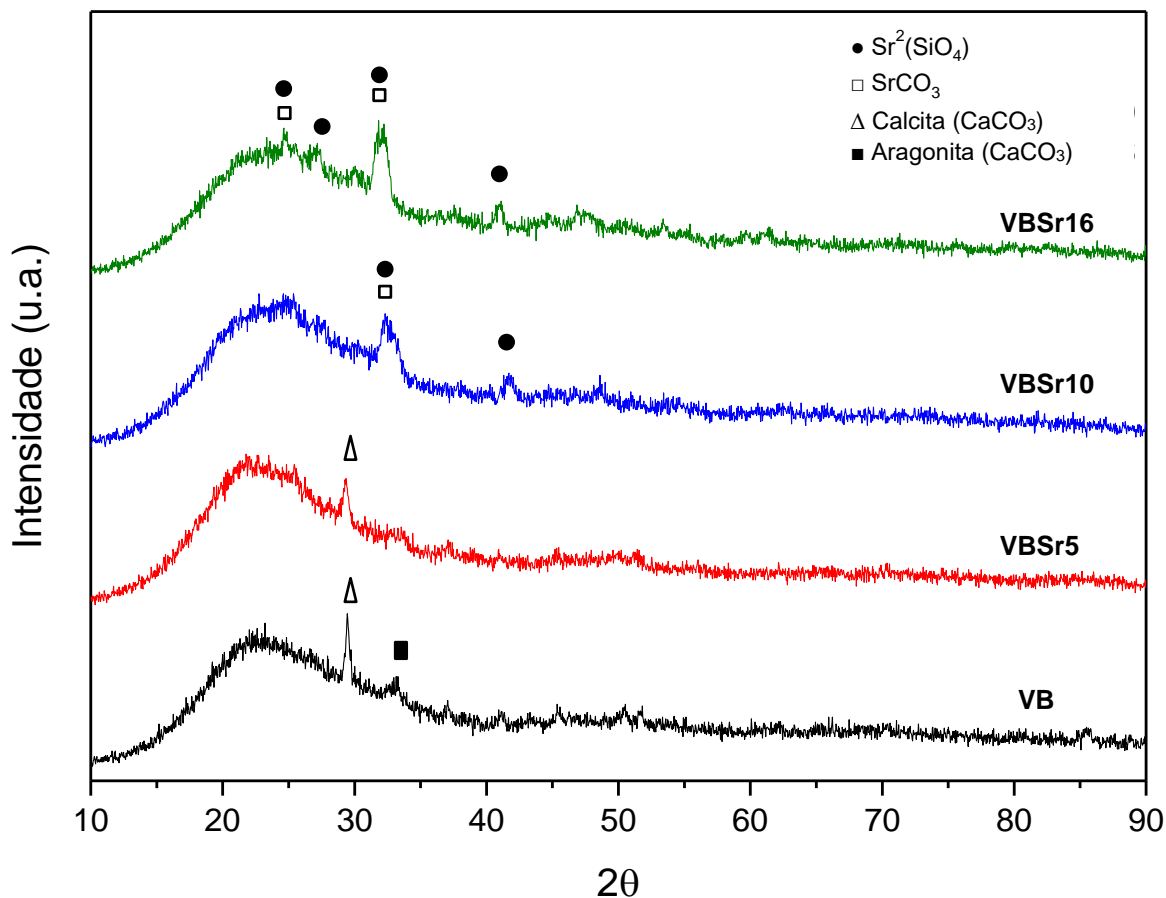
Estudos com a incorporação de estrôncio na rede de vidros bioativos mostraram que o aumento da quantidade de estrôncio na composição pode interferir nas interações entre  $\text{SiO}^4$  e as cabeças catiônicas do template levando a defeitos estruturais na estrutura polimerizada, conseqüentemente alterando a estrutura mesoporosa final. (FIORILLI et al., 2018; WU et al., 2012b). Outros estudos também mostraram que a incorporação de íons adicionais, como os divalentes Mg ou Zn, trivalentes como Ce ou B, em um sistema mesoporoso diminuíram significativamente as propriedades mesoporosas (MURPHY et al., 2009; SALINAS et al., 2011; WU et al., 2011b). Sendo assim, nos resultados obtidos a diminuição da área superficial e do volume de poros e o aumento do tamanho de poros poderia ser relacionada a substituição do Ca pelo Sr.

É possível notar, no entanto, que as partículas obtidas possuem valores de área superficial superiores aos dos vidros sol-gel convencionais e dos vidros obtidos pela rota de fusão e, em alguns casos, aos dos vidros sol-gel convencionais, o que permite uma melhor reatividade em ambiente fisiológico (FIORILLI et al., 2018; IZQUIERDO-BARBA; VALLET-REGÍ, 2015). Além disso, a presença de poros na faixa mesoporosa favorece a indução da nucleação e cristalização da hidroxiapatita carbonatada, já que os poros podem exercer a função de sítios de nucleação (PEREIRA; CLARK; HENCH, 1995). Materiais que possuem mesoporos e alta área superficial favorecem a liberação iônica da superfície do biomaterial e, conseqüentemente, aumenta a bioatividade do vidro bioativo (LU et al., 2013).

### **5.1.2 Avaliação estrutural**

As análises estruturais das partículas de vidro bioativo contendo ou não estrôncio foram realizadas através do DRX e FTIR e os resultados são apresentados a seguir.

A Figura 17 apresenta o difratograma das partículas de vidro bioativo. Em todas as amostras é possível observar um halo amplo e difuso entre 15 e 35° (2 $\theta$ ), sugerindo a formação de uma estrutura de sílica com caráter predominantemente amorfa em todas as amostras (SABOORI et al., 2009). A vantagem do material ser amorfo é o fato de que a estrutura aberta da rede formada permite que moléculas de água penetrem na sua estrutura muito mais facilmente, facilitando também a dissolução do material (BRAUER, 2015)



**Figura 17** Padrões de Difração de Raios-X (DRX) obtidos para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.

Nas amostras VB e VBSr5 foi possível identificar picos cristalinos referentes a dois carbonatos de cálcio na forma de calcita ( $\sim 29,3^\circ$ ) e aragonita ( $\sim 32,8^\circ$ ) que apresentam compatibilidades com seus respectivos padrões de difração (JCPDS 88-1807 para calcita e 76-0606 para aragonita). Pequenas quantidades de carbonato de cálcio geralmente surgem da carbonatação atmosférica durante as preparações sol-gel e hidrotérmica das fases de silicato de cálcio em condição alcalina (HURT; GETTI; COLEMAN, 2014; LI; BASTAKOTI; YAMAUCHI, 2015; RUIZ-CLAVIJO et al., 2019).

Sabe-se que todos os polimorfos cristalinos do carbonato de cálcio são biocompatíveis em relação ao tecido ósseo (GOUGH; NOTINGHER; HENCH, 2004) e trabalhos anteriores mostram que a sua formação não prejudica a biocompatibilidade do vidro bioativo (RUIZ-CLAVIJO et al., 2019).

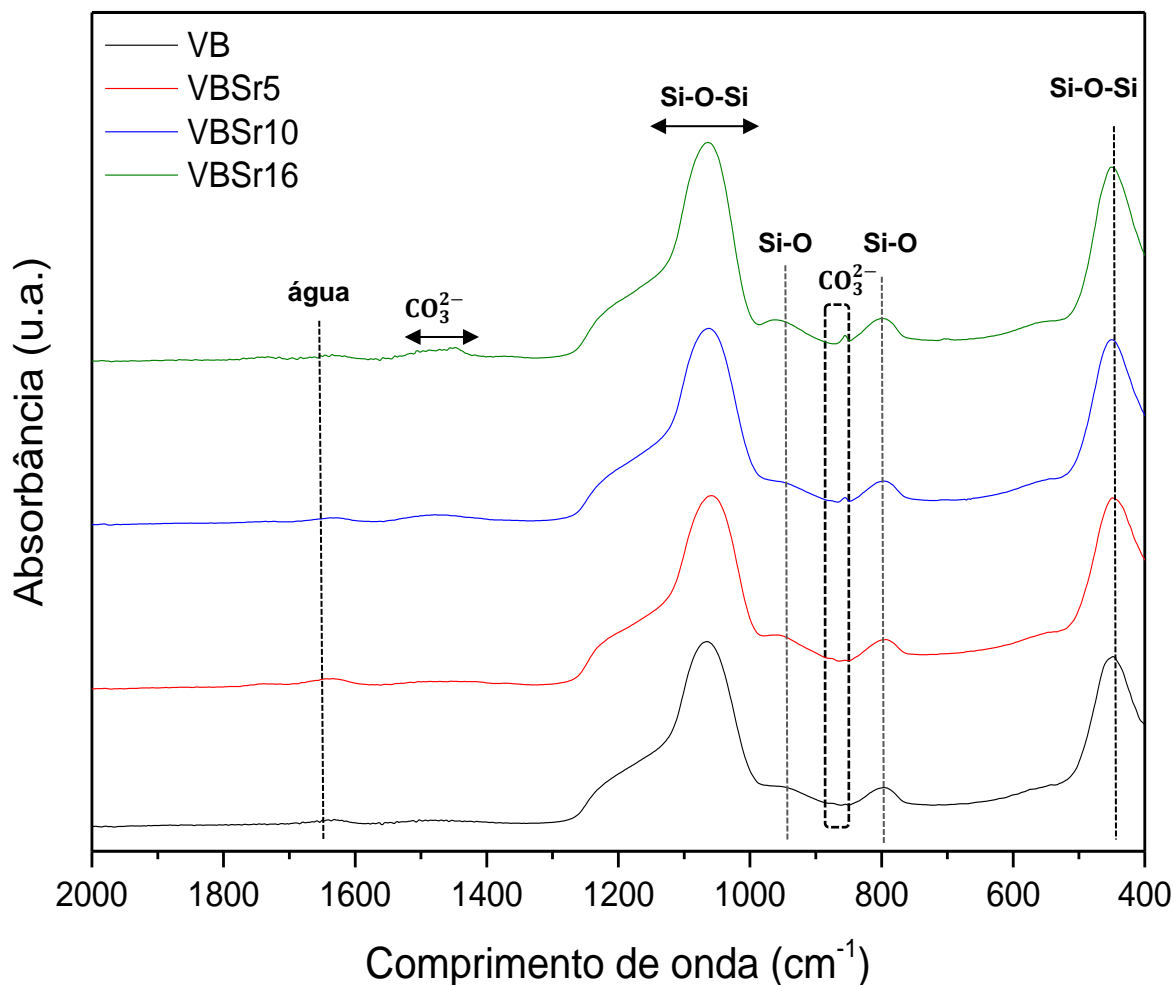


Nas amostras VBSr10 e VBSr16, observa-se que, à medida em que há um aumento do conteúdo de Sr há também um ligeiro aumento da tendência a cristalização. Os picos presentes podem ser relacionados a compostos como o silicato de estrôncio  $\text{Sr}_2\text{SiO}_4$  (JCPDS 76-1630) e carbonato de estrôncio  $\text{SrCO}_3$  (JCPDS 84-1778). Esses compostos cristalinos também foram descritos em estudos onde o Sr foi incorporado a rede de vidros bioativos e podem afetar a dissolução e a bioatividade do material (SOLGI et al., 2015; TAHERKHANI; MOZTARZADEH, 2016).

A Figura 18 apresenta os espectros de FTIR das partículas estudadas. As principais bandas de vibração presentes nesses espectros são típicas de vidros bioativos. A banda na região entre  $450 - 470\text{cm}^{-1}$  pode ser relacionada a deformação angular de ligações Si-O-Si de estruturas amorfas (EL-KADY; ALI, 2012; PIRAYESH; NYCHKA, 2013).

As absorvâncias  $725$  e  $810\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas ao estiramento simétrico Si-O, enquanto que o estiramento assimétrico dessas ligações pode ser atribuído às bandas na faixa entre  $1000 - 1200\text{cm}^{-1}$  (BARRIONI et al., 2019; MOREIRA et al., 2016). Em  $965\text{cm}^{-1}$  é possível observar uma absorvância com uma intensidade fraca e que ocorre devido às ligações Si-O contendo um oxigênio não ligante (Si-O-NBO) por tetraedro de  $\text{SiO}^4$  (BARRIONI et al., 2017). A absorvância em  $1635\text{cm}^{-1}$  é atribuída a água molecular adsorvida na superfície do vidro (BARRIONI et al., 2019).

As bandas observadas na faixa de  $1400 - 1550\text{cm}^{-1}$  e podem estar relacionadas com grupos carbonato adsorvidos através da reação do vidro bioativo com o  $\text{CO}_2$  da atmosfera (DZIADEK et al., 2016b; HESARAKI et al., 2010b). No trabalho de DESSOU et al., 2017, onde diferentes concentrações de estrôncio foram adicionadas ao sistema ternário  $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO}$ , a banda fraca presente na faixa de  $\sim 855\text{cm}^{-1}$  indica a presença de carbonato de estrôncio,  $\text{SrCO}_3$ . Sabe-se que a adição do estrôncio é responsável pela expansão da rede do vidro bioativo devido ao maior tamanho desses íons quando comparados ao cálcio. Dessa maneira pode-se sugerir que a formação do grupo carbonato é favorecida nos vidros bioativos contendo estrôncio devido à expansão da rede que aumenta a permeação do carbonato (O'DONNELL; HILL, 2010; SOLGI et al., 2017).



**Figura 18** Espectros de FTIR obtidos para as amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16.

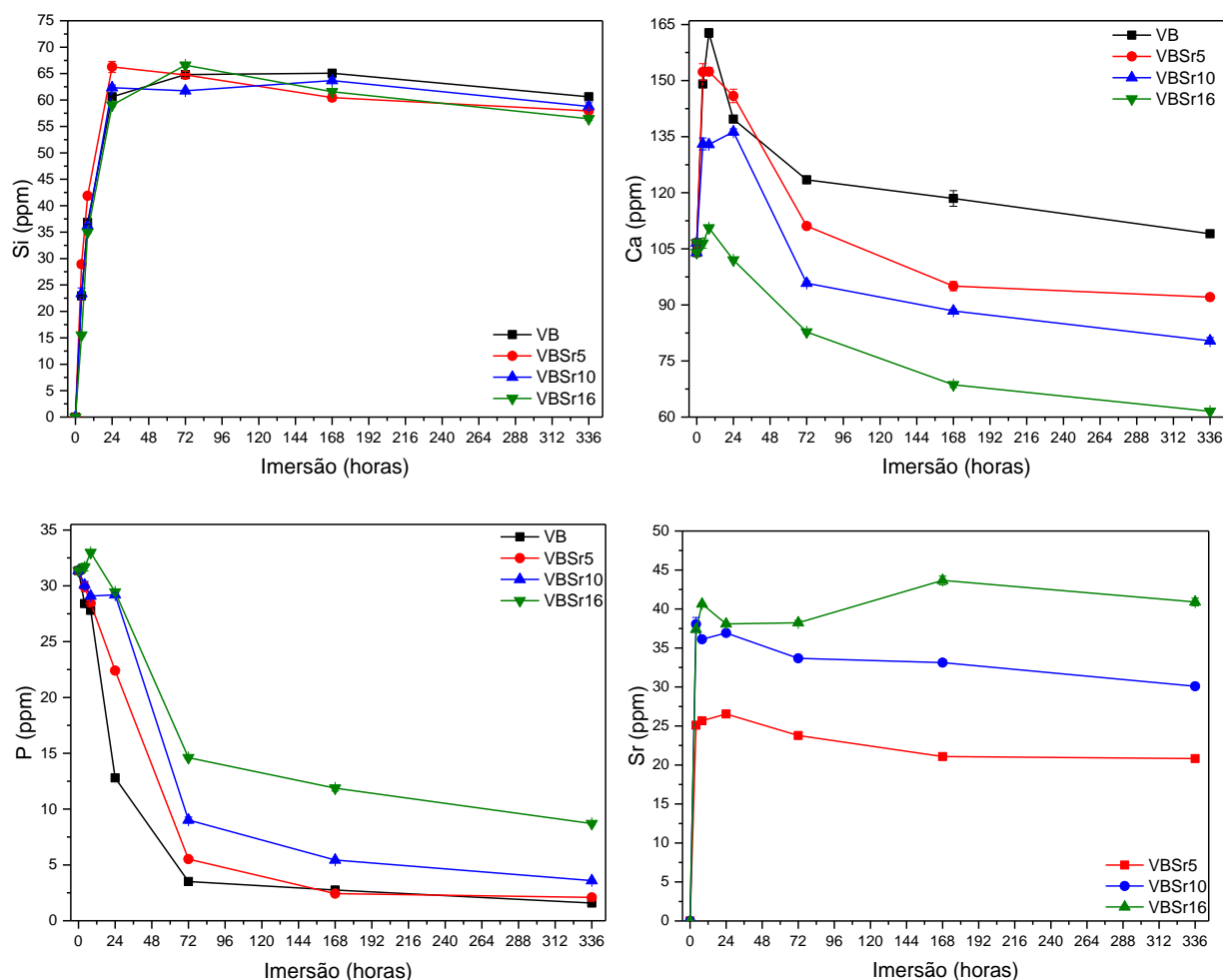
Também foi observado em outros estudos, que a incorporação de estrôncio na rede de vidros bioativos não ocasiona diferenças significativas nos espectros de FTIR, além da presença dos grupos carbonatos descritos anteriormente, independente das rotas e composições utilizadas (DZIADEK et al., 2016a; FREDHOLM et al., 2010; HESARAKI et al., 2010a; HU et al., 2017; LEITE et al., 2018; MOGHANIAN; FIROOZI; TAHRIRI, 2017; SOLGI et al., 2017; ZHAO et al., 2018)

Os resultados de DRX observados para as amostras demonstram que com o aumento do conteúdo de estrôncio há um aumento da tendência do vidro a cristalização, o que pode afetar a dissolução e bioatividade do material. Nos espectros de FTIR, apesar do discreto aparecimento da fraca banda relacionado à presença de carbonato, não foi possível observar nenhuma outra diferença nos espectros das partículas.

### 5.1.3 Avaliação da liberação iônica e bioatividade em SBF

A Figura 19 apresenta a concentração de Si, Ca, P e Sr em solução após imersão dos vidros bioativos em SBF por diferentes períodos de tempo, conforme avaliados por ICP-OES. Observa-se, inicialmente, uma liberação de Si logo nas primeiras horas de imersão em SBF seguido de estabilização após 3 dias (72 horas) de ensaio, com valores na faixa de 60-65 ppm. Diversos estudos demonstram que a liberação de íons Si estimula a proliferação de osteoblastos *in vitro* e é capaz de auxiliar também na regulação da expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica, na regulação de ciclos celulares e proteínas da matriz extracelular e na inibição da expressão genética de osteoclastos (LIU et al., 2016; ODATSU et al., 2015).

As concentrações de cálcio e fósforo em SBF também foram monitoradas em função do tempo. Sabe-se que a diminuição das concentrações desses íons é um bom indicador da precipitação fosfato de cálcio (JONES; SEPULVEDA; HENCH, 2001; MAÇON et al., 2015). As amostras que possuem Ca em sua composição iniciaram a liberação desse íon logo nas primeiras horas do ensaio, a quantidade de íons cálcio liberada foi proporcional a quantidade presente na composição da amostra. Após esses períodos, todas as amostras começaram a apresentar uma diminuição na concentração de íons Ca. Em VBSr16, onde não há Ca na composição, também foi observada a diminuição dos íons Ca na solução correspondente a essa amostra. Uma provável causa poderia ser a migração dos íons cálcio presentes no SBF para a superfície do material. Em estudos de vidros bioativos onde houve a substituição total de Ca por Sr na composição do vidro, é sugerido que essa diminuição nas soluções ocorre pela formação de uma mistura de hidroxiapatita de Ca e Sr (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; LIU et al., 2016; O'DONNELL et al., 2008). É importante saber que além do papel no processo de biomineralização, o cálcio pode também induzir a proliferação de osteoblastos, aumentando o potencial terapêutico (MURPHY et al., 2009).



**Figura 19** Concentração de Si, P, Ca e Sr em SBF por diferentes períodos de tempo.

As concentrações de P das soluções correspondentes às amostras VB, VBSr5 e VBSr10 apresentaram redução logo nas primeiras 4 horas de ensaio, enquanto que para VBSr16, essa redução iniciou após 24 horas. A redução dos íons P é um indicativo da formação de HA pois para a formação da camada há a migração desse íons para a superfície do vidro (JONES, 2013). Ao final das duas semanas do ensaio, as concentrações nas soluções das amostras VB, VBSr5, VBSr10 e VBSr16 atingiram um mínimo de aproximadamente 1,6ppm, 2,1ppm, 3,6ppm e 8,7ppm, respectivamente. É possível perceber que quanto maior a concentração de Sr e conseqüentemente menor a de Ca mais lenta foi a redução do teor de P. Tal observação pode estar relacionada a redução na taxa de formação da camada de fosfato de cálcio (LIU et al., 2016). Portanto, os resultados indicam que quanto maior a incorporação de Sr, menor é a taxa de formação de HA durante o período do estudo.

MASSERA e HUPA, 2014, reportaram que a substituição de Ca por Sr em vidros bioativos induziu a formação de uma camada de hidroxiapatita contendo estrôncio. Porém essa camada era mais fina, sugerindo que a substituição retardou a bioatividade do vidro, resultando em menor consumo de íons P. Esses resultados estão de acordo com os resultados observados para as partículas submicrométricas de VB contendo estrôncio, estudadas no presente trabalho.

A liberação de Sr foi proporcional à quantidade presente na composição das partículas. Todas as amostras contendo o íon apresentaram uma liberação rápida nas primeiras 24 horas, estabilizando-se após 72 horas, nas amostras VBSr5 e VBSr10 e 168 horas na VBSr16. A concentração máxima atingida foi de 27ppm (~0,30mM), 37ppm (~0,42mM) e 44ppm (~0,50mM) para VBSr5, VBSr10 e VBSr16, respectivamente.

Trabalhos anteriores mostram que existe uma faixa de concentração de estrôncio que promove respostas osteogênicas positivas porém essa performance biológica ótima depende também do tipo celular, mudanças nas propriedades físico-químicas e a quantidade de Sr nos materiais (LIU et al., 2016). BONNELYE et al., 2008, encontrou que concentrações baixas como 0,1mM de  $Sr^{2+}$ , promovem a diferenciação de osteoblastos, um aumento no número de nódulos de mineralização associados a um aumento também nas expressões de marcadores relacionados a diferenciação osteogênica como ALP, Sialoproteína e Osteocalcina. Em estudos com células MC3T3-E1 a concentração do íon a 1mM estimulou a proliferação celular e um aumento nos níveis de mRNA de osteocalcina e BMP-2 (PENG et al., 2011; TAKAOKA et al., 2010). Além disso PENG et al., 2011, reportou que a expressão de mRNA da osteoprotegerina e a secreção da proteína em células MC3T3-E1 aumento significativamente após tratamento com Sr e foi dose dependente (0-3 mM).

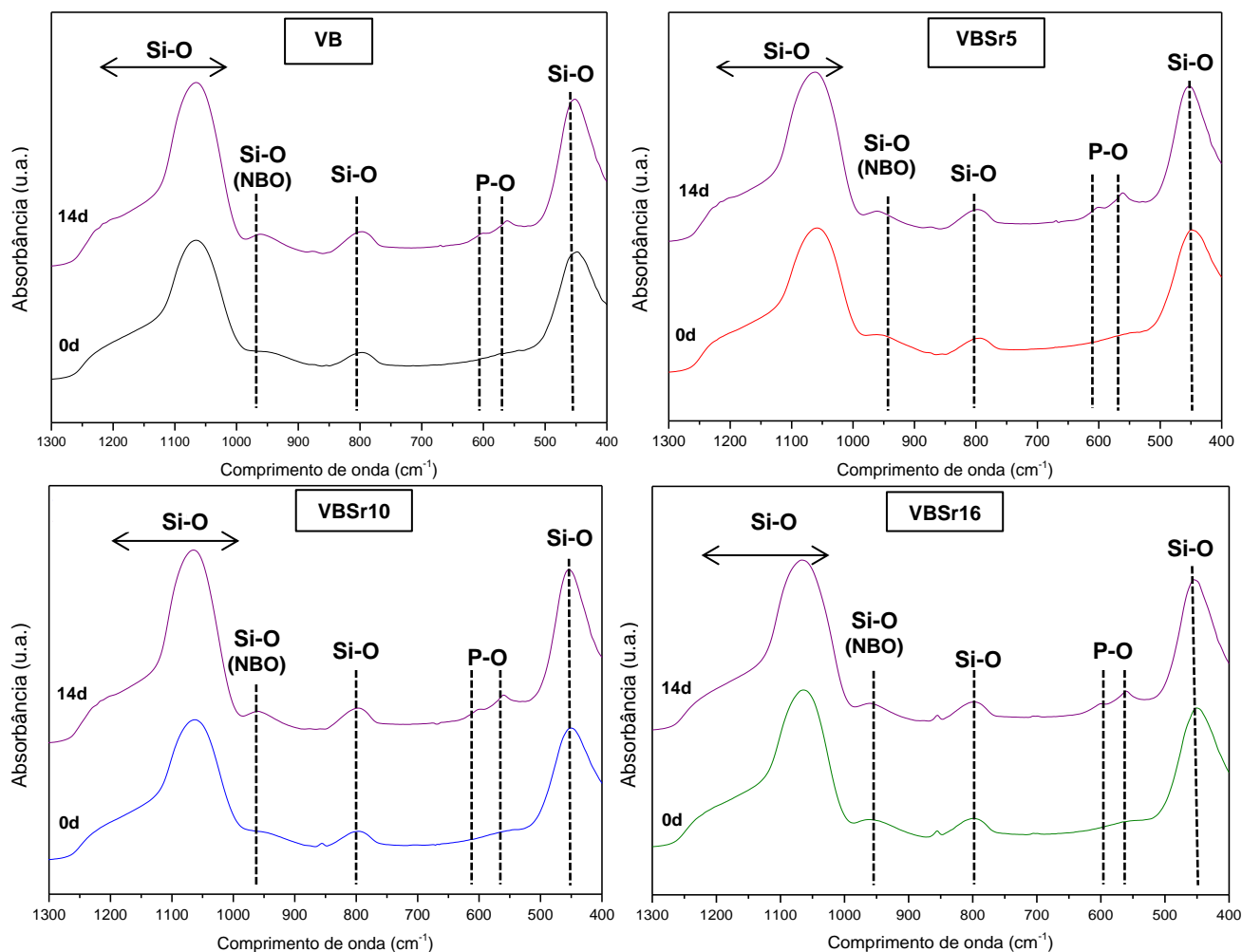
No trabalho de LIU et al., 2016, foram produzidos vidros com adição de estrôncio e o material com 5% de Sr, apresentou uma liberação iônica de aproximadamente 16ppm (0,18mM) e foi o que apresentou melhores resultados de diferenciação osteogênica de células MC3T3-E1. GENTLEMAN et al., 2010 mostrou que os íons liberados de vidro silicatos incorporados com Sr aumentam a atividade de células do tecido ósseo. Nesse estudo, o tratamento com o produto iônico desses vidros (liberação iônica no meio de cultura na faixa de 5-23ppm) resultaram em um aumento da atividade de osteoblastos (linhagem celular, Saos-2) e inibiram a diferenciação de osteoclastos.

Em relação às concentrações liberadas de Sr, elas se encontram dentro da faixa relatada que é capaz de induzir uma resposta osteogênica, e a composição do vidro bioativo pode ser ajustada para se obter níveis desejados de liberação iônica e formação de HAC de acordo com a aplicação específica. Atualmente, além de seu potencial uso no tecido ósseo, as propriedades antibacterianas de vidros bioativos contendo estrôncio estão também sendo exploradas (BRAUER et al., 2013; LIU et al., 2016)

É importante salientar que, dependendo da aplicação final do material, taxas de dissolução mais lentas ou mais rápidas podem ser requeridas. No caso de taxas baixas de dissolução, existiria uma vantagem quando a aplicação dos vidros bioativos é realizada para o reparo ósseo onde há uma baixa atividade metabólica correlacionada a algumas patologias, como a osteoporose. As taxas de liberação mais lentas dos íons dos VB seriam mais adequadas pois coincidiriam com o tempo alterado de cicatrização do tecido (KARGOZAR et al., 2019)

Tendo em vista os trabalhos reportados na literatura, as amostras desse trabalho apresentaram liberação iônica dentro da faixa da concentração biologicamente ativa capaz de estimular a diferenciação osteogênica de células do tecido ósseo.

Após as duas semanas de liberação iônica em SBF, as amostras foram analisadas por FTIR (Figura 20) e por DRX. Nos espectros do FTIR foram observadas as bandas típicas de vidros bioativos relacionadas com o estiramento assimétrico de Si-O ( $1000$  a  $1200\text{cm}^{-1}$ ) e estiramento simétrico de Si-O ( $725$  a  $810\text{cm}^{-1}$ ). Após o período de 14 dias em SBF há o surgimento, em todas as amostras, de uma banda dupla entre  $600$  e  $500\text{cm}^{-1}$ , relacionadas com a deformação angular P-O em grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ . Essas bandas são normalmente indicadoras da nucleação de fosfato de na superfície dos materiais (HU et al., 2017; MAÇON et al., 2017)



**Figura 20** Espectro de FTIR das amostras de vidro antes (0d) e após (14d) imersão em SBF.

Através dos resultados de DRX (Figura 21) foi possível identificar os picos de hidroxiapatita carbonatada nas amostras VB e VBSr5 que estão de acordo com o padrão utilizado (ICSD 00-019-0272), confirmando que houve a precipitação da HAC na superfície dessas amostras após duas semanas de imersão em SBF.

A amostra VBSr10 apresenta um difratograma muito similar aos de VB e VBSr5, indicando a precipitação da HAC, porém é possível observar dois picos presentes na faixa de  $\sim 25 - 25,8^\circ$ . Com o auxílio dos padrões de apatita de estrôncio (JCPDS 33-1348), de carbonato de estrôncio (JCPDS 84-1778) e o de hidroxiapatita utilizado anteriormente, pode-se sugerir que há a formação de cristais de  $\text{SrCO}_3$  e uma mistura

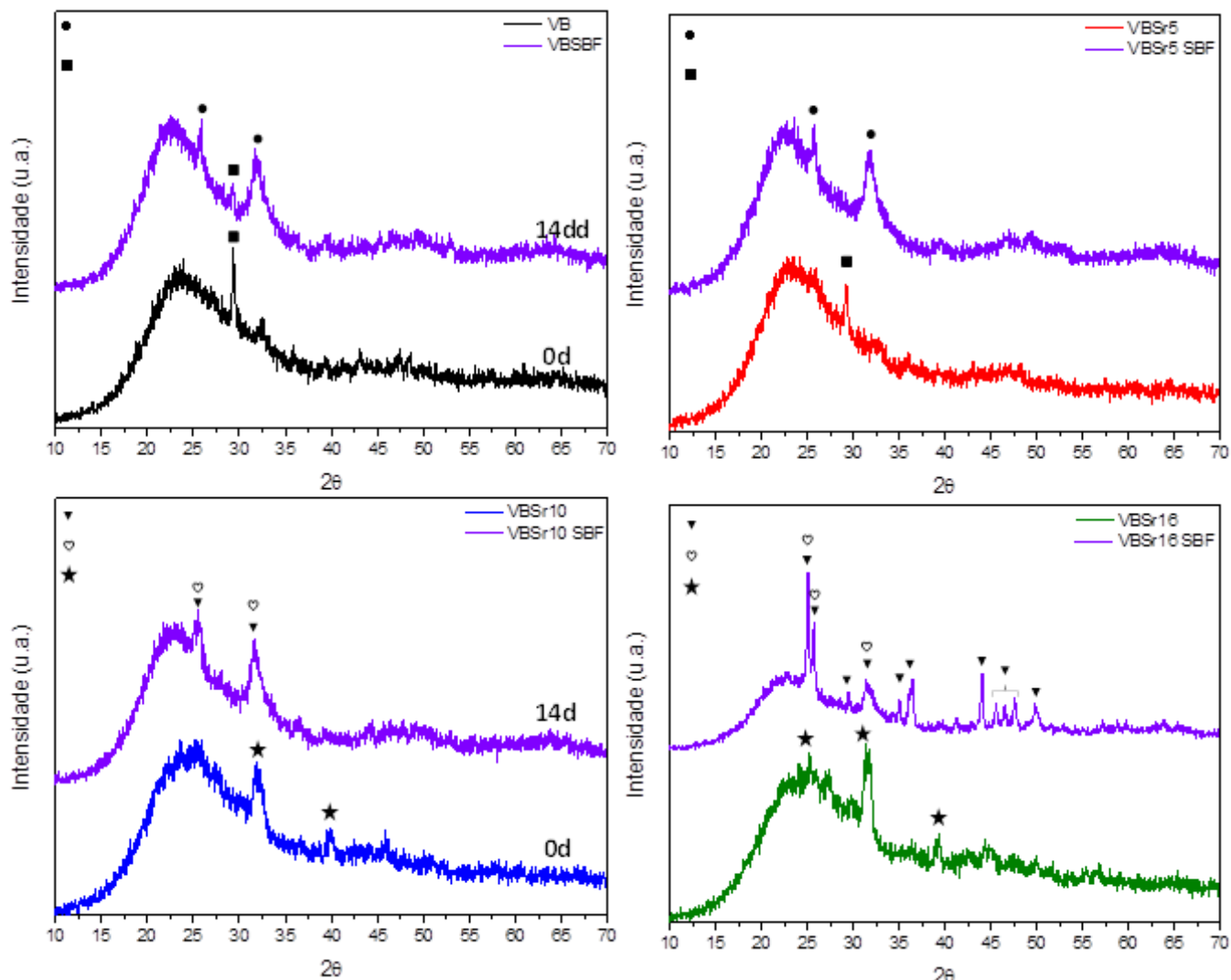
de apatita de estrôncio e hidroxiapatita. Observações similares foram realizadas nos estudos de HESARAKI et al., 2010b e MAÇON et al., 2017.

Na amostra VBSr16 também foram observados os picos de apatitas e um aumento nos picos de carbonatos. É possível observar também que ocorreu uma diminuição dos picos referentes ao  $\text{Sr}_2\text{SiO}_4$ . Nos estudos de MAÇON et al., 2017, onde o comportamento de dissolução de uma série de vidros bioativos contendo estrôncio foi estudado, a bioatividade dos vidros bioativos foi avaliada em TBS e SBF e os resultados sugeriram que os cristais de  $\text{Sr}_2\text{SiO}_4$  são altamente solúveis, permitindo a liberação de estrôncio independente da solução utilizada. Apesar dessa estrutura ter sido observada, não houve o impedimento da liberação dos íons estrôncio, conforme foi apresentado no estudo de liberação iônica.

Em relação à formação de carbonatos de estrôncio na superfície das amostras, foram avaliados nos estudo de KIM; NAM, 2000, vidros com a incorporação de diferentes íons (Mg, Ca, Sr, Ba), com a finalidade de avaliar a capacidade desses materiais de retirar íons  $\text{CO}_3^{2-}$  de uma solução. Foi observado que os vidros contendo SrO e BaO foram os que melhor apresentaram a precipitação de cristais de carbonato na superfície dos materiais. No caso dos vidros com SrO a precipitação ocorre através do carbonato de estrôncio. Sendo assim a solubilização dos cristais  $\text{Sr}_2\text{SiO}_4$ , seguida da precipitação de cristais  $\text{SrCO}_3$  seria uma possível hipótese para os padrões observados para VBSr16 após duas semanas.

O estudo de dissolução e bioatividade confirmou que a incorporação de Sr na rede de vidros bioativos leva a uma redução nas taxas de formação da camada de HAC, embora ainda mantendo a bioatividade do material. Sabe-se que a formação de apatita é dependente da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do vidro e ocorre a substituição desses íons pelos íons Sr, uma menor quantidade de íons Ca são liberados. Esse menor teor de cálcio liberado pode ter sido responsável pela diminuição da bioatividade observada (HU et al., 2017)

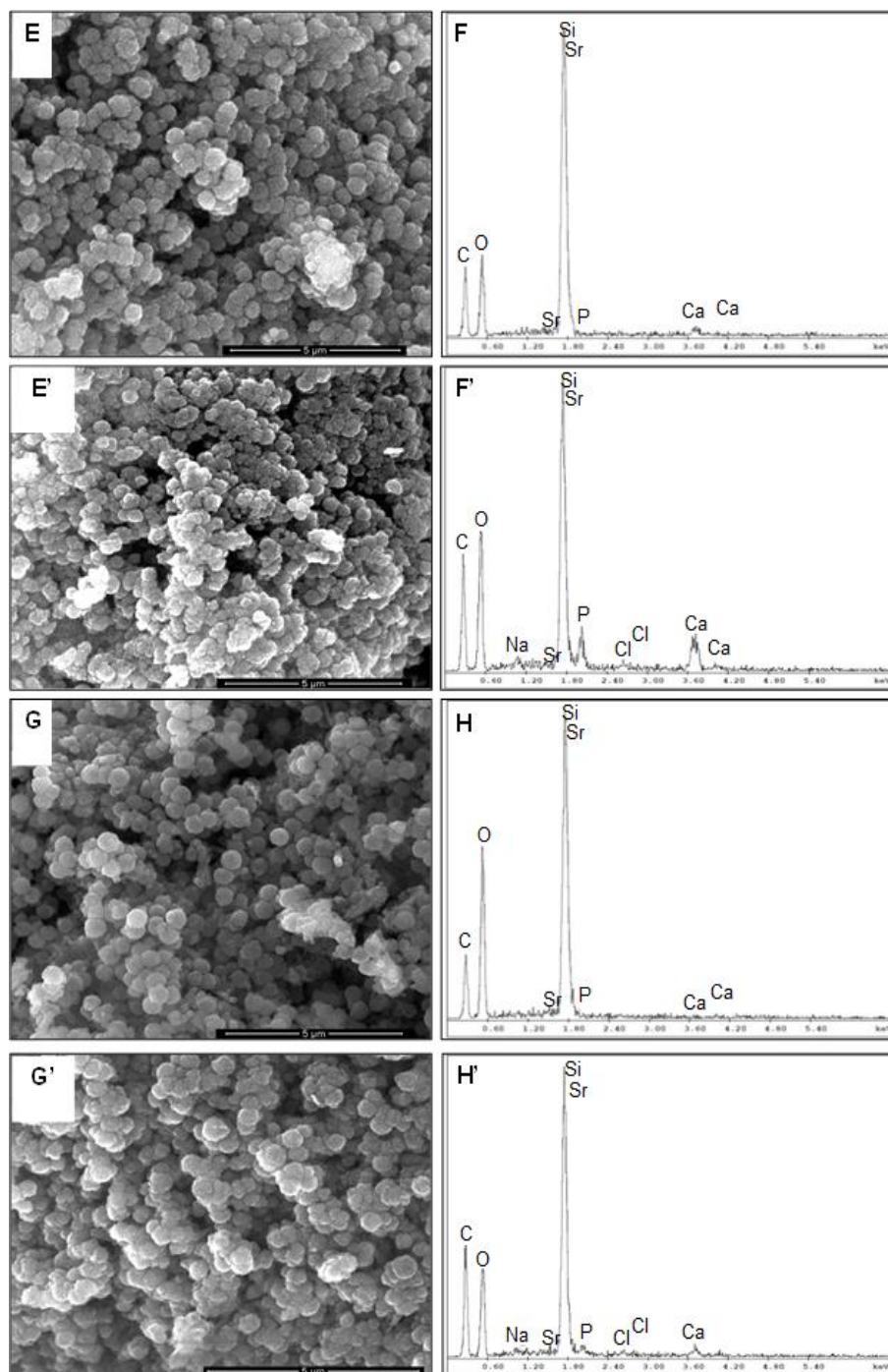




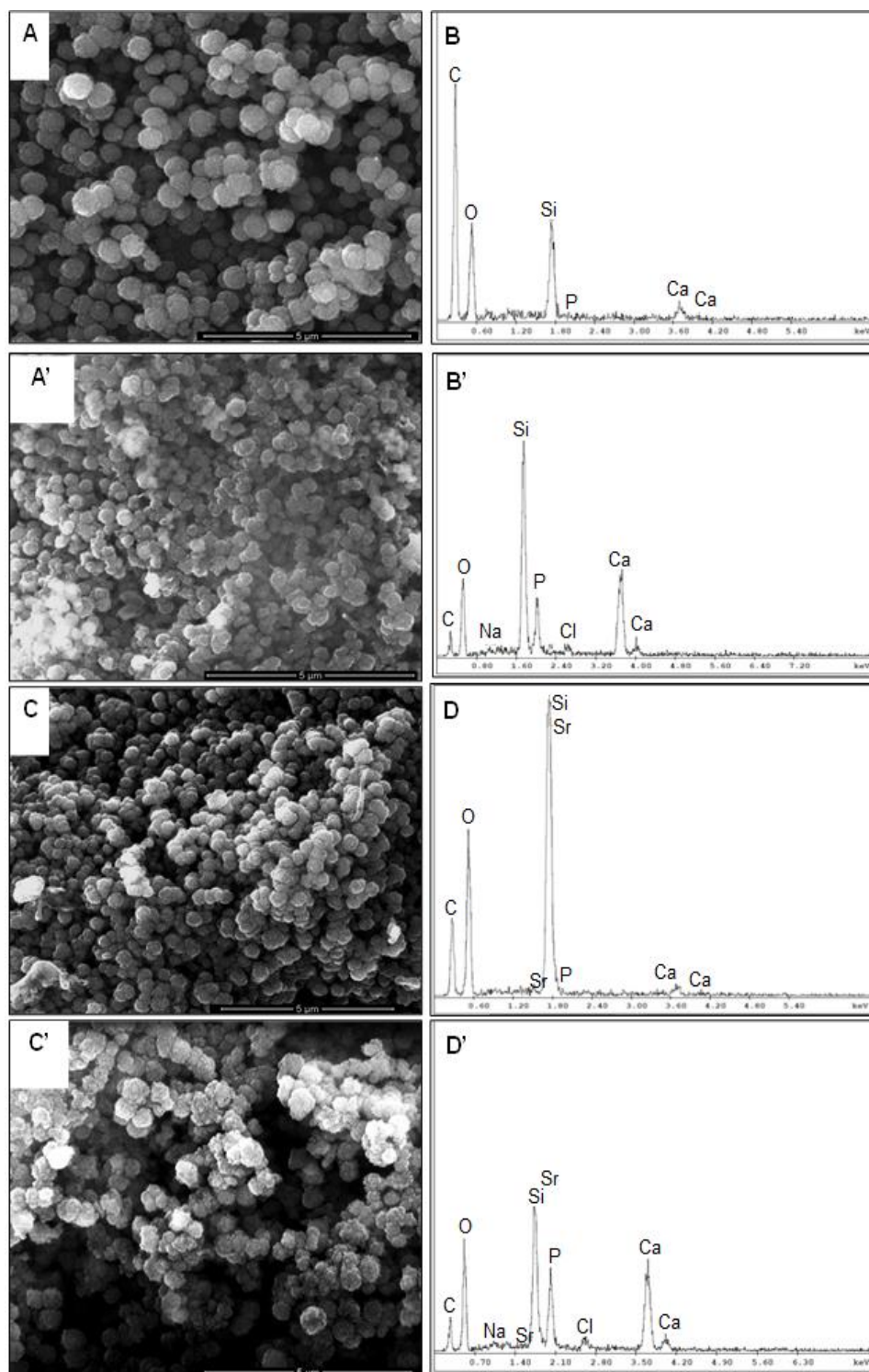
**Figura 21** Padrões de DRX de vidros bioativos imersos por duas semanas em SBF. Legenda: ● hidroxiapatita; ■ calcita; ▼ SrCO<sub>3</sub>; ♡ Apatita de SrO; ★ Sr<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>

Além disso, foram relatados em alguns trabalhos que a presença de alguns íons como o Mg<sup>2+</sup> na composição do vidro bioativo inibe ou retarda a precipitação da camada de fosfato de cálcio. Isso sugere que o processo de troca catiônica entre os íons Ca<sup>2+</sup> da superfície do vidro e o H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> da solução, que leva a formação de ligações Si-OH na superfície do vidro, foi retardado pela presença de Sr resultando em precipitação atrasada do fosfato de cálcio, especialmente para amostras com maiores concentrações de SrO (HESARAKI et al., 2010b), o que seria uma possível razão para essa menor bioatividade observadas nas amostras com maior teor de estrôncio.

Nas Figura 23 e Figura 22 são mostradas as imagens de MEV e os espectros obtidos através das análises por EDS das partículas antes e após 14 dias de imersão em SBF. Observa-se que ocorreram alterações nas superfícies das partículas após os 14 dias, apresentando um aspecto mais rugoso, podendo ser um indicador da formação da camada de hidroxiapatita (HU et al., 2017).



**Figura 22** Imagens de MEV e resultados de EDS. E,F: VBSr10 pré ensaio SBF E',F': VBSr10 pós ensaio SBF; G,H: VBSr16 pré ensaio SBF G',H': VBSr16 pós ensaio SBF.



**Figura 23** Imagens de MEV e resultados de EDS. A,B: VB pré ensaio SBF; A',B': VB pós ensaio SBF, C,D: VBSr5 pré ensaio SBF; C',D': VBSr5 pós ensaio SBF

As imagens não foram suficientes para confirmar a natureza desses precipitados e os espectros de EDS foram utilizados para obter uma análise qualitativa da composição das superfícies das partículas. Antes da imersão em SBF, as amostras não possuíam picos referentes ao P, e após o período de 14 dias em SBF passaram a apresentar, além dos picos referentes à presença de P, um aumento nos picos de Ca, sendo mais uma indicação da formação da camada de hidroxiapatita na superfície das partículas. No estudo de FIORILLI et al., 2018, foram produzidas partículas similares com adição de estrôncio que também apresentaram esse aspecto rugoso após o ensaio de bioatividade em SBF, e que foram identificados como cristais nanométricos de hidroxiapatita. Nas partículas de VBSr16, a alteração da superfície das partículas pode estar também relacionada a precipitação de cristais  $\text{SrCO}_3$  (KIM; NAM, 2000).

## **5.2 Ensaios biológicos**

Após as caracterizações físico-químicas, morfológicas e texturais e a avaliação da bioatividade e dissolução iônica em SBF, as partículas foram avaliadas em relação a sua citotoxicidade e viabilidade celular em células tronco de medula óssea de ratas adultas e o efeito de seus extratos no potencial de diferenciação reduzido de células tronco de medula óssea de ratas com osteoporose.

### **5.2.1 Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais da medula óssea**

As características fenotípicas das células extraídas da medula óssea de ratas adultas com e sem osteoporose apresentaram valores similares e que são compatíveis com as de células-tronco. Houve expressão de CD45 em, no máximo, 1,09% das células e expressão para CD54, CD73 e CD90 acima de 83,92%, 82,27% e 95,56% das células, respectivamente (Tabela 8).

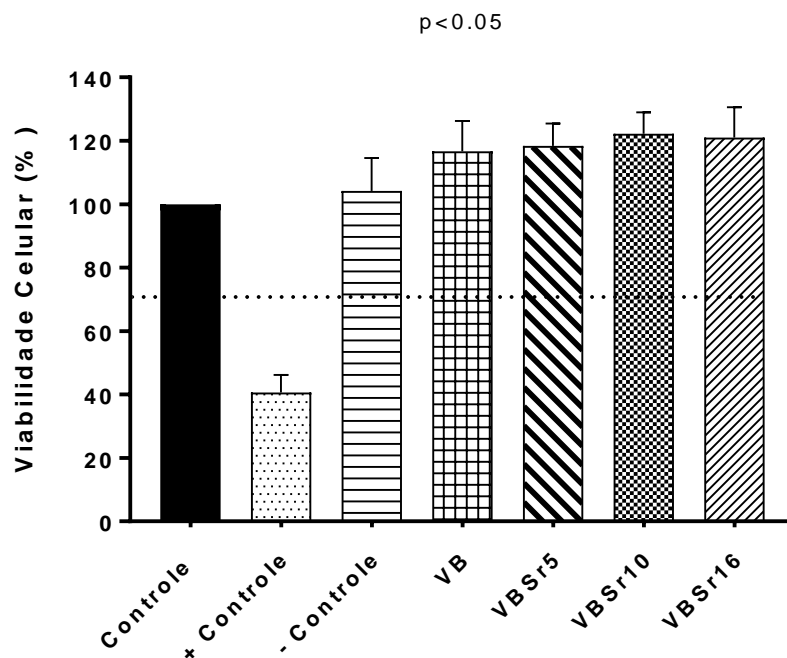
**Tabela 8** Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas adultas com e sem osteoporose.

<b>Grupo</b>	<b>CD45(%)</b>	<b>CD54(%)</b>	<b>CD73(%)</b>	<b>CD90(%)</b>
<b>CTM-MO de ratas sem osteoporose</b>	1,09	96,94	83,92	95,93
<b>CTM-MO de ratas com osteoporose</b>	1,01	97,96	92,10	96,01

Sabe-se que além das células tronco, a medula óssea contém outros tipos celulares como as células hematopoiéticas e os fibroblastos (ISHII et al., 2005; LI; HU; ZHONG, 2019). O Comitê Internacional de Células Tronco e Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs que as CTM devem expressar CD73 e CD90 e não devem expressar CD45 (DOMINICI et al., 2006). Células hematopoiéticas expressam CD45, que também pode ser expresso por fibroblastos (ISHII et al., 2005). CD54 não é exclusivo das células tronco mesenquimais, sendo expresso em pequenas concentrações em leucócitos e células endoteliais (DOMINICI et al., 2006). Além disso, leucócitos e outras células hematopoiéticas não aderem ao plástico como as CTM e na medula óssea somente as CTM possuem a capacidade de diferenciação osteogênica (BOELONI et al., 2015b; LI; HU; ZHONG, 2019).

### 5.2.2 Avaliação da citotoxicidade e viabilidade celular

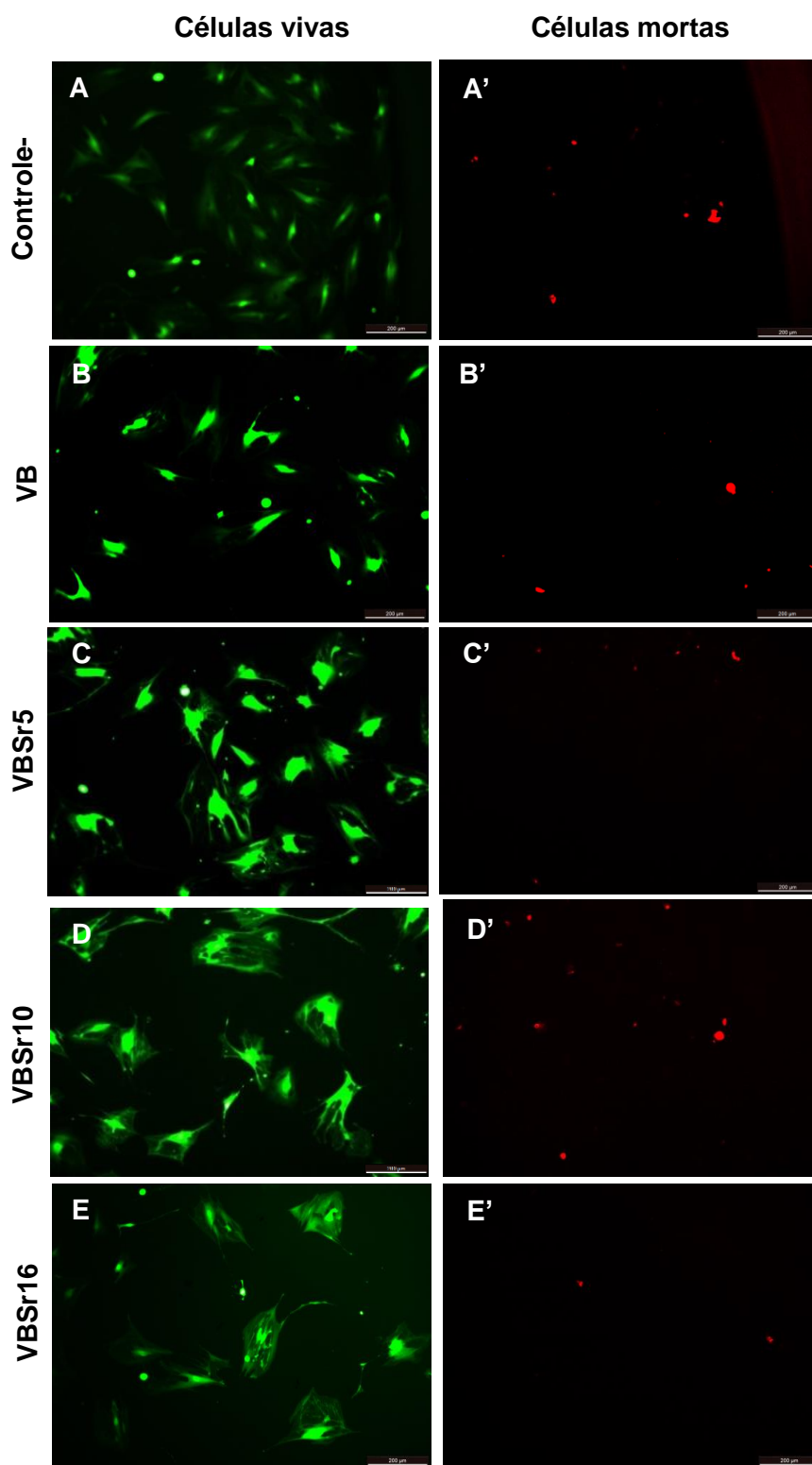
Conforme apresentado na Figura 24, a avaliação da citotoxicidade por MTT indicou que as CTM-MO de ratas adultas não osteoporóticas expostas aos extratos das partículas por 72 horas não alteraram significativamente sua atividade metabólica mitocondrial. Esses grupos experimentais apresentaram níveis de função celular acima de 70% (linha pontilhada na Figura 24), que de acordo com a ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (INTERNATIONAL STANDARD, 2009), é o valor mínimo para considerar um material não citotóxico.



**Figura 24** Gráfico de viabilidade celular obtida pelo ensaio de MTT. Controle: células somente com meio de cultura; +Controle: células tratadas com Triton, -Controle: células tratadas com material não citotóxico.

A Figura 25 apresenta imagens das CTM-MO expostas aos extratos das partículas, nos quais as células viáveis estão representadas pela fluorescência verde (primeira coluna) e as células mortas representadas pela fluorescência vermelha (segunda coluna). Células vivas (verdes) tratadas com os extratos apresentaram morfologia celular similar às células do controle não foram identificados danos membrana celular. Na avaliação da citotoxicidade pelo ensaio de LIVE/DEAD®, onde as CTM-MO foram expostas aos extratos das partículas por 72 horas, todas os grupos apresentaram resultados semelhantes ao do controle. Sendo assim, é possível dizer que os extratos não causaram efeitos tóxicos nas células após exposição, e não houve diferenças estatísticas quando comparado com o grupo controle negativo (-).





**Figura 25** Imagens de CTM-MO expostas ao extrato de partículas de vidro bioativo com e sem adição de Sr. Apresentando a fluorescência verde (células viáveis – primeira coluna) e fluorescência vermelha (células mortas – segunda coluna. Controle negativo (A e A'), VB (B e B'), VBSr5 (C e C'), VBSr10 (D e D') e VBSr16 (E e E'). A barra representa escala de 200  $\mu\text{m}$ .

Não foram observados efeitos citotóxicos para os vidros bioativos contendo diferentes concentrações de Sr, conforme resultados obtidos por MTT e LIVE/DEAD. É importante enfatizar que outro aspecto não definido em estudos de vidro com Sr é a quantidade ótima da substituição de SrO por CaO na composição que tenha um efeito positivo na diferenciação celular (MOGHANIAN; FIROOZI; TAHRIRI, 2017).

Sendo assim, apesar do ambiente favorável para as células gerado pelo extrato das partículas, um estudo detalhado da diferenciação osteogênica deve ser realizado para confirmar os aspectos relevantes do potencial terapêutico dos vidros bioativos com capacidade de liberação de Sr em meio biológico.

### **5.3 Ensaios de diferenciação**

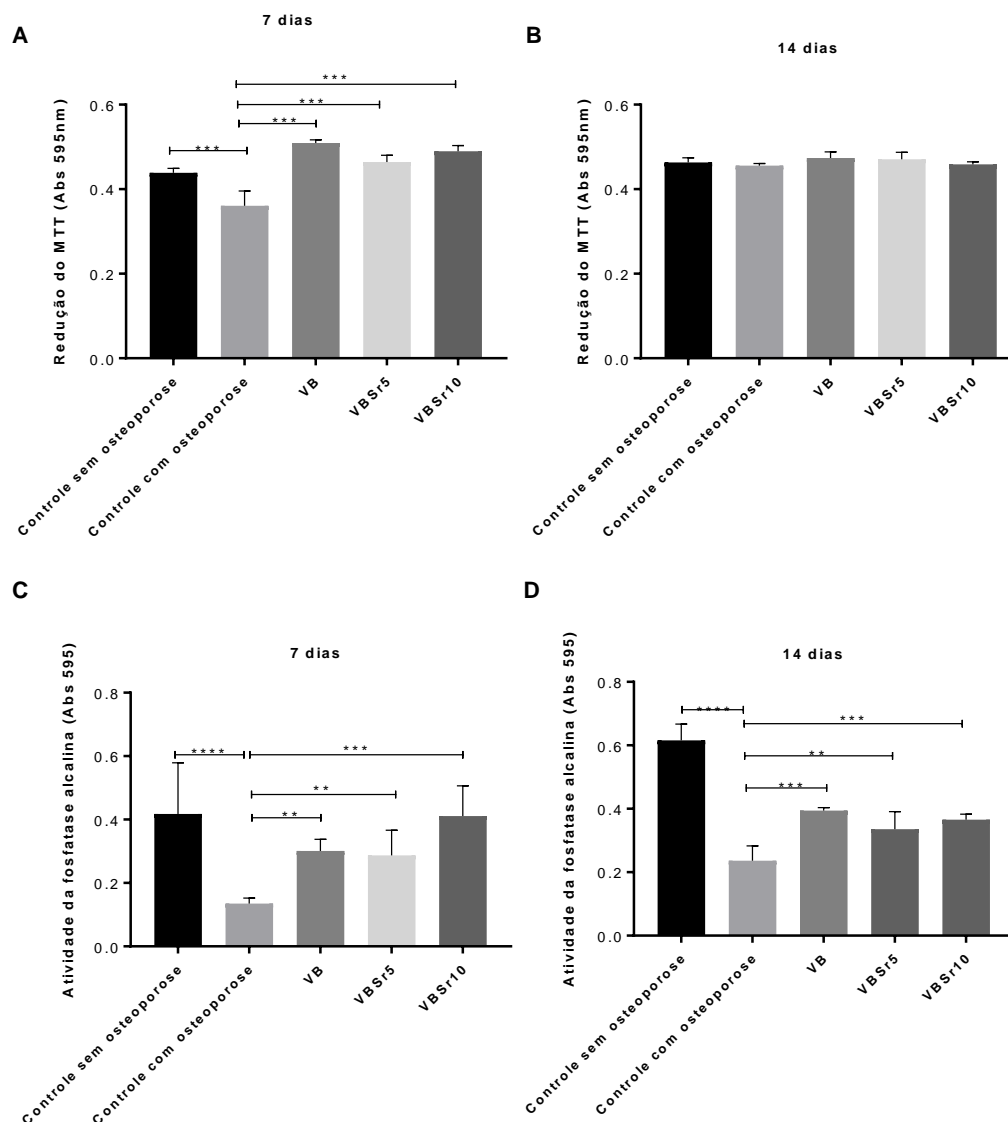
Foram realizados ensaios para uma avaliação inicial do efeito dos extratos das partículas submicrométricas contendo estrôncio em células tronco mesenquimais de medula óssea de ratas com osteoporose. Foram realizados os ensaios de MTT, atividade da fosfatase alcalina e ensaio de mineralização durante 7, 14 e 21 dias. Devido a uma contaminação que ocorreu nos grupos do período de 21 dias, não foi possível obter os resultados referentes a esse período. Inicialmente haverá uma descrição dos resultados de cada ensaio seguida da discussão dos mesmos.

A conversão de MTT em cristais formazan, que está diretamente relacionada à atividade metabólica celular, variou entre os grupos somente no período de 7 dias. Aos 14 dias é possível perceber que todos os grupos não diferiram significativamente em relação à conversão. Aos 7 dias, em relação aos controles as células de ratas adultas sem osteoporose apresentaram uma maior conversão quando comparadas com as células de ratas com osteoporose. Entre as células de ratas com osteoporose, todos os grupos tratados com os extratos das partículas apresentaram aumento da conversão de MTT em cristais de formazan (Figura 26, A/B).

Em relação a atividade da fosfatase alcalina (Figura 26,C/D), que é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (PAYUSHINA; DOMARATSKAYA; STAROSTIN, 2006; REIS et al., 2016), o grupo controle de células de ratas adultas sem osteoporose apresentou maior atividade comparado com o controle de células de ratas com osteoporose e as células de ratas adultas com osteoporose tratadas com os extratos

das partículas, nos períodos avaliados. Os resultados obtidos em células de ratas com osteoporose tratadas com os extratos das partículas apresentaram alterações, evidenciando-se o aumento da atividade da fosfatase alcalina, em todos os grupos e períodos avaliados em relação ao controle (CTM-MO de ratas com osteoporose).

Na avaliação da síntese de matriz mineralizada (Figura 27) após o período de 14 dias



**Figura 26 A/B:** Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. **C/D** Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (C) e 14 (D) dias de cultivo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

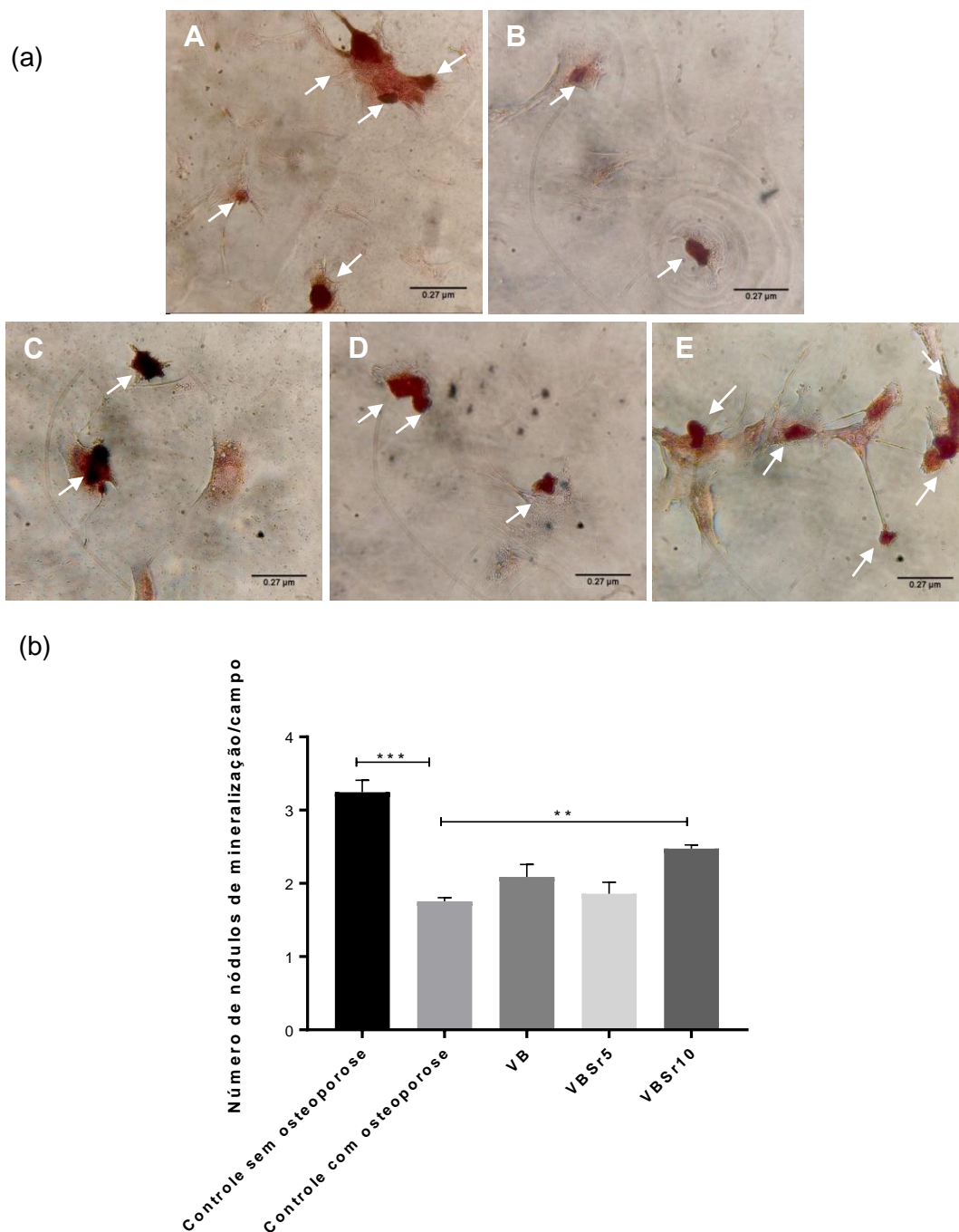
de cultura, o controle de células sem osteoporose apresentou o maior número de

nódulos mineralizados quando comparado ao controle das células adultas com osteoporose. Em relação aos grupos tratados com os extratos das células, somente o grupo VBSr10 apresentou aumento significativo do número de nódulos presentes quando comparados ao de células de ratas com osteoporose.

Como esperado, a castração das ratas alterou o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais da medula óssea (BOELONI et al., 2015b; OCARINO et al., 2008). Os resultados das células de ratas com osteoporose tratadas com os extratos das partículas, sugerem uma melhora do potencial osteogênico das CTM-MO, principalmente com o extrato da amostra VBSr10.

Existem algumas hipóteses para a melhora observada no potencial de diferenciação osteogênica de células de ratas com osteoporose tratadas com os extratos dos vidros bioativos contendo estrôncio. A principal delas é atribuída ao conjunto de íons liberados pelos materiais. Esses íons estão envolvidos no metabolismo ósseo e possuem funções importantes na angiogênese, reparo do tecido ósseo e mineralização (HOPPE; BOCCACCINI, 2015; JONES, 2013).

Alguns estudos relataram efeitos positivos na diferenciação osteogênica promovidos por vidros bioativos com a adição de estrôncio. BONNELYE et al., 2008 relatou que pequenas concentrações de Sr são capazes de promover a diferenciação osteoblástica e aumentar o número de nódulos de mineralização associados com um aumento da expressão de ALP, Sialoproteína óssea e osteocalcina. Os estudos de LIU et al., 2016 mostraram que vidros bioativos com 5% de Sr promoveram respostas osteogênicas significativas em células MC3T3-E1. Ele também chama atenção ao fato de que existe uma faixa ótima de concentração de estrôncio que promove essas respostas, porém essa performance biológica é dependente dos tipos celulares utilizados, as mudanças nas propriedades físico-química e no conteúdo de Sr nos materiais.



**Figura 27** (a) Nódulos mineralizados (setas) nas CTM-MO de ratas: (A) adultas sem osteoporose; (B) adultas com osteoporose sem tratamento; (C) com osteoporose tratadas com o extrato de VB; (D) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5; (E) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10. Número médio de nódulos de mineralização por campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr5 e VBSr10 em meio de diferenciação osteogênico em 14 dias de cultivo. \* $p < 0.05$

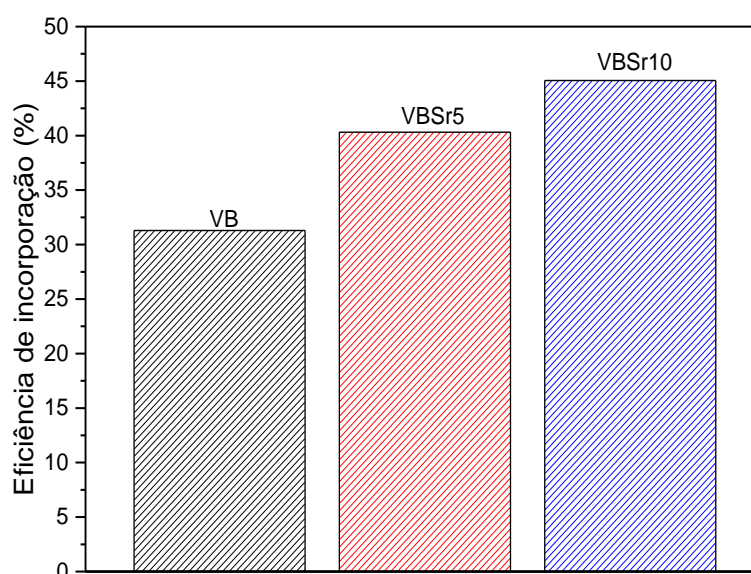
Nos materiais produzidos, a avaliação inicial realizada indicou que a combinação dos efeitos dos vidros bioativos com o estrôncio são capazes de melhorar o potencial de diferenciação reduzido de CTM de ratas com osteoporose. Apesar de existirem muitos trabalhos de vidros com a adição de estrôncio, ainda não foram encontrados estudos com o efeito de partículas esféricas e submicrométricas de VB contendo Sr no potencial osteogênico reduzido de CTM-MO de ratas com osteoporose.

#### 5.4 Avaliação da eficiência de incorporação e liberação de icariin

Foram apresentados a seguir os resultados referentes aos estudos de liberação e incorporação das partículas VB, VBSr5 e VBSr10.

##### 5.4.1 Avaliação da eficiência de incorporação das partículas

Os resultados da avaliação da eficiência de incorporação de icariin nas partículas de vidro bioativo estão apresentados na Figura 28. É possível notar que quanto maior a quantidade de estrôncio na composição, maior a eficiência de incorporação, sendo que VBSr10Ica apresentou valores de 45%, VBSr5Ica 40,3% e VBIca 31,3%.



**Figura 28** Eficiência da incorporação de Icarin pelas amostras VB, VBSr5 e VBSr10.

Sabe-se que existem quatro principais fatores que influenciam na incorporação: tamanho de poro, volume de poro, área superficial e a interação medicamento-vidro (IZQUIERDO-BARBA; VALLET-REGÍ, 2015; VALLET-REGI et al., 2007). O poro deve

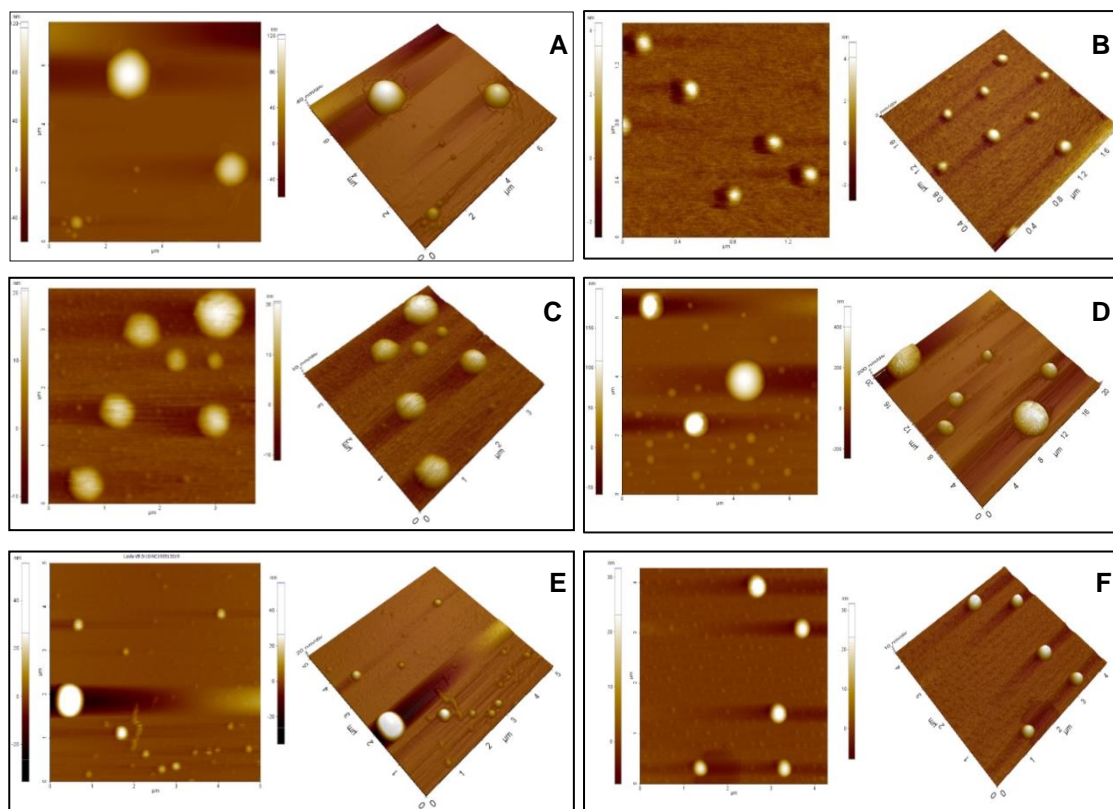
possuir um tamanho suficiente para a incorporação das moléculas de fármacos (TABIA et al., 2019). No presente estudo, o diâmetro médio de poros para as partículas VB, VBSr5 e VBSr10 foram de 8,78nm; 9,92nm e 12,65nm, respectivamente. Considerando que icariin possui um comprimento molecular de ~1,8 nm (medidas realizadas com auxílio das ferramentas ACD/3D Viewer e Jmol), os poros das amostras estão dentro de uma faixa de tamanho que permitiria a entrada de icariin, e os resultados de adsorção e incorporação de icariin indicaram que a habilidade de incorporação possui relação principalmente com o tamanho de poro dos materiais (XIA; CHANG, 2006).

Em relação às propriedades texturais, VB possui a maior área superficial ( $232\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ), maior volume de poro ( $0,510\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) e o menor tamanho médio de partículas (8,78nm) enquanto que VBSr10 possui a menor SSA ( $123\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ), menor volume de poro ( $0,389\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) e maior tamanho de poro (13nm). As propriedades de VBSr5 são intermediárias as de VB e VBSr10, SSA ( $162\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ ), volume de poro ( $0,404\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$ ) e tamanho médio de poro (12nm). Essas propriedades são importantes pois afetam diretamente a incorporação e a liberação de icariin, como será discutido posteriormente. No presente estudo, o tamanho de poro apresentou uma maior influência que a área superficial na eficiência de incorporação de icariin. Trabalhos com sílica mesoporosa sugeriram que poros menores, principalmente a entrada desses poros, poderiam ter impedido a difusão do fármaco na amostra. Outra observação realizada foi que amostras com tamanhos de poro menores levaram um maior tempo para alcançar maior incorporação do fármaco (HORCAJADA et al., 2004; QU et al., 2006; VALLET-REGÍ; BALAS; ARCOS, 2007). Portanto, podemos sugerir que VBSr10 apresentou maior  $E_i$  devido ao seu maior tamanho de poro, o que permitiu a incorporação de mais icariin durante o período utilizado para o mesmo. Provavelmente, se VB e VBSr5 permanecessem por um tempo maior em contato com a solução de icariin, a  $E_i$  dessas amostras poderia ter sido maior que a observada.

Além disso, o icariin possui em sua estrutura molecular grupos hidroxilas (-OH), que podem interagir com os grupos silanóis (Si-OH) do vidro por meio de ligações de hidrogênio. Enquanto isso, quanto maior a área superficial, mais grupos silanóis estarão presentes nas superfícies das partículas, o que faz com que mais grupos hidroxilas interajam com os materiais através de ligações de hidrogênio (WANG; WANG; ZHANG, 2017). Essa interação pode ser também um fator que afetaria a taxa de liberação de icariin das partículas, quanto maior a interação mais lenta a liberação.

### 5.4.2 Caracterização das partículas de vidro bioativos e estrôncio após a incorporação de Icariin

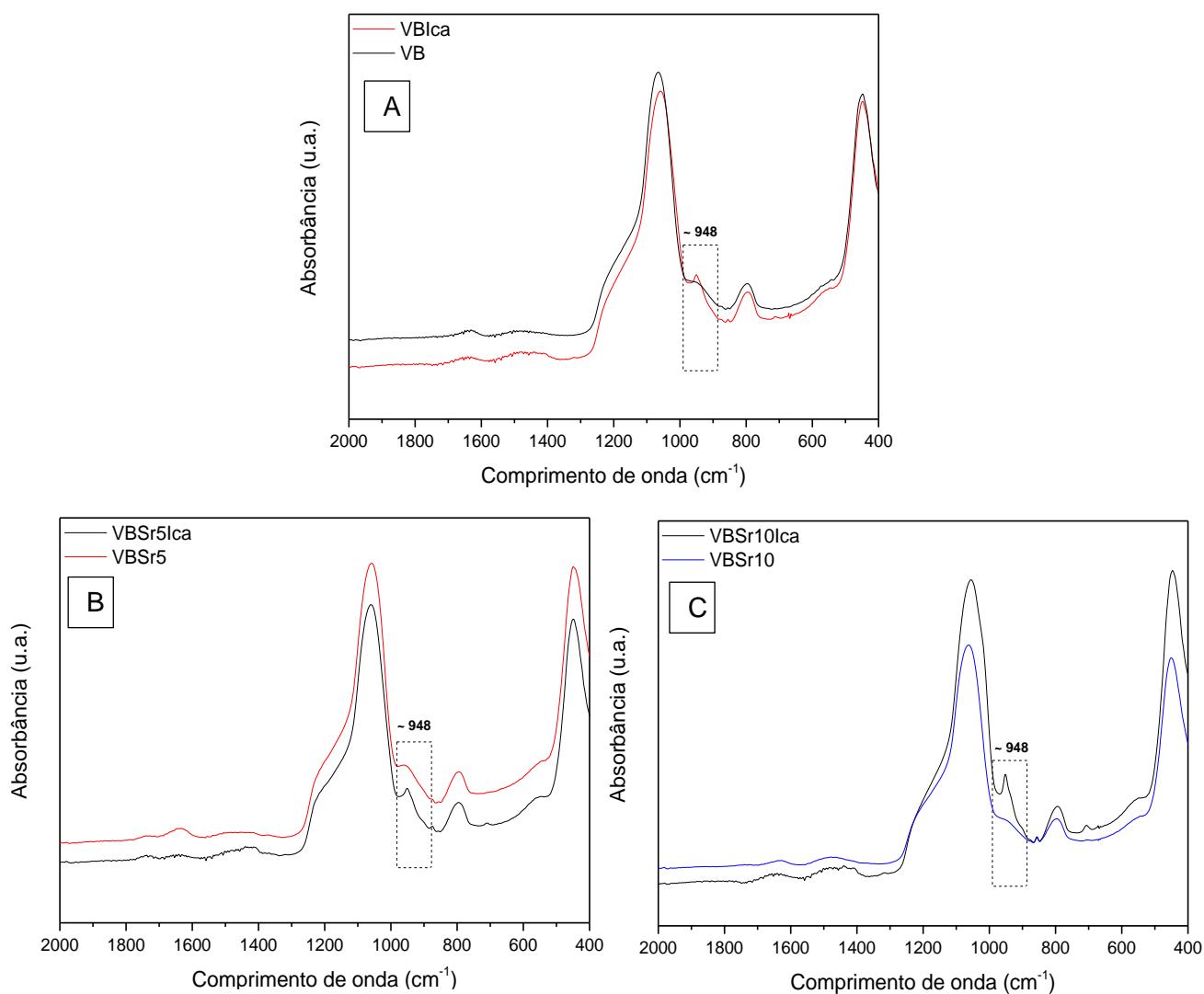
As imagens de MFA (Figura 29) mostram que não ocorreram mudanças na morfologia das partículas após a incorporação de icariin e como discutido anteriormente, a morfologia esférica é uma importante característica devido a apresentar melhores propriedades físico-químicas e até mesmo melhora a bioatividade quando comparadas a partículas irregulares. Por exemplo, quando partículas esféricas de vidro bioativos são aplicadas como preenchimentos ósseos, que são injetadas em defeitos, elas conseguem se organizar de uma maneira melhor, possibilitando um melhor empacotamento e preenchimento do defeito, quando comparado com partículas de morfologia irregular. (GUO; LÜ; KE, 2019; HU et al., 2014a; ZHU et al., 2012). Além do formato, o tamanho das partículas também é uma característica importante. Comparadas com esferas micrométricas as submicrométricas, devido ao menor tamanho de partículas e alta área superficial são materiais ideais para a injeção em defeitos ósseos (HU et al., 2014a; TSIGKOU et al., 2014).



**Figura 29** Imagens de microscopia de força atômica das partículas antes e após incorporação com Icariin. A: VB; B: VBIca; C: VBSr5, D: VBSr5Ica; E: VBSr10; F:



Os espectros de FTIR das amostras antes e após a incorporação de icariin são apresentados na Figura 30. É possível observar que a banda característica do vidro bioativo, localizada à  $965\text{cm}^{-1}$ , relacionada a ligações Si-O (BARRIONI et al., 2017), apresentou uma pequena alteração após o processo de incorporação de Ica. As amostras de VB após a incorporação apresentaram um estreitamento e um deslocamento para  $\sim 948\text{cm}^{-1}$  e pode ser correlacionada ao dobramento fora do plano de ligações C-H (PEI et al., 2008; RODIG, 1963; S et al., 2017). Essa alteração poderia ser um indicador de interações entre Ica e as amostras, já que a banda está relacionada ao espectro de FTIR de Ica (PEI et al., 2008). Poderia indicar também a interação de icariin com os grupos silanol presentes nas partículas através de ligações de hidrogênio (TABIA et al., 2019; WANG et al., 2016c; WANG; WANG; ZHANG, 2017; XU et al., 2018).

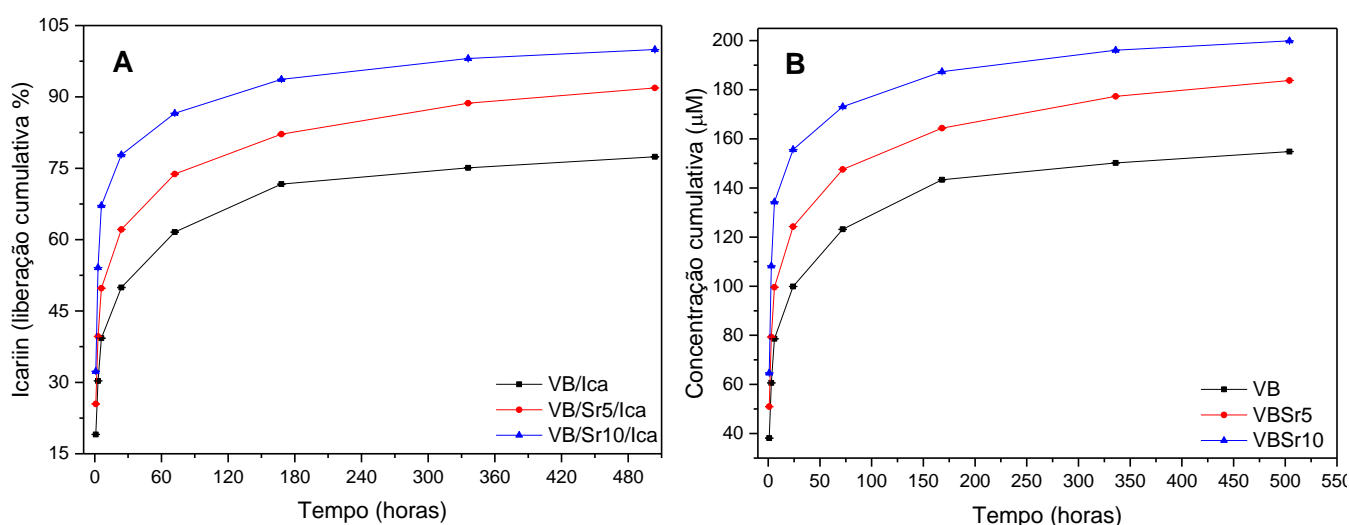


**Figura 30** Caracterização das partículas após a incorporação com icariin. Espectros de FTIR, A: VB/VB Ica; B: VBSr5/VBSr5 Ica; C: VBSr10/VBSr10 Ica.

### 5.4.3 Avaliação da liberação cumulativa de icariin

A Figura 31 mostra a concentração liberada ( $\mu\text{M}$ ) e a liberação cumulativa de icariin das partículas VB, VBSr5Ica e VBSr10Ica em função do tempo. Observou-se que o perfil de liberação apresentou dois estágios: uma liberação inicial rápida seguida por um segundo estágio de uma liberação mais lenta. A transição para o segundo estágio ocorreu após as 24 horas e continuou até o final do período de liberação (21 dias).

De acordo com WANG, 2008 e ZHAO et al., 2008, a rápida liberação inicial é causada principalmente pela dissolução do fármaco que está fisicamente adsorvido na superfícies de vidros mesoporosos, enquanto que o segundo momento pode ser atribuído a adsorção química. A rápida liberação inicial de icariin para as amostras VB/ica, VBSr5Ica e VBSr10Ica foi de 49,94% (99,9 $\mu\text{M}$ ), 62,13% (124,3 $\mu\text{M}$ ) e 77,8% (155,6 $\mu\text{M}$ ), respectivamente. A liberação lenta de icariin continuou durante o período de estudo (21 dias) e o percentual final da liberação cumulativa foi de 77,4% (154,3 $\mu\text{M}$ ) para VB/ica; 91,89% (183,8 $\mu\text{M}$ ) para VBSr5Ica e 99,95% (199,9 $\mu\text{M}$ ) para VBSr10Ica. Foi possível observar que quanto maior a quantidade de Sr, mais rápida é a liberação do fármaco, e possivelmente isso ocorreu devido à expansão que Sr causa na rede dos vidros, alterando diretamente suas propriedades texturais sendo o tamanho de poros e a área superficial as características que mais podem influenciara na taxa de liberação de icariin das amostras



**Figura 31** Perfis de liberação de A: liberação cumulativa (%) em função do tempo e B: concentração liberada de icariin ( $\mu\text{M}$ ) de icariin em função do tempo a partir das partículas VB/ica, VBSr5Ica e VBSr10Ica, no período de 21 dias (504 horas).

Os estudos de HORCAJADA et al., 2004, mostraram a influência do tamanho de poro na liberação de fármacos de sílicas mesoporosas e os resultados indicaram que poros maiores, podem reduzir a resistência causada pela difusão estérica, sendo assim, o fármaco presente em um poro maior tem maior liberdade do que o presente em um poro menor. Ainda nos estudos de HORCAJADA et al., 2004, foi revelado que a taxa de liberação do fármaco aumenta com o aumento do tamanho de poro. Essas observações podem sugerir que as altas taxas de liberação das amostras como VBSr10lca, ocorreram, possivelmente, devido aos tamanhos maiores de poros. Além disso, de acordo com WANG; WANG; ZHANG, 2017b, onde foi avaliada a liberação de doxorubicina por nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo, foi observado que quanto maior a área de superfície, maior o número de grupos silanol reunidos na superfície dos vidros bioativos, o que faz com que uma maior quantidade de grupos hidroxila da superfície do vidro reajam com o fármaco através de ligações de hidrogênio podendo afetar sua taxa de liberação.

Em estudos realizados com a liberação de icariin de *scaffolds* de vidro bioativo recobertos com gelatina, o perfil com a liberação rápida inicial foi observado, seguido da continuidade da liberação, porém, com diminuição das taxas ao longo do tempo, o que indica uma mudança nos mecanismos de liberação. Neste trabalho sugere-se que existe a necessidade da investigação do efeito da formação da camada de hidroxiapatita na cinética de liberação de icariin que pode ser outra razão para a mudança na cinética de liberação (REITER et al., 2019).

Pode-se dizer que o estudo realizado demonstrou que as esferas submicrométricas de vidro bioativo com adição de Sr poderiam ser utilizadas para a liberação prolongada de icariin, podendo haver variação dos componentes Sr e icariin conforme a aplicação utilizada.

#### **5.4.3.1 Avaliação do mecanismo de liberação de icariin pelas partículas através do modelo de Higuchi**

Para uma avaliação mecanismo de liberação de icariin pelas partículas, os dados da liberação foram ajustados no modelo matemático de Higuchi (BAISHYA, 2017; HIGUCHI, 1961; R, 2014). Esse modelo descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como sendo um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando

dependente da raiz quadrada do tempo (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Foi realizada uma análise dos dados de dissolução através de uma regressão linear com o auxílio do programa OriginPro 9.1 e uma linha reta foi plotada através dos dados. A inclinação dessa linha nos informa a constante da taxa de liberação. Além disso, o coeficiente de correlação ( $R_c$ ), que é uma medida estatística de quão bem a linha da regressão se aproxima dos dados reais da dissolução, foi determinado (DOADRIO et al., 2004; EL-KADY; FARAG, 2015; R, 2014).

Os perfis de liberação foram ajustados ao modelo de Higuchi e os valores dos coeficientes de correlação e as constantes das taxas de liberação foram apresentadas na Tabela 9 abaixo.

**Tabela 9** Coeficientes de correlação e constantes das taxas de liberação das amostras VB1ca, VBSr5lca e VBSr10lca, obtidas através do modelo matemático de Higuchi.

Higuchi	Estágios de liberação					
	1-6h		24-72h		168-504h	
VB1ca	$R_c$	k	$R_c$	k	$R_c$	k
	0,99	$13,7h^{-1/2}$	0,99	$1,2 h^{-1/2}$	0,98	$0,4 h^{-1/2}$

	1-6h		24-504h	
	$R_c$	k	$R_c$	k
VBSr5lca	0,99	$16,6 h^{-1/2}$	0,94	$1,6 h^{-1/2}$
VBSr10lca	0,98	$23,9 h^{-1/2}$	0,92	$1,2 h^{-1/2}$

Foi possível observar ao realizar a aplicação do modelo aos perfis de liberação, que a amostra VB1ca apresentou três estágios, enquanto VBSr5lca e VBSr10lca dois estágios. Todas as amostras apresentaram coeficientes relativamente altos e esse resultado sugere que a liberação de icariin pelas partículas ocorreu através de um processo de difusão. Em relação às taxas, todas as amostras apresentaram em seus primeiros estágios taxas de liberação maiores. É possível correlacionar esses valores com as rápidas liberações observadas nesse primeiro momento e que estão relacionadas às moléculas presentes na superfície das partículas. As taxas dos momentos seguintes apresentaram uma considerável redução, sugerindo que isso pode ter ocorrido devido a lenta difusão das moléculas de icariin presentes dentro da estrutura porosa das partículas e pode ser um indicador da interação entre as moléculas do fármaco e as

partículas (DOADRIO et al., 2004; EL-KADY; FARAG, 2015; EL-KADY; FARAG; EL-RASHEDI, 2016; TABIA et al., 2019).

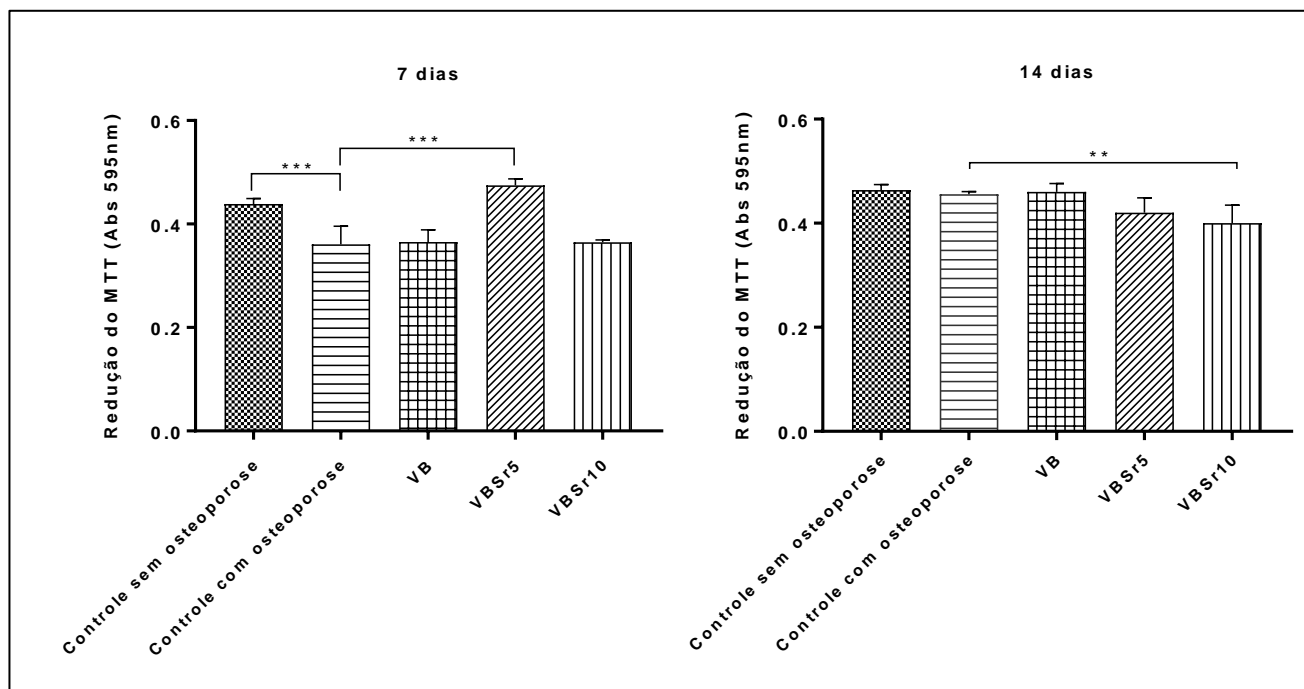
Observou-se que quanto maior o conteúdo de estrôncio nas partículas, maior foi a liberação inicial e final das amostras e os valores obtidos pelo modelo de corroboram com os resultados observados, onde a amostras VBSr10Ica com maior quantidade de estrôncio foram as que liberaram mais rapidamente uma quantidade maior de icariin. Com as observações realizadas pode-se dizer que as concentrações de estrôncio na composição das partículas e as concentrações de icariin incorporadas podem ser ajustadas a fim de obter taxas de liberação conforme a utilização desejada.

#### **5.4.4 Ensaios de diferenciação osteogênica – partículas com estrôncio e icariin**

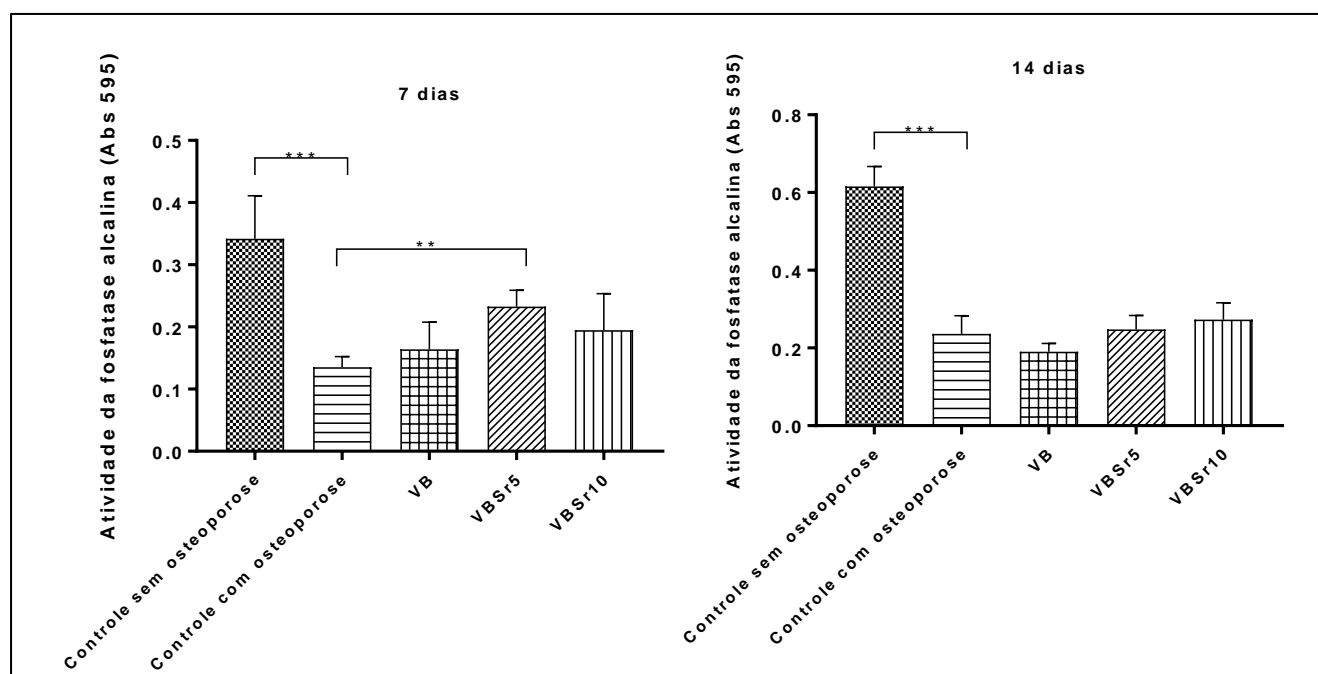
Foram realizados ensaios para uma avaliação inicial do efeito dos extratos das partículas submicrométricas contendo estrôncio e icariin no potencial de diferenciação osteogênica reduzido de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratas com osteoporose. Foram realizados os ensaios de MTT, atividade da fosfatase alcalina e ensaio de mineralização durante 7, 14 e os resultados estão descritos a seguir.

A conversão de MTT em cristais de formazan apresentou diferenças significativas, comparando as células tratadas com os extratos e o controle com células de ratas com osteoporose nos períodos de 7 e 14 dias. Aos 7 dias, o grupo VBSr5Ica apresentou maior conversão do MTT quando comparada ao controle com CTM-MO de ratas com osteoporose. Aos 14 dias, o grupo VBSr10Ica apresentou diminuição da conversão do MTT enquanto todos os outros grupos não apresentaram diferenças significativas (Figura 33).

Em relação a atividade da fosfatase alcalina, o grupo controle de células de ratas adultas apresentou maior atividade comparado com o controle de células de ratas com osteoporose e as células de ratas adultas com osteoporose tratados com os extratos das partículas, nos dois períodos avaliados. Aos 7 dias, o grupo VBSr5 apresentou atividade da fosfatase alcalina maior que o controle de CTM-MO de ratas com osteoporose, no período de 14 dias essas diferenças passaram a ser não significativas (Figura 32).

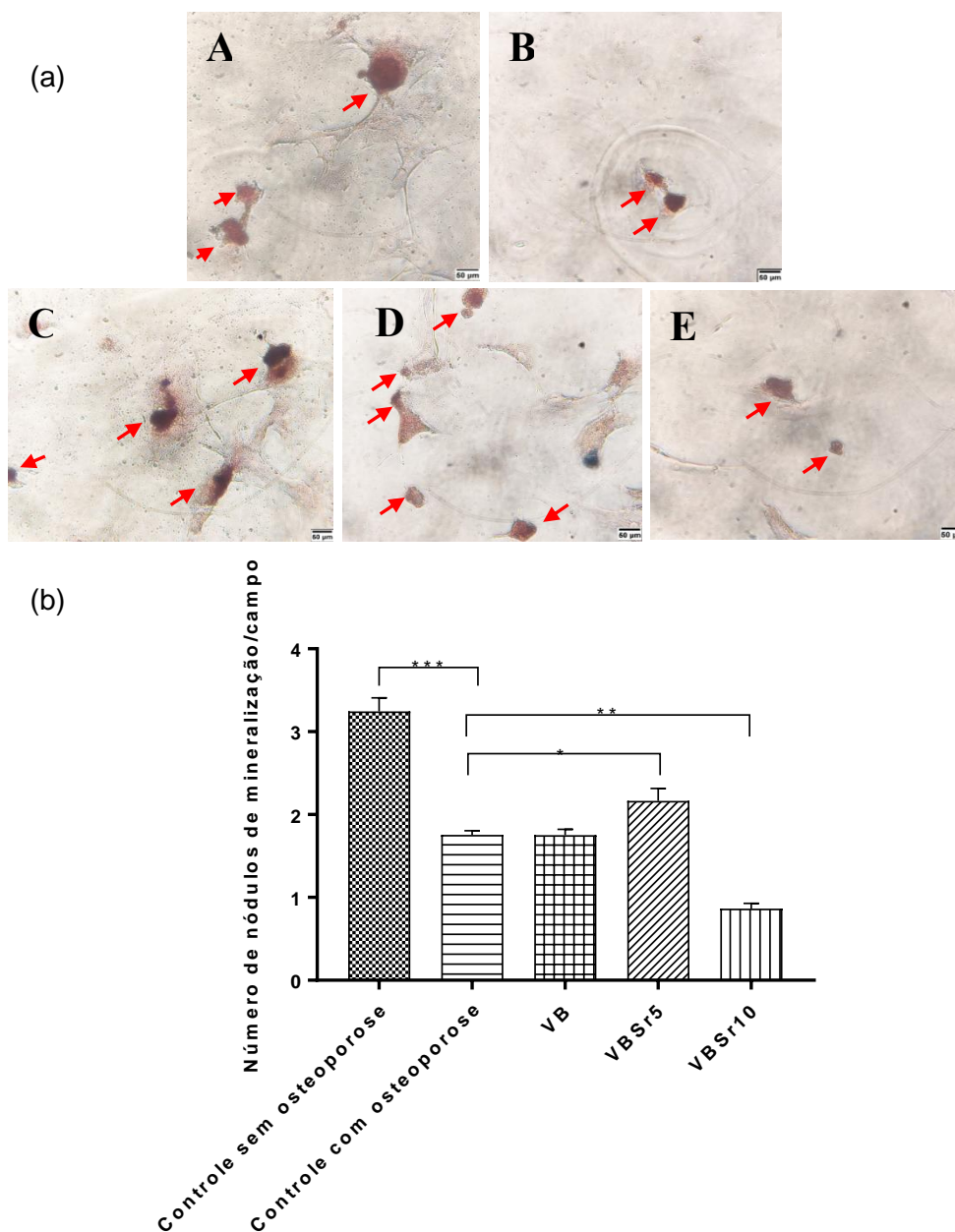


**Figura 33** Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB1ca, VBSr5Ica e VBSr10Ica em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$



**Figura 32** Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB1ca, VBSr5Ica e VBSr10Ica em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A) e 14 (B) dias de cultivo. \* $p < 0.05$ .

Na avaliação da mineralização (Figura 34), após o período de 14 dias de cultura, o controle de células adultas apresentou os maiores números de nódulos mineralizados quando comparado ao controle das células adultas com osteoporose. Em relação aos grupos tratados com os extratos das células, somente o grupo VBSr10lca apresentou uma diminuição do número de nódulos presentes quando comparados ao de células de ratas com osteoporose.



**Figura 34** (a) Nódulos mineralizados (setas) nas CTM-MO de ratas: (A) adultas sem osteoporose; (B) adultas com osteoporose sem tratamento; (C) com osteoporose tratadas com o extrato de VB1ca; (D) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr5Ica; (E) com osteoporose tratadas com extrato de VBSr10Ica. (b) Número médio de nódulos de mineralização por campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB1ca, VBSr5Ica e VBSr10Ica em meio de diferenciação osteogênico após 14 dias de cultivo. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

Foi observado que a indução da osteoporose pela castração das ratas alterou o potencial osteogênico das CTM-MO (BOELONI et al., 2015b; OCARINO et al., 2008).



Os resultados das células de ratas com osteoporose tratadas, sugerem uma melhora do potencial osteogênico das CTMs na amostra VBSr5lca e uma diminuição nesse potencial nas amostras VBSr10lca.

A principal hipótese para a melhora observada no potencial de diferenciação osteogênica de células de ratas com osteoporose é atribuída ao conjunto de íons liberados pelos materiais somado a concentração de icariin que foi liberada no momento de produção dos extratos.

Os íons presentes nos vidros bioativos estão envolvidos no metabolismo ósseo e possuem funções importantes na angiogênese, reparo do tecido ósseo e mineralização (HOPPE; BOCCACCINI, 2015; JONES, 2013).

Além da ação dos íons Si, Ca e Sr liberados, existe também a ação do icariin. Estudos mostram que a ação osteogênica desse fitofármaco está associada a sua similaridade com o estrogênio (WING SZE et al., 2010; YE; LOU, 2005). Icariin facilita a formação óssea através da indução de genes pré-osteoblásticos como Osterix (Osx), Runx2, fosfatase alcalina (ALP) e colágeno tipo I. Ele também inibe a reabsorção óssea através da regulação da sinalização nos osteoclastos do sistema osteoprotegerina/ligante do receptor do fator nuclear-kb (OPG/RANKL) (PEI et al., 2013; ZHAO et al., 2008a). FAN et al., 2011 demonstrou que icariin não somente promoveu a diferenciação de CTM-MO in vitro de uma maneira dose dependente como também a diferenciação osteoblástica em doses bem baixas ( $10^{-9}$ M a  $10^{-6}$ M). Entretanto, uma alta concentração de  $10^{-5}$ M reduziu a diferenciação osteoblástica.

Acredita-se que no presente trabalho a dose liberada por VBSr10lca reduziu o potencial de diferenciação das CTM-MO osteoporóticas e por essa razão o grupo apresentou diminuição da atividade da fosfatase alcalina e dos nódulos de mineralização quando comparado ao grupo controle de CTM de ratas com osteoporose. Sugere-se que o grupo tratado com o extrato de VBSr5lca apresentou melhora no potencial devido a ação conjunta dos íons do vidro bioativo, os íons estrôncio e icariin, considerando que o grupo VB1ca não apresentou mudanças significativas. O resultado observado limitou-se a uma concentração selecionada e utilizada de icariin, sendo que sua faixa ótima de concentração é extensa e varia conforme a aplicação desejada. A realização de mais estudos com a finalidade de encontrar uma concentração ideal de icariin, juntamente

com as partículas de estrôncio seria necessário para confirmar ou refutar os efeitos positivos observados.

## 6 Conclusões

Esferas submicrométricas de vidro bioativo contendo diferentes quantidades de estrôncio foram obtidas;

As amostras apresentaram altos valores de área superficial e volume de poro e poros na faixa mesoporosa;

Observou-se que a adição de estrôncio afetou as propriedades texturais levando a uma redução da área superficial e volume de poro e um aumento no tamanho de poro;

O aumento na quantidade de estrôncio reduziu as taxas de dissolução e conseqüentemente formação da camada de HAC. Mesmo assim todas as amostras apresentaram bioatividade durante o ensaio de SBF e foram capazes de liberar Sr dentro da faixa terapêutica;

A avaliação da diferenciação osteogênica mostrou uma melhora no potencial apresentado pelas CTM-MO de ratas com osteoporose, observada principalmente na amostra VBSr10;

Icariin também foi incorporado com sucesso nas partículas, e a eficiência de incorporação e as taxas de liberação foram influenciadas principalmente pelo tamanho dos poros das partículas;

As partículas contendo maior concentração de Sr apresentaram uma maior incorporação de icariin e também uma liberação mais rápida;

A avaliação da diferenciação osteogênica mostrou que o sistema vidro bioativo, Sr e Icariin pode melhorar o potencial osteogênico apresentado pelas CTM-MO de ratas com osteoporose;

O trabalho mostrou que as esferas submicrométricas de vidro bioativo podem ser utilizadas para a liberação conjunta de íons estrôncio e do fitofármaco icariin como uma potencial plataforma para a utilização como tratamento complementar em cirurgias de fraturas de ossos osteoporóticos com a função de acelerar o processo de regeneração óssea, porém trabalhos futuros são necessários para melhor avaliar as faixas benéficas de icariin.

## **7 Contribuições originais ao conhecimento**

Esse trabalho propôs a síntese de partículas esféricas e submicrométricas de vidros bioativos para a co-entrega de íons estrôncio e o fitofármaco icariin para poder avaliar pela primeira vez o efeito dessas partículas no potencial de diferenciação reduzido de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose.

## 8 Sugestões para trabalhos futuros

Cálculo do IC-50 de icariin a fim de confirmar sua faixa ótima de utilização em CTM-MO de ratas com osteoporose e qual concentração apresenta o melhor potencial de diferenciação.

Realizar os ensaios de diferenciação no período de 21 dias.

Realizar os ensaios de expressão gênica dos principais marcadores da diferenciação osteogênica para entender melhor os mecanismos da ação desses sistemas na diferenciação.

Incorporar as partículas em hidrogéis para a avaliação do efeito *in vivo* desses sistemas.

Ensaio de genotoxicidade.

Ensaio de injetabilidade.

## REVISÃO BIBLIGRÁFICA

ALEGRE, D. N. et al. Possible benefits of strontium ranelate in complicated long bone fractures. **Rheumatology International**, v. 32, n. 2, p. 439–443, 2012.

AZEVEDO, M. M. et al. Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, p. 8854, 2010.

AZIZIYEH, R. et al. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of Medical Economics**, v. 22, n. 7, p. 638–644, 2019.

BACCARO, L. F. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis : a viewpoint from Brazil. p. 583–591, 2015.

BAISHYA, H. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. **Journal of Developing Drugs**, v. 06, n. 02, p. 1–8, 2017.

BARRIONI, B. R. et al. Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8904–8927, 2 Aug. 2017.

BARRIONI, B. R. et al. Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 547, p. 382–392, Jul. 2019.

BARRY, M. et al. Advances in Nanotechnology for the Treatment of Osteoporosis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 3, p. 87–94, 2016.

BHARTI, C. et al. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 5, n. 3, p. 124–33, 2013.

BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONAGLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, n. SUPPL. 1, 2007.

BOELONI, J. N. et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic

differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Hormone Research**, v. 72, n. 2, p. 88–97, 2009.

BOELONI, J. N. **Efeitos in vivo e in vitro dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas**. [s.l.] UFMG, 2012.

BOELONI, J. N. et al. Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. **Pathology, Research and Practice**, v. 209, n. 1, p. 44–51, 2013a.

BOELONI, J. N. et al. Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 57, n. 1, p. 62–70, 2013b.

BOELONI, J. N. et al. In vitro effects of triiodothyronine on the reduced osteogenic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells from of ovariectomized rats and with osteoporosis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 8, n. 3, p. 76–87, 2015a.

BOELONI, J. N. et al. In vitro effects of triiodothyronine on the reduced osteogenic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells from of ovariectomized rats and with osteoporosis. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 8, n. 3, p. 76–87, 2015b.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, Feb. 2011.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v. 42, n. 1, p. 129–138, 2008.

BRAUER, D. S. et al. Fluoride-containing bioactive glass-ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 358, n. 12–13, p. 1438–1442, Jul. 2012.

BRAUER, D. S. et al. Bactericidal strontium-releasing injectable bone cements based on bioactive glasses. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 10, n. 78, p. 20120647, 6 Jan. 2013.

BRAUER, D. S. Bioactive Glasses-Structure and Properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, n. 14, p. 4160–4181, 27 Mar. 2015.

BRODERICK, J. M. et al. Osteoporotic Hip Fractures: The Burden of Fixation Failure. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

BROWN, K. V et al. Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. **Tissue engineering. Part A**, v. 17, n. 13–14, p. 1735–46, 2011.

CAPANEMA, N. S. V. et al. Bioengineered carboxymethyl cellulose-doxorubicin prodrug hydrogels for topical chemotherapy of melanoma skin cancer. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 401–412, Sep. 2018.

CAULEY, J. A. Estrogen and bone health in men and women. **Steroids**, v. 99, n. Pt A, p. 11–5, 2014.

CHEN, H.; SENDA, T.; KUBO, K. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. **Medical Molecular Morphology**, v. 48, n. 2, p. 61–68, 20 Jun. 2015.

CHEN, S. H. et al. PLGA/TCP composite scaffold incorporating bioactive phytomolecule icaritin for enhancement of bone defect repair in rabbits. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 5, p. 6711–6722, 2013.

CHEUNG, W. H. et al. Fracture healing in osteoporotic bone. **Injury**, v. 47, p. S21–S26, 2016.

CHRISTENSON, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. **Clin Biochem.**, v. 30, n. 8, p. 573–593, 1997.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

COLETTA, D. J. J. et al. Characterization of Hybrid Bioactive Glass-polyvinyl Alcohol Scaffolds Containing a PTHrP-derived Pentapeptide as Implants for Tissue Engineering Applications. **The Open Biomedical Engineering Journal**, v. 8, n. 1, p. 20–7, 7 Mar. 2014.



CROCKETT, J. C. et al. Bone remodelling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 7, p. 991–998, 2011.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

DE OLIVEIRA, A. A. R. et al. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 2, p. 025011, 1 Apr. 2013.

DESSOU, N. S. et al. Influence of strontium for calcium substitution on the glass–ceramic network and biomimetic behavior in the ternary system  $\text{SiO}_2\text{--CaO--MgO}$ . **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8871–8885, 27 Aug. 2017.

DIGIROLAMO, D. J.; CLEMENS, T. L.; KOUSTENI, S. **The skeleton as an endocrine organ** *Nature Reviews Rheumatology*, Nov. 2012.

DINIZ, J. S. et al. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: An experimental animal study. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 3, p. 347–352, May 2009.

DOADRIO, A. L. et al. Mesoporous SBA-15 HPLC evaluation for controlled gentamicin drug delivery. 2004.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, Aug. 2006.

DOOSTMOHAMMADI, A. et al. Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2311–2316, 2011.

DZIADEK, M. et al. Gel-derived  $\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$  bioactive glasses and glass-ceramics modified by SrO addition. **Ceramics International**, v. 42, n. 5, p. 5842–5857, Apr. 2016a.

DZIADEK, M. et al. Structural variations of bioactive glasses obtained by different synthesis routes. **Ceramics International**, v. 42, n. 13, p. 14700–14709, Oct. 2016b.

EBISAWA, Y. et al. Bioactivity of CaO-SiO<sub>2</sub>-based glasses: in vitro evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 1, n. 4, p. 239–244, Nov. 1990.

EL-FIQI, A. et al. Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. **Nanoscale**, v. 4, n. 23, p. 7475, 2012.

EL-KADY, A. M.; ALI, A. F. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. **Ceramics International**, v. 38, n. 2, p. 1195–1204, Mar. 2012.

EL-KADY, A. M.; FARAG, M. M. Bioactive Glass Nanoparticles as a New Delivery System for Sustained 5-Fluorouracil Release: Characterization and Evaluation of Drug Release Mechanism. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015.

EL-KADY, A. M.; FARAG, M. M.; EL-RASHEDI, A. M. I. Bioactive glass nanoparticles designed for multiple deliveries of lithium ions and drugs: Curative and restorative bone treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 243–250, Aug. 2016.

FAN, J.-J. et al. The Dose-Effect of Icaritin on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Bone Mesenchymal Stem Cells. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10123–10133, 6 Dec. 2011.

FAROOQ, I. et al. Bioactive Glass: A Material for the Future. **World Journal of Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 199–201, Apr. 2012a.

FAROOQ, I. et al. Bioactive Glass: A Material for the Future. **World Journal of Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 199–201, Apr. 2012b.

FAURE, J. et al. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. **Materials Science and Engineering: C**, v. 47, n. July, p. 407–412, Feb. 2015.

FIORILLI, S. et al. The Incorporation of Strontium to Improve Bone-Regeneration Ability of Mesoporous Bioactive Glasses. **Materials**, v. 11, n. 5, p. 678, 26 Apr. 2018.

FONTES, T. M. P.; ARAÚJO, L. F. B. DE; SOARES, P. R. G. Osteoporose no climatério I: epidemiologia, definição, rastreio e diagnóstico TT - Osteoporosis in climacteric I: epidemiology, definition, screening and diagnosis. **Femina**, v. 40, n. 2, 2012.

FREDHOLM, Y. C. et al. Strontium containing bioactive glasses: Glass structure and physical properties. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 44–49, p. 2546–2551, Oct. 2010.

FREDHOLM, Y. C. et al. Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation, ion release and apatite formation. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 70, p. 880–889, 7 May 2012.

FUKUI, T. et al. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 5, p. 1118–1131, 2012.

GAO, C. et al. **Bone biomaterials and interactions with stem cells** *Bone Research* Sichuan University, , 21 Dec. 2017.

GENTLEMAN, E. et al. The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 3949–3956, May 2010.

GOH, Y. F. et al. Bioactive Glass: An In-Vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 5, n. 3, p. 255–266, 2014.

GOUGH, J. E.; NOTINGHER, I.; HENCH, L. L. Osteoblast attachment and mineralized nodule formation on rough and smooth 45S5 bioactive glass monoliths. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 68A, n. 4, p. 640–650, 15 Mar. 2004.

GREASLEY, S. L. et al. Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 469, p. 213–223, 2016.

GREINER, S. H. et al. Local application of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide)-coated implant accelerates fracture healing in rats. **Acta Orthopaedica**, v. 79, n. 5, p. 717–725, 2008.

GUO, Y.; LÜ, J.; KE, Q.-F. Mesoporous Bioactive Glasses: Fabrication, Structure, Drug Delivery Property, and Therapeutic Potential. **Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses**, v. 2, p. 127–151, 2019.

HESARAKI, S. et al. Physico-chemical and in vitro biological evaluation of strontium/calcium silicophosphate glass. **Journal of Materials Science: Materials in**

**Medicine**, v. 21, n. 2, p. 695–705, Feb. 2010a.

HESARAKI, S. et al. The effect of Sr concentration on bioactivity and biocompatibility of sol–gel derived glasses based on CaO–SrO–SiO<sub>2</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> quaternary system. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 3, p. 383–390, Apr. 2010b.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 10, p. 874–875, 1961.

HOLROYD, C.; COOPER, C.; DENNISON, E. Epidemiology of osteoporosis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 671–685, Oct. 2008.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 9 May 2013.

HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. S1, p. 89–96, 20 Dec. 2008.

HOPPE, A.; BOCCACCINI, A. R. Biological impact of bioactive glasses and their dissolution products. **Biomaterials for Oral and Craniomaxillofacial Applications**, v. 7, p. 22–32, 2015.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, Apr. 2011.

HORCAJADA, P. et al. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 68, n. 1–3, p. 105–109, 8 Mar. 2004.

HU, Q. et al. Facile synthesis and in vitro bioactivity of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. **Materials Letters**, v. 106, p. 452–455, Sep. 2013.

HU, Q. et al. Size control and biological properties of monodispersed mesoporous bioactive glass sub-micron spheres. **RSC Adv.**, v. 4, n. 43, p. 22678–22687, 2014a.

HU, Q. et al. Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres

with a tunable cavity size. **Materials Letters**, v. 134, p. 130–133, 2014b.

HU, Q. et al. The effects of Sr concentration on physicochemical properties, bioactivity and biocompatibility of sub-micron bioactive glasses spheres. **Advanced Powder Technology**, v. 28, n. 10, p. 2713–2722, Oct. 2017.

HURT, A. P.; GETTI, G.; COLEMAN, N. J. Bioactivity and biocompatibility of a chitosan-tobermorite composite membrane for guided tissue regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 11–16, Mar. 2014.

INDRAN, I. R. et al. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus *Epimedium* for osteoporosis and bone health. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 162, p. 188–205, Jun. 2016.

IÑIGUEZ-ARIZA, N. M.; CLARKE, B. L. Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas**, v. 82, n. 2, p. 245–255, Oct. 2015.

INTERNATIONAL STANDARD, I. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

ISHII, M. et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 1, p. 297–303, 24 Jun. 2005.

IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGÍ, M. Mesoporous bioactive glasses: Relevance of their porous structure compared to that of classical bioglasses. **Biomedical Glasses**, v. 1, p. 140–150, 2015.

JIA, M. et al. Potential Antiosteoporotic Agents from Plants: A Comprehensive Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–28, 2012.

JONES, J. R. et al. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 9, p. 1653–1663, 2007.

JONES, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, n. 7, p. 1275–1281, Apr. 2009.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v.

9, n. 1, p. 4457–4486, Jan. 2013.

JONES, J. R.; HENCH, L. L. Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds. v. 8, p. 3783–3790, 2003.

JONES, J. R.; SEPULVEDA, P.; HENCH, L. L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, n. 6, p. 720–726, 2001.

KANAKARIS, N. K. et al. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. **Injury Extra**, v. 40, n. 10, p. 202, Oct. 2009.

KARGOZAR, S. et al. Multiple and Promising Applications of Strontium (Sr)-Containing Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. July, 5 Jul. 2019.

KAUR, G. et al. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 1, p. 254–274, Jan. 2014.

KENKRE, J.; BASSETT, J. The bone remodelling cycle. **Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine**, v. 55, n. 3, p. 308–327, 4 May 2018.

KHACHANE, P.; DATE, A. A.; NAGARSENKER, M. S. Eudragit EPO nanoparticles: Application in improving therapeutic efficacy and reducing ulcerogenicity of meloxicam on oral administration. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 4, p. 590–597, 2011.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. v. 23, n. 11, 2012.

KIM, C. Y.; NAM, M. S. Precipitation of carbonate crystal on surface active glasses. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 13, p. 3245–3250, 2000.

KULAR, J. et al. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 863–873, 2012.

KWUN, I. et al. Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx 2 modulation. **Bone**, v. 46, n. 3, p. 732–741, Mar. 2010.

KYLLÖNEN, L. et al. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. **Acta Biomaterialia**, v. 11, n. 1, p. 412–434, 2015.

LABBAF, S. et al. Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1010–1018, Feb. 2011.

LAO, J.; NEDELEC, J. M.; JALLOT, E. New strontium-based bioactive glasses: physicochemical reactivity and delivering capability of biologically active dissolution products. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 2940, 2009.

LECART, M.; REGINSTER, J. Current options for the management of postmenopausal osteoporosis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 12, n. 16, p. 2533–2552, 15 Nov. 2011.

LEI, B. et al. Synthesis and in vitro bioactivity of novel mesoporous hollow bioactive glass microspheres. **Materials Letters**, v. 63, n. 20, p. 1719–1721, 2009.

LEI, B. et al. Unique physical–chemical, apatite-forming properties and human marrow mesenchymal stem cells (HMSCs) response of sol–gel bioactive glass microspheres. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 34, p. 12725, 2011.

LEITE, Á. J. et al. Strontium-Doped Bioactive Glass Nanoparticles in Osteogenic Commitment. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 10, n. 27, p. 23311–23320, 11 Jul. 2018.

LI, C. et al. Pharmacological effects and pharmacokinetic properties of icariin, the major bioactive component in Herba Epimedii. **Life Sciences**, v. 126, p. 57–68, 2015a.

LI, L. et al. Role of mechanical strain and estrogen in modulating osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) from normal and ovariectomized rats. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. Suppl 59, p. OL1889-93, 6 Nov. 2013.

LI, Y. et al. Strontium ranelate treatment enhances hydroxyapatite-coated titanium screws fixation in osteoporotic rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 5, p.

578–582, 2010.

LI, Y. et al. Facile synthesis of mesoporous bioactive glasses with controlled shapes. **Materials Letters**, v. 161, p. 605–608, Dec. 2015b.

LI, Y.; BASTAKOTI, B. P.; YAMAUCHI, Y. Smart Soft-Templating Synthesis of Hollow Mesoporous Bioactive Glass Spheres. **Chemistry - A European Journal**, v. 21, n. 22, p. 8038–8042, 26 May 2015.

LI, Z.; HU, X.; ZHONG, J. F. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Function, and Application. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1–2, 6 Mar. 2019.

LILL, C. A. et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 5, p. 836–842, Sep. 2003.

LIN, S. et al. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol – gel derived bioactive glass. p. 1276–1282, 2009.

LIU, F.; MALAVAL, L.; AUBIN, J. E. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 1, p. 97–105, 10 Apr. 1997.

LIU, J. et al. A novel trans-lymphatic drug delivery system: Implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. **Biomaterials**, v. 28, n. 21, p. 3236–3244, 2007.

LIU, J. et al. Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects. **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 412–422, Mar. 2016.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Modified release of drug delivery systems: Hydrophilic polymers. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LU, W. et al. Synthesis and Characterization of Mesoporous  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  Bioactive Glass by Sol–Gel Process. **Materials ...**, v. 54, n. 5, 2013.

M.P., Y.; J.G., Y. Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 8, n. 3, p. 204–216, 2008.



MAÇON, A. L. B. et al. A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, n. 2, p. 115, 11 Feb. 2015.

MAÇON, A. L. B. et al. Synthesis and dissolution behaviour of CaO/SrO-containing sol-gel-derived 58S glasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8858–8870, 22 Aug. 2017.

MARIE, P. Strontium as therapy for osteoporosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 633–636, Dec. 2005.

MARIE, P. J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. Suppl 1, p. S11–S15, Jun. 2006.

MARTIN, A. et al. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. **Bone**, v. 75, p. 96–104, 2015.

MARTIN, R. A. et al. An examination of the calcium and strontium site distribution in bioactive glasses through isomorphic neutron diffraction, X-ray diffraction, EXAFS and multinuclear solid state NMR. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 41, p. 22212, 2012.

MARTÍNEZ, A.; IZQUIERDO-BARBA, I.; VALLET-REGÍ, M. **Bioactivity of a CaO–SiO<sub>2</sub> Binary Glasses System** *Chemistry of Materials*, 2000. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cm001107o#%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm001107o%5Cnhttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm001107o>>

MASSERA, J.; HUPA, L. Influence of SrO substitution for CaO on the properties of bioactive glass S53P4. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 3, p. 657–668, 12 Mar. 2014.

MAZZAFERRO, S. et al. Reduced Intestinal Toxicity of Docetaxel Loaded Into Mucoadhesive Nanoparticles, in Mouse Xenograft Model. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 210–217, 1 Dec. 2012.

MEUNIER, P. J. et al. The Effects of Strontium Ranelate on the Risk of Vertebral Fracture in Women with Postmenopausal Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v.

350, n. 5, p. 459–468, 29 Jan. 2004.

MILADI, K. et al. Drug carriers in osteoporosis: Preparation, drug encapsulation and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 445, n. 1–2, p. 181–195, 2013.

MOGHANIAN, A.; FIROOZI, S.; TAHRIRI, M. Characterization , in vitro bioactivity and biological studies of sol-gel synthesized SrO substituted 58S bioactive glass. v. 43, n. August, p. 14880–14890, 2017.

MOREIRA, C. D. F. et al. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1207–1216, 2016.

MUKOZAWA, A. et al. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 11, p. 1327–1335, 2011.

MURPHY, S. et al. The effect of composition on ion release from Ca–Sr–Na–Zn–Si glass bone grafts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 11, p. 2207–2214, 28 Nov. 2009.

MURSHED, M. et al. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. **Genes and Development**, v. 19, n. 9, p. 1093–1104, 1 May 2005.

NANDI, S. K. et al. Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration. In: **Advanced Techniques in Bone Regeneration**. [s.l.] InTech, 2016.

NARAYANAN, D. et al. Synthesis, Characterization and Preliminary <I>In Vitro</I> Evaluation of PTH 1-34 Loaded Chitosan Nanoparticles for Osteoporosis. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 98–106, 1 Feb. 2012.

NIAN, H. et al. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 320–326, Apr. 2009.

O'DONNELL, M. D. et al. Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1455–1464, Sep. 2008.

O'DONNELL, M. D. et al. Materials characterisation and cytotoxic assessment of strontium-substituted bioactive glasses for bone regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, p. 8934, 2010.

O'DONNELL, M. D.; HILL, R. G. Influence of strontium and the importance of glass chemistry and structure when designing bioactive glasses for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2382–2385, Jul. 2010.

OCARINO, N. M. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 19, n. 4, p. 320–325, 2008.

ODATSU, T. et al. Human periosteum cell osteogenic differentiation enhanced by ionic silicon release from porous amorphous silica fibrous scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 103, n. 8, p. 2797–2806, Aug. 2015.

OLDKNOW, K. J.; MACRAE, V. E.; FARQUHARSON, C. Endocrine role of bone: Recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. **Journal of Endocrinology**, v. 225, n. 1, p. R1–R19, 2015.

OLSZTA, M. J. et al. Bone structure and formation: A new perspective. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 58, n. 3–5, p. 77–116, Nov. 2007.

PATRICK ROSS, F. Osteoclast Biology and Bone Resorption. In: **Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism: Eighth Edition**. [s.l.] Wiley Blackwell, 2013. p. 25–33.

PAYUSHINA, O. V.; DOMARATSKAYA, E. I.; STAROSTIN, V. I. Mesenchymal stem cells: Sources, phenotype, and differentiation potential. **Biology Bulletin**, v. 33, n. 1, p. 2–18, Jan. 2006.

PEEL, N. Bone remodelling and disorders of bone metabolism. **Surgery**, v. 27, n. 2, p. 70–74, 2009.

PEI, L.-K. et al. Fast quality control of Herba Epimedii by using Fourier transform infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 70, n. 2, p. 258–264, Jul. 2008.

PENG, S. et al. The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: Involvement of osteoprotegerin. **Bone**, v. 49, n. 6, p. 1290–1298, Dec. 2011.

PENG, S. et al. The beneficial effect of Icaritin on osteoporotic bone is dependent on the treatment initiation timing in adult ovariectomized rats. **Bone**, v. 55, n. 1, p. 230–240, Jul. 2013.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Calcium Phosphate Formation on Sol Gel Derived Bioactive Glasses in Vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 28, n. 6, p. 693–698, 1994.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 78, n. 9, p. 2463–2468, 1995.

PEREIRA, M. M.; HENCH, L. L. Bioactive Glass. In: **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**. First edit ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004. p. 53–61.

PEREZ, R. A. et al. Therapeutic bioactive microcarriers: Co-delivery of growth factors and stem cells for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 520–530, Jan. 2014.

PINHEIRO, M. M. et al. O impacto da osteoporose no Brasil. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 2, p. 113–27, 2010.

PIRAYESH, H.; NYCHKA, J. A. Sol-Gel Synthesis of Bioactive Glass-Ceramic 45S5 and its in vitro Dissolution and Mineralization Behavior. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 96, n. 5, p. 1643–1650, May 2013.

PORS NIELSEN, S. The biological role of strontium. **Bone**, v. 35, n. 3, p. 583–588, Sep. 2004.

QIN, Y. X.; HU, M. Mechanotransduction in musculoskeletal tissue regeneration: Effects of fluid flow, loading, and cellular-molecular pathways. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

QU, F. et al. Controlled release of Captopril by regulating the pore size and morphology of ordered mesoporous silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 92, n. 1–3,

p. 1–9, 20 Jun. 2006.

R, K. A. Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. **Scholars Academic Journal of PharmacyOnline) Sch. Acad. J. Pharm**, v. 3, n. 5, p. 2320–4206, 2014.

RABIEE, S. M. et al. Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review. **Ceramics International**, v. 41, n. 6, p. 7241–7251, Jul. 2015.

RAFFIN, R. P. et al. Natural lipid nanoparticles containing nimesulide: Synthesis, characterization and in vivo antiedematogenic and antinociceptive activities. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 309–315, 2012.

RAMANLAL CHAUDHARI, K. et al. Bone metastasis targeting: A novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 3, p. 470–478, 2012.

REIS, A. M. S. et al. Inhibition of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from the offspring of rats treated with caffeine during pregnancy and lactation. **Connective Tissue Research**, v. 57, n. 2, p. 131–142, 2016.

REITER, T. et al. Bioactive glass based scaffolds coated with gelatin for the sustained release of icariin. **Bioactive Materials**, v. 4, n. 1, p. 1–7, Mar. 2019.

RIBEIRO, A. F. D. C. et al. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 3, p. 228–236, Jun. 2003.

ROBIN, B. et al. In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, n. 4, p. 1184–1190, Oct. 2004.

RODIG, O. R. Spectrometric Identification of Organic Compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 826–827, Nov. 1963.

RODRIGUES CAMARGO, M. B. et al. Bone mineral density and osteoporosis among a predominantly Caucasian elderly population in the city of São Paulo, Brazil. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 11, p. 1451–1460, Nov. 2005.

RODRIGUEZ, J. et al. Involvement of Adipogenic Potential of Human Bone Marrow

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Osteoporosis. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 3, p. 208–218, 2008.

RODRÍGUEZ, J. P. et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 557–65, 14 Sep. 2000.

ROMÁN, J.; PADILLA, S.; VALLET-REGÍ, M. Sol-Gel Glasses as Precursors of Bioactive Glass Ceramics. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 3, p. 798–806, Feb. 2003.

ROUSH, K. Prevention and Treatment of Osteoporosis in Postmenopausal Women: A Review. **AJN, American Journal of Nursing**, v. 111, n. 8, p. 26–35, Aug. 2011.

RUIZ-CLAVIJO, A. et al. Effect of Calcium Precursor on the Bioactivity and Biocompatibility of Sol-Gel-Derived Glasses. p. 1–16, 2019.

S, B. et al. FT-IR, FT-Raman and UV-Visible Spectral Analysis on (E)-N'-(thiophen-2-ylmethylene) Nicotinohydrazide. **Archives in Chemical Research**, v. 01, n. 02, p. 7, 2017.

SABAREESWARAN, A. et al. Early osseointegration of a strontium containing glass ceramic in a rabbit model. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9278–9286, Dec. 2013.

SABOORI, A. et al. Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub>–CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–MgO bioglass. **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 1, p. 335–340, Jan. 2009.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SAFADI, F. F. et al. **Bone Structure , Development and Bone Biology : Bone Pathology Bone Structure , Development and Bone Biology**. [s.l: s.n.].

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 136, n. 2, p. 216–226, Nov. 2012.

SAITO, W. et al. Acceleration of bone formation during fracture healing by injectable collagen powder and human basic fibroblast growth factor containing a collagen-binding

domain from Clostridium histolyticum collagenase. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 9, p. 3049–3055, Sep. 2014.

SALINAS, A. J. et al. Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 9, p. 3452–3458, Sep. 2011.

SARAVANAPAVAN, P. et al. Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 66A, n. 1, p. 110–119, 1 Jul. 2003.

SHUID, A. N. et al. Drug delivery systems for prevention and treatment of osteoporotic fracture. **Current drug targets**, v. 14, n. 13, p. 1558–64, 2013.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. **Physiology**, v. 31, n. 3, p. 233–245, 6 May 2016.

SOLGI, S. et al. Synthesis, Characterization and In Vitro Biological Evaluation of Sol-gel Derived Sr-containing Nano Bioactive Glass. **Silicon**, v. 9, n. 4, p. 535–542, 29 Jul. 2017.

STADLINGER, B. et al. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. **European cells & materials**, v. 25, p. 326–40; discussion 339-40, 2013.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62–69, Jan. 1968.

TABIA, Z. et al. Mesoporous bioactive glass nanoparticles doped with magnesium: drug delivery and acellular in vitro bioactivity. **RSC Advances**, v. 9, n. 22, p. 12232–12246, 2019.

TAHERKHANI, S.; MOZTARZADEH, F. Influence of strontium on the structure and biological properties of sol-gel-derived mesoporous bioactive glass (MBG) powder. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 78, n. 3, p. 539–549, 7 Jun. 2016.

TAKAOKA, S. et al. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. **Hormone and Metabolic**

**Research**, v. 42, n. 9, p. 627–631, 2010.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 9–10, p. 1051–1069, 2015.

TILOCCA, A. Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, n. 33, p. 6848–6858, 2010.

TILOCCA, A.; CORMACK, A. N. Structural Effects of Phosphorus Inclusion in Bioactive Silicate Glasses. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 51, p. 14256–14264, Dec. 2007.

TSIGKOU, O. et al. Monodispersed bioactive glass submicron particles and their effect on bone marrow and adipose tissue-derived stem cells. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 1, p. 115–125, 2014.

VALERIO, P. et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v. 25, n. 15, p. 2941–2948, 2004.

VALLET-REGI, M. et al. Drug Confinement and Delivery in Ceramic Implants. **Drug Metabolism Letters**, v. 1, n. 1, p. 37–40, 1 Jan. 2007.

VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F.; ARCOS, D. Mesoporous Materials for Drug Delivery. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 40, p. 7548–7558, 8 Oct. 2007.

WANG, C. et al. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 226–33, 2016a.

WANG, P. et al. Flavonoid Compound Icaritin Activates Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  in Chondrocytes and Promotes Articular Cartilage Repair. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148372, 3 Feb. 2016b.

WANG, S. Ordered mesoporous materials for drug delivery. 2008.

WANG, X. et al. Selenium – containing mesoporous bioactive glass particles:



Physicochemical and drug delivery properties. **Ceramics International**, v. 42, n. 2, p. 3609–3617, Feb. 2016c.

WANG, X.; WANG, G.; ZHANG, Y. Research on the biological activity and doxorubicin release behavior in vitro of mesoporous bioactive SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass nanospheres. **Applied Surface Science**, v. 419, p. 531–539, Oct. 2017.

WANG, Y.; PAN, H.; CHEN, X. The preparation of hollow mesoporous bioglass nanoparticles with excellent drug delivery capacity for bone tissue regeneration. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. APR, p. 1–10, 2019.

WANG, Z. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application. p. 535–544, 2018.

WEI, L. et al. A comparative study of Sr-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds for regeneration of osteopenic bone defects. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 8, p. 2089–2096, 8 Aug. 2014.

WEI, Z. et al. Icariin exerts estrogen-like activity in ameliorating EAE via mediating estrogen receptor  $\beta$ , modulating HPA function and glucocorticoid receptor expression. **American journal of translational research**, v. 8, n. 4, p. 1910–8, 2016.

**WHO Technical Report Series 921 PREVENTION AND MANAGEMENT OF OSTEOPOROSIS Report of a WHO Scientific Group.** . [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42841/WHO\\_TRS\\_921.pdf?sequence=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42841/WHO_TRS_921.pdf?sequence=1&ua=1)>. Acesso em: 10 dec. 2019.

WING SZE, S. C. et al. **Herba Epimedii: Anti-oxidative properties and its medical implications****Molecules**, Nov. 2010.

WU, C. et al. Bioactive SrO–SiO<sub>2</sub> glass with well-ordered mesopores: Characterization, physiochemistry and biological properties. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1797–1806, Apr. 2011a.

WU, C. et al. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7068–7078, Oct. 2011b.

WU, C. et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable

cobalt ion release for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2076–2085, 2012a.

WU, C. et al. Strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with improved osteogenic/cementogenic differentiation of periodontal ligament cells for periodontal tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 10, p. 3805–3815, Oct. 2012b.

WU, C.; CHANG, J. Multifunctional mesoporous bioactive glasses for effective delivery of therapeutic ions and drug/growth factors. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 282–295, Nov. 2014.

WU, C.; FAN, W.; CHANG, J. Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 21, p. 2710, 2013.

WU, Y. et al. Evaluation of osteogenesis and angiogenesis of icariin loaded on micro/nano hybrid structured hydroxyapatite granules as a local drug delivery system for femoral defect repair. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, n. 24, p. 4871–4883, 2015.

XIA, L. et al. Icariin delivery porous PHBV scaffolds for promoting osteoblast expansion in vitro. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3545–3552, 2013.

XIA, W.; CHANG, J. Well-ordered mesoporous bioactive glasses (MBG): A promising bioactive drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 3, p. 522–530, Feb. 2006.

XU, H. et al. Icariin loaded-hollow bioglass/chitosan therapeutic scaffolds promote osteogenic differentiation and bone regeneration. **Chemical Engineering Journal**, v. 354, n. July, p. 285–294, Dec. 2018.

YANG, A. et al. Review Article Mechanism of Action of Icariin in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. v. 2019, 2019.

YANG, G. et al. Effect of strontium-substituted nanohydroxyapatite coating of porous implant surfaces on implant osseointegration in a rabbit model. **The International journal of oral & maxillofacial implants**, v. 27, n. 6, p. 1332–9, 2012.

YE, H. Y.; LOU, Y. J. Estrogenic effects of two derivatives of icariin on human breast

cancer MCF-7 cells. **Phytomedicine**, v. 12, n. 10, p. 735–741, 15 Nov. 2005.

YUAN, F. L. et al. **Leonurine hydrochloride inhibits osteoclastogenesis and prevents osteoporosis associated with estrogen deficiency by inhibiting the NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt signaling pathways** *Bone*, 2015.

ZHANG, G.; QIN, L.; SHI, Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 7, p. 1072–1079, 2007.

ZHANG, S. et al. Icariin influences adipogenic differentiation of stem cells affected by osteoblast-osteoclast co-culture and clinical research adipogenic. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 436–442, 1 Apr. 2017.

ZHANG, W. et al. Synergistic effect of strontium and silicon in strontium-substituted sub-micron bioactive glass for enhanced osteogenesis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 89, n. September 2017, p. 245–255, Aug. 2018.

ZHANG, Y.; WANG, Q.; MENG, F. Changes in the intestinal absorption mechanism of icariin in the nanocavities of cyclodextrins. p. 4239–4249, 2012.

ZHAO, F. et al. Promoting in vivo early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes. **Biomaterials**, v. 178, p. 36–47, Sep. 2018.

ZHAO, J. et al. Icariin: A Potential Osteoinductive Compound for Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 1, p. 233–243, Jan. 2010.

ZHAO, L. et al. Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1–3, p. 210–215, Mar. 2008.

ZHONG, J.; GREENSPAN, D. C. Processing and properties of sol-gel bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, n. 6, p. 694–701, 2000.

ZHU, M. et al. An emulsification-solvent evaporation route to mesoporous bioactive glass microspheres for bisphosphonate drug delivery. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 5, p. 2256–2263, 2012.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 202/2017

Titulo do projeto: Síntese de Partículas de Vidro Bioativo com a Incorporação de Estrôncio e Icarin e Avaliação do seu Potencial Osteogênico em Células Tronco Mesenquimais de Ratas com Osteoporose

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Marivalda de Magalhaes Pereira

Unidade: Escola de Engenharia

Departamento: Departamento de Engenharia Metalurgica

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 25/09/2017. Validade: 25/09/2017 à 24/09/2022  
Belo Horizonte, 25/09/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## APÊNDICE A – AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS PARTÍCULAS (CONTATO DIRETO) NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CTM-MO DE RATAS COM OSTEOPOROSE

Previamente aos ensaios de diferenciação com a utilização dos extratos das partículas, foram realizados ensaios com a utilização da metodologia de contato direto, ou seja, as partículas foram adicionadas diretamente na cultura. A utilização dessa metodologia para o estudo realizado foi descartada. A seguir serão apresentadas as diferenças presentes nas metodologias e também os resultados obtidos.

### Metodologia

Foram constituídos, seis grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico que estão representados na tabela e descritos a seguir: **1)** CTM de ratas adultas sem osteoporose; **2)** CTM de ratas adultas com osteoporose sem partículas; **3)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com VB ; **4)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com VBSr5; **5)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com VB1ca; **6)** CTM de ratas adultas com osteoporose tratadas com VBSr51ca.

**Tabela:** Identificação dos grupos experimentais

Grupos	Tipo de partícula	CTM ratas	Sem osteoporose	Com osteoporose
1	-	Adulta	X	
2	-	Adulta		X
3	VB	Adulta		X
4	VBSr5	Adulta		X
5	VB1ca	Adulta		X

6	VBSr5lca	Adulta		X
---	----------	--------	--	---

### **Obtenção das suspensões de partículas**

Para das suspensões dos materiais, as partículas de vidro de cada grupo foram imersas em meio DMEM [DMEM com baixa glicose enriquecido com gentamicina (60 µg/L), penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100µg/mL), anfotericina (25µg/mL)] na proporção de 100µg/mL e a mistura foi vigorosamente homogeneizada com auxílio de banho de ultrassom por período de 30 minutos. Antes de utilizar essas suspensões nos ensaios, as mesmas foram suplementadas com 10% soro fetal bovino (SBF).

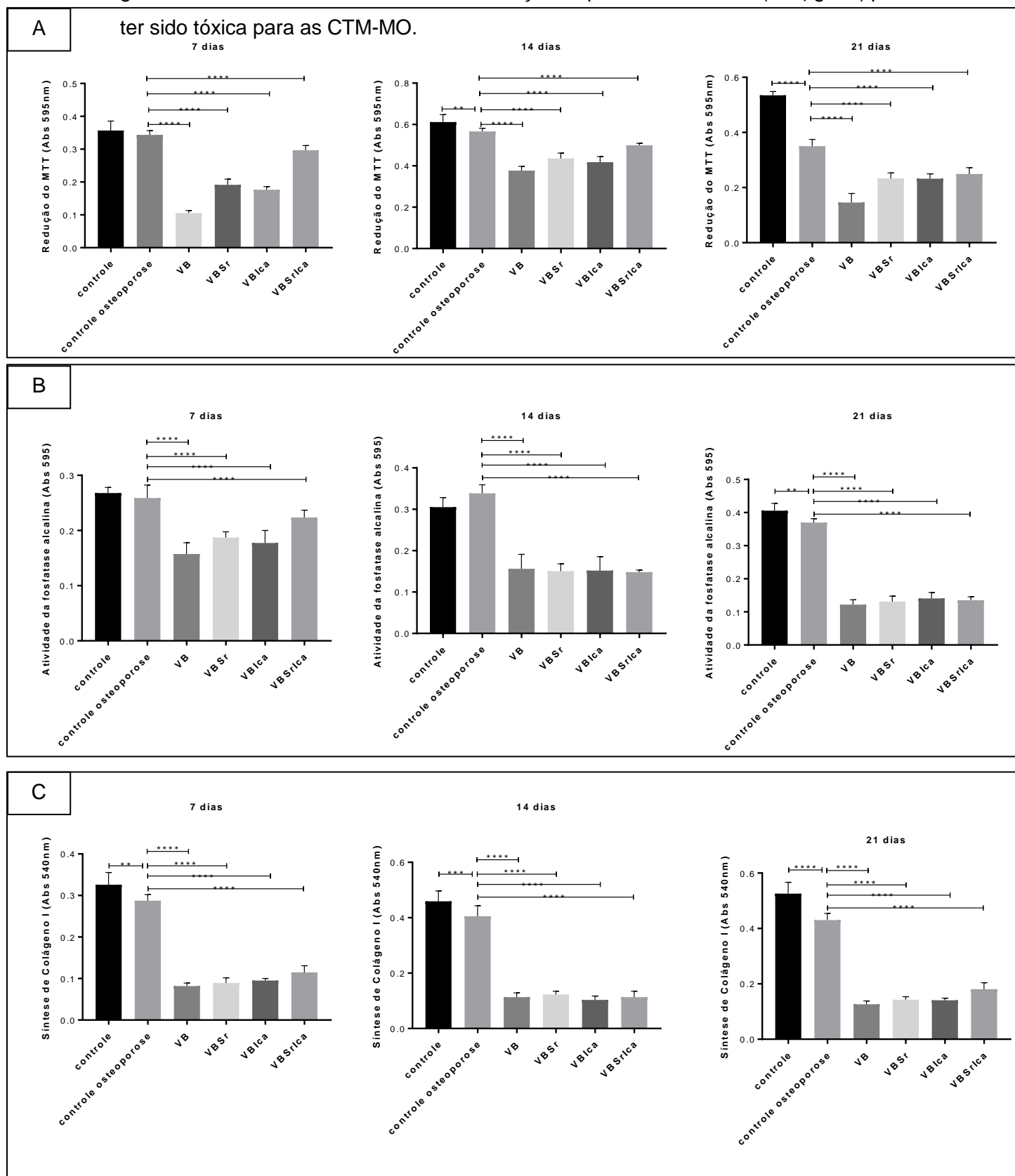
### **Ensaio de produção de colágeno**

Células mesenquimais não diferenciadas de medula óssea, de ratos normais e ratos osteoporóticos, foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Após 24 horas, o meio osteogênico acrescido ou não as partículas foi adicionado e as células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7, 14 e 21 dias. Após esse período as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução Bouin por 2h a 37°C. Após a incubação, as placas de cultura foram lavadas com água deionizada e depois coradas com Sircol Red por 30 minutos a temperatura ambiente. Em sequência, as placas foram lavadas com uma solução de 0,01N de HCL, secas, coradas utilizando novamente o Sircol Red e analisadas utilizando microscopia ótica. Após essa etapa, elas foram tratadas com uma solução de 0,5N NaOH e analisadas em um leitor de placas de microtitulação com absorvância a 540nm. Foram determinados então, a absorvância média e o desvio padrão em sextuplicata para cada grupo experimental.

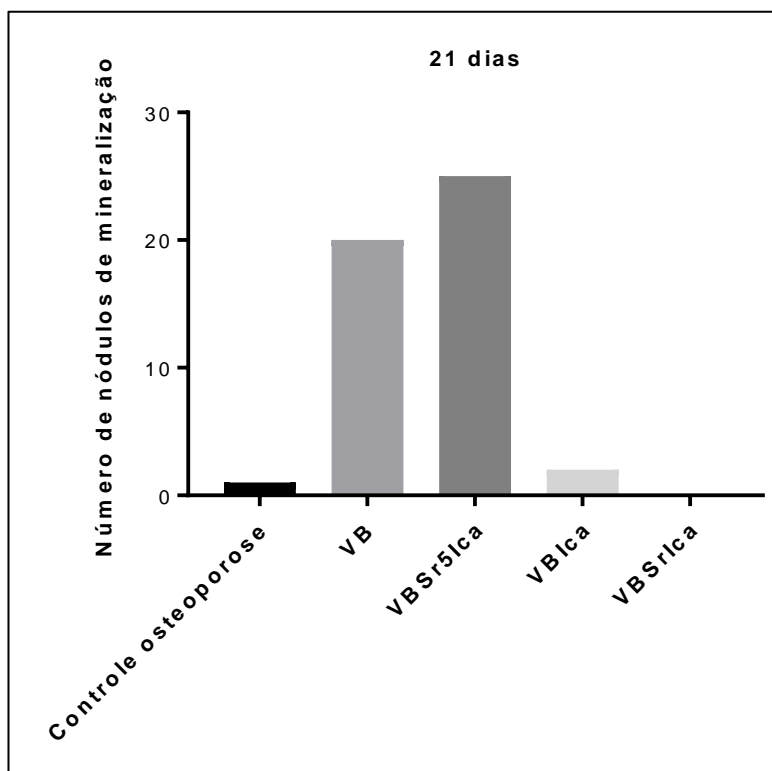
### **Resultados**

Diferente dos resultados observados através da utilização dos extratos das partículas, a utilização das partículas diretamente na cultura apresentou uma redução significativa na diferenciação, atividade metabólica celular e produção de colágeno tipo I. Duas hipóteses foram levantadas: a inicial seria que as partículas presentes poderiam através de efeito mecânico durante a troca de meio, que poderiam ter descolado as células da

garrafa de cultura e a outra onde a concentração de partículas utilizada (100 $\mu$ g/mL) pode



**Figura A:** Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr, VB1ca e VBSr1ca em meio de diferenciação osteogênico aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. **B** Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr, VB1ca e VBSr1ca em meio de diferenciação osteogênico aos 7, 14 e 21 dias de cultivo. **C** Produção de colágeno tipo I (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr, VB1ca e VBSr1ca em meio de diferenciação osteogênico aos 7, 14 e 21 dias de cultivo.



**Figura** Número total de nódulos de mineralização por lamínula em culturas de CTM-MO de ratas adultas com e sem osteoporose, tratadas ou não com os extratos das partículas VB, VBSr, VB1ca e VBSr1ca em meio de diferenciação osteogênico após 21 dias de cultivo.