



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**CÍNTIA DE MELO BRAGA**

**EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM SINVASTATINA NA  
PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS**

**FORTALEZA**  
**2017**

CINTIA DE MELO BRAGA

EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM SINVASTATINA NA  
PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B793 Braga, Cíntia de Melo.

EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM SINVASTATINA NA  
PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEOLASTOS MURINOS / Cíntia de Melo Braga. –  
2017.

62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Sinvastatina. 2. Nanopartículas Poliméricas. 3. Osteoblastos. I. Título.

**CDD 611**

---

CÍNTIA DE MELO BRAGA

EFEITO DE NANOPARTÍCULAS CARREADORAS DE SINVASTATINA NA  
PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico todo o esforço e resultado deste trabalho à minha mãe, Deborah, pessoa que mais amo e admiro, pela dedicação, amor incondicional e exemplo de sabedoria e honestidade.

Aos meus irmãos, Érica e Breno, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao meu esposo, Rafael, pelo carinho e amor dispensados em todas as horas, sendo sempre meu incentivo e minha força.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, antes de tudo, a Deus por estar sempre ao meu lado e colocar pessoas extraordinárias no meu caminho.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Renata Ferreira de Carvalho Leitão, agradeço pelo exemplo de determinação, honestidade e dedicação ao ensino e à pesquisa. Agradeço pela paciência e pelo dom de esclarecer e simplificar as minhas dúvidas, por ser a principal responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico ao longo dos últimos sete anos, quando entrei no laboratório como aluna de iniciação científica. Agradeço pelo convívio enriquecedor e pelo constrante otimismo diante das adversidades.

À professora Gerly Anne de Castro Brito, pelo apoio e incentivo constantes e por fazer o possível para viabilizar a execução deste trabalho.

À professora Eliana Martins Lima e ao Danillo Fabrini da UFG pela confecção das nanopartículas testadas neste trabalho.

Ao grande amigo, Ariel Valente, indispensável ajuda durante esses dois anos de mestrado. Agradeço por dividir a autoria deste trabalho comigo.

À minha querida dupla, Luane, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade. Agradeço por dividir comigo as angústias e por vibrar com as conquistas nos experimentos. Sua força de vontade e dedicação são um exemplo, tenho orgulho e torço muito por você.

Aos colegas do laboratório, especialmente, Deize e Josy que tornaram meus dias mais tranquilos e leves e estiveram sempre dispostas a ajudar. Agradeço ainda aos colegas Mariana, Gildênio, Dvison e Alice que de alguma forma ajudaram na concretização deste trabalho.

À Bia, Ana Beatriz Duarte, que ajudou imensamente na organização da sala de cultura, viabilizando a realização deste trabalho, além de ter sido apoio intelectual e emocional nos momentos de aflição.

Aos estudantes de Iniciação científica, Eduarda, Lauro e Gutierres pela disponibilidade e ajuda na execução dos experimentos.

Ao laboratório NEMPI, especialmente aos professores e ao apoio técnico, agradeço pela disponibilidade e ajuda.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro

## RESUMO

**Introdução:** O uso de polímeros como nanocarreadores de fármacos oferece flexibilidade na dosagem e na cinética de liberação, melhorando a eficácia dos tratamentos farmacológicos. A sinvastatina, medicamento utilizado para a redução do colesterol, em alguns estudos, tem demonstrado ação na estimulação da formação óssea. Acredita-se que este efeito pleiotrópico e a possibilidade obtenção de um sistema para liberação controlado pode levar a um aumento na formação óssea. **Objetivo:** O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar o efeito da sinvastatina encapsulada em nanopartículas poliméricas (NP-SIN) de PDLLA na proliferação e ativação de osteoblastos murinos (OFCOL II) em cultura. **Métodos:** O efeito da NP-SIN na viabilidade e proliferação de osteoblastos foi investigado através do ensaio de MTT e da imunomarcagem para ki67, enquanto seu efeito na ativação dessas células foi avaliado através de ensaio de mineralização, da mensuração dos níveis de fosfatase alcalina óssea no meio de cultura por ELISA, e da sua expressão protéica por western blot. Os possíveis mecanismos da ação da NP-SIN no metabolismo ósseo foram estudados através de imunofluorescência e western blot para RANK-L, OPG e BMP-2. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância ANOVA, seguida pelo teste Bonferroni ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** As nanopartículas utilizadas apresentaram-se uniformes, com diâmetro aproximado de 123 nm, avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão. A sinvastatina foi submetida a teste de liberação e, quando encapsulada, observou-se liberação progressiva e sustentada por até 6 dias, quando iniciou processo de degradação. Foram observados efeitos citotóxicos nos osteoblastos apenas quando incubados com concentrações de NP-SIN igual ou superiores a  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$ . Não foi observado aumento na proliferação de osteoblastos em nenhuma das concentrações estudadas. O ensaio de mineralização sugere que a NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ) aumenta a atividade dos osteoblastos, quando comparada aos grupos controle, não incubados com sinvastatina. Nessa mesma concentração (NP-SIN  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ), foi observado aumento da expressão protéica e liberação de fosfatase alcalina (FAO), associado ao aumento significativo da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP-2). Foi observado ainda aumento ( $p < 0,05$ ) da imunomarcagem de BMP-2 e OPG. Não houve diferença significativa na expressão da proteína RANK-L entre o grupo de osteoblastos incubados com NP-SIN e os controles. **Conclusões:** Estes resultados indicam um potencial efeito benéfico das nanopartículas de PDLLA encapsuladas com sinvastatina no reparo de defeitos ósseos, através da ativação de osteoblastos.

**Palavras-chave:** Sinvastatina. Nanopartículas poliméricas. Osteoblastos



## ABSTRACT

**Introduction:** The use of polymers as drug nanocarriers offers flexibility in dosage and release kinetics, improving the effectiveness of pharmacological treatments. Simvastatin, a cholesterol-lowering drug, has been shown in some studies to estimate formation. It is believed that this pleiotropic effect and an obtainment of a system for the controlled release can lead to an increase in bone formation.

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate the effect of PDLLA polymerase-encapsulated simvastatin (NP-SIN) on the proliferation and activation of murine osteoblasts (OFCOL II) in culture.

**Methods:** The effect of NP-SIN on the viability and proliferation of osteoblasts was investigated through the MTT assay and the ki67 immunostaining, its effect on cell activation for assessed by mineralization assay, measurement of bone alkaline phosphatase levels No culture medium by ELISA, and its protein expression by western blot. The possible mechanisms of action of NP-SIN non-bone metabolism were studied by immunofluorescence and western blot for RANK-L, OPG and BMP-2. Statistical analysis was performed using analysis of variance ANOVA, followed by the Bonferroni test ( $p < 0.05$ ).

**Results:** As nanoparticles were used with uniforms, with approximate diameter of 123 nm, evaluated by transmission electron microscopy. Simvastatin was submitted to a release test, when encapsulated, it was observed progressive and sustained release for up to 6 days, when the degradation process began. Cytotoxic effects on osteoblasts were observed only when incubated with NP-SIN concentrations equal to or greater than  $10^{-1}$   $\mu\text{M}$ . No increase in osteoblast concentration was observed at any of the concentrations studied. The mineralization assay suggests that NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ) increases the activity of osteoblasts when compared to controls, not incubated with simvastatin. At the same concentration (NP-SIN  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ), increased protein expression and alkaline phosphatase release (FA) were associated with a significant increase in the expression of the bone morphogenetic protein (BMP-2). An increase ( $p < 0.05$ ) in the immunoblot of BMP-2 and OPG was also observed. There was no significant difference in RANK-L protein expression between the group of osteoblasts incubated with NP-SIN and the controls.

**Conclusions:** These results indicate a potential beneficial effect of the nanoparticles of PDLLA encapsulated with simvastatin no repair of bone defects through the activation of osteoblasts.

**Keywords:** Simvastatin, polymeric nanoparticles, osteoblasts

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Imagem representativa de osteoblastos corados com hematoxilina e eosina (HE)
- Figura 2 Imagem representativa de um osteoblasto em microscopia eletrônica de transmissão
- Figura 3 Via de sinalização para a osteoclastogênese
- Figura 4 Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas
- Figura 5 Intensidade de perfis de distribuição de tamanho de nanoesferas PDLLA encapsulada com sinvastatina
- Figura 6 Representação gráfica dos perfis de liberação cumulativa de sinvastatina encapsulada em nanopartículas
- Figura 7 Internalização de nanopartículas carregadas com sinvastatina em culturas de osteoblastos
- Figura 8 Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade celular pelo teste MTT
- Figura 9 Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na quantificação de células ki67 positivas em 24h(A) e 48h(B).
- Figura 10 Ilustração do efeito das nanopartículas sobre a proliferação dos osteoblastos OFCOL II
- Figura 11 Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por Von Kossa em osteoblastos OFCOL II
- Figura 12 Efeito de nanopartículas carregadas de sinvastatina sobre a concentração protéica de fosfatase alcalina (FAO) em culturas de osteoblastos incubadas durante 48 h.

- Figura 13 Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina sobre a liberação de fosfatase alcalina (FAO) em meio de cultura de osteoblastos incubados durante 3 dias
- Figura 14 Efeito de nanopartículas carregadas de sinvastatina sobre a concentração protéica da proteína morfogenética óssea (BMP-2) (A) e de RANK-L (B) em culturas de osteoblastos incubadas durante 48 h.
- Figura 15 Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imunomarcação de BMP-2.
- Figura 16 Ilustra o do efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcação de BMP-2 nos osteoblastos OFCOL II.
- Figura 17 Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imunomarcação de OPG
- Figura 18 Ilustra o do efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcação de OPG nos osteoblastos OFCOL II
- Figura 19 Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imunomarcação de RANK-L
- Figura 20 Ilustra o do efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcação de RANK-L nos osteoblastos OFCOL II

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
BMP	Proteína morfogenética ossea
CSF-1	Fator estimulador de colônia-1
CTM	Células tronco mesenquimais
DMEM	Meio Dulbecco modificado por Eagle
FAO	Fosfatase alcalina
FAT	Fosfatase alcalina total
FDA	Food and drug administration
H <sup>+</sup> - ATPase	enzima próton adenosina trifosfatase
HE	Hematoxilina e eosina
HMG-CoA	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MIT	Instituto de Tecnologia de Massachusetts
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NP	Nanopartículas
NP-SIN	Nanopartículas carregadas com sinvastatina
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDLLA	Poli(DL-ácido láctico)
PFA	Paraformaldeído
rhBMP-2	Recombinante humana da bmp-2
SFB	Soro fetal bovino
TGF-beta	Fator transformador de crescimento beta
TRAP	Fosfatase ácida resistente a tartarato
UFG	Universidade Federal de Goiás

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Metabolismo ósseo .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Osteoclasto.....</i></b>	<b>16</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Osteoblasto.....</i></b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Sinvastatina .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Sinvastatina e metabolismo ósseo .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4</b>	<b>Nanopartículas poliméricas.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Nanopartículas poliméricas .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio de liberação de nanopartículas .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b>Internalização de nanopartículas carregadas com sinvastatina .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Cultura de osteoblastos OFCOL II .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Grupos experimentais .....</b>	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT) .....</b>	<b>30</b>
<b>4.7</b>	<b>Imunofluorescencia .....</b>	<b>31</b>
<b>4.8</b>	<b>Mineralização .....</b>	<b>31</b>
<b>4.9</b>	<b>Western Blotting .....</b>	<b>32</b>
<b>4.9.1</b>	<b><i>Expressão protéica de BMP-2, Rank-L, OPG, Fosfatase Alcalina</i></b>	<b>32</b>
<b>4.9.1.1</b>	<b><i>Extração de proteínas.....</i></b>	<b>32</b>
<b>4.9.1.2</b>	<b><i>Dosagem de proteína .....</i></b>	<b>33</b>
<b>4.9.1.3</b>	<b><i>Western Blotting .....</i></b>	<b>33</b>
<b>4.10</b>	<b>Dosagem de fosfatase alcalina por Elisa .....</b>	<b>34</b>
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>35</b>

<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise morfológica das nanopartículas por MET.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2</b>	<b>Liberação <i>in vitro</i> da sinvastatina por método de diálise .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3</b>	<b>Análise da internalização celular das nanopartículas carregadas com sinvastatina .....</b>	<b>37</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise do efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e proliferação de osteoblastos OFCOL II.....</b>	<b>38</b>
<b>5.5</b>	<b>Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na ativação de osteoblastos OFCOL II .....</b>	<b>41</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise do efeito de NP-SIN sobre a expressão protéica de BMP-2 e Rank-L .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7</b>	<b>Análise do efeito de NP-SIN sobre a imunomarcação de BMP-2 e Rank-L</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Metabolismo ósseo

O tecido ósseo caracteriza-se como tecido conjuntivo mineralizado que é constituído por quatro tipos de células: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras (DOWNEY; SIEGEL, 2006). As funções do tecido ósseo incluem regulação dos níveis de cálcio no sangue, locomoção, armazenamento de fosfato, suporte e proteção de tecidos moles, incluindo proteção de células da medula óssea (HARADA; RODAN, 2003). Trata-se de um tecido altamente dinâmico, que possui, como uma das principais características, alto grau de remodelamento, o que permite a renovação do esqueleto por meio de reabsorção (remoção do osso antigo) e formação de novo osso (CLARKE, 2008).

Em condições fisiológicas, o tecido ósseo é periodicamente reabsorvido pelos osteoclastos, enquanto novo osso é formado pelos osteoblastos. Há evidências de que os osteócitos, células da linhagem osteoblástica, alojadas em lacunas da matriz óssea, atuam como mecanosensores e orquestradores do processo de remodelação óssea (BONEWALD, 2011; CLARKE, 2008). A capacidade de remodelação confere ao osso, um ótimo potencial de reparação de fraturas, reconstruindo a estrutura original do tecido ósseo perdido. Como estão funcionalmente interligadas, as alterações que ocorrem na remodelação óssea interferem de forma decisiva na qualidade e quantidade do reparo ósseo. (TAKAYNAGI, 2005; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; KEARNS; KHOSLA; KOSTENUIK, 2008).

O remodelamento ósseo, portanto, é o processo metabólico predominante na regulação da estrutura e função do osso durante a vida adulta, com a participação chave de osteoblastos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras, de origem mesodérmica, exercem importante função na formação óssea, considerando sua capacidade de diferenciação em osteoblastos (EVERTS *et al.*, 2002).

A maioria das doenças esqueléticas no adulto deve-se a um excesso na atividade dos osteoclastos, levando a um desequilíbrio no remodelamento ósseo, favorecendo a reabsorção. (BOYLE; LACEY; SIMONET, 2003).

### **1.1.1 Osteoclasto**

O osteoclasto é uma célula móvel, gigante, e multinucleada. Origina-se de precursores mononucleados provenientes da medula óssea que, ao contato com o tecido ósseo, unem-se para formar os osteoclastos multinucleados. O íntimo contato entre os tipos celulares do estroma da medula óssea é essencial para a osteoclastogênese, sugerindo que fatores derivados do estroma estimulem esse processo. Já se sabe que a produção de dois fatores hematopoiéticos é necessária e determinante para a osteoclastogênese: o ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, sigla em inglês) e o fator de crescimento polipeptídico, fator estimulador de colônia-1 (CSF-1, sigla em inglês), além da subsequente ativação de RANK na superfície das células precursoras hematopoiéticas. Juntos, CSF-1 e RANKL induzem a expressão de genes que tipificam a linhagem dos osteoclastos, incluindo aqueles que codificam a fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), a catepsina K, o receptor para calcitonina e a  $\beta$ 3-integrina, levando ao desenvolvimento de osteoclastos maduros (LACEY, 1998). O corpo celular do osteoclasto é polarizado e, em resposta à ativação de RANK pelo seu ligante RANKL, sofre mudanças estruturais internas que o preparam para reabsorver o osso. Após aderir à matriz óssea, os osteoclastos geram um ambiente ácido necessário para a reabsorção óssea. Primeiro, ocorre a dissolução dos componentes inorgânicos do osso (desmineralização) mediada pela enzima próton adenosina trifosfatase ( $H^+$  - ATPase) (CHARLES & ALIPRANTIS, 2013) seguida da degradação enzimática do componente orgânico pela protease lisossomal catepsina K (CURREY, 1984). O processo de reabsorção óssea também envolve a participação da citonina antagonista osteoprotegerina (OPG), conhecida como fator inibidor dos osteoclastos, membro da família dos receptores de TNF. A OPG é produzida e liberada por osteoblastos ativados e possui um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, já que inibe a maturação e ativação de osteoclastos. A OPG liga-se com alta afinidade ao RANK-L nos osteoblastos, impedindo que este, por sua vez, se ligue ao RANK na superfície dos osteoclastos. O sistema RANK/RANKL/OPG representa uma importante descoberta para o entendimento da biologia óssea, sugerindo a interação entre osteoblastos e osteoclastos.



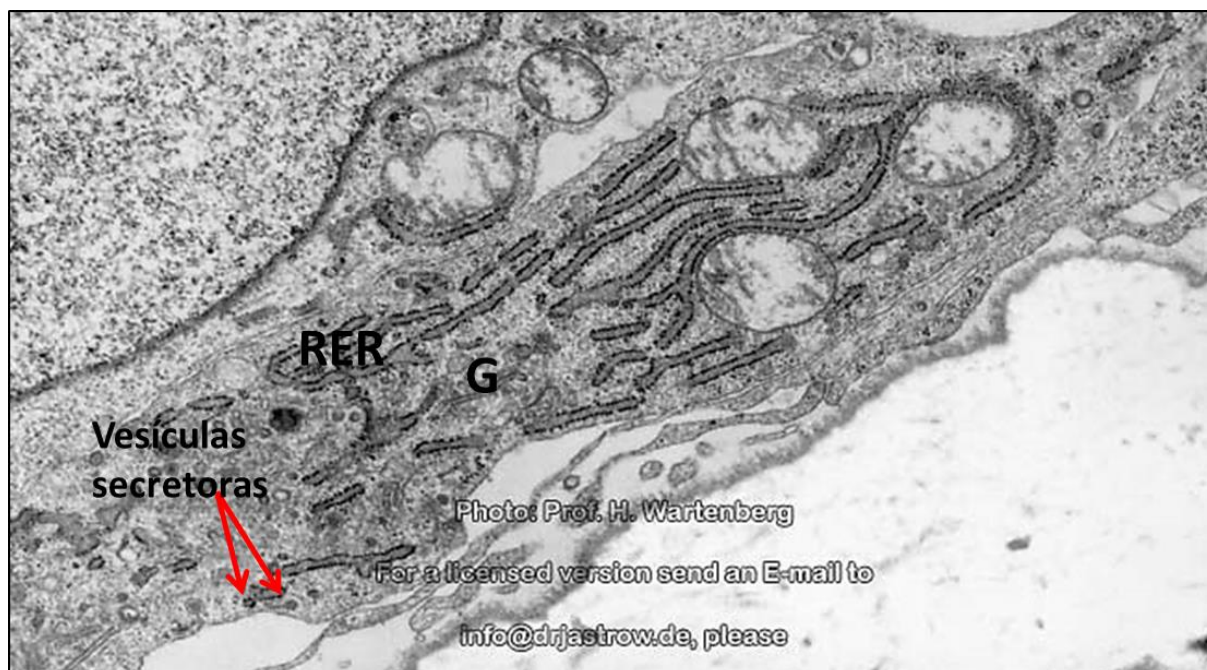
### 1.1.2. Osteoblasto

Os osteoblastos são derivados de células osteoprogenitoras responsivas a estímulos moleculares que as diferenciam em células formadoras de osso. As células osteoprogenitoras, originam-se de células tronco mesenquimais (CTM) com potencial de se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos e células musculares. A diferenciação da CTM na linhagem de células osteoprogenitoras é controlada pela sinalização das vias Wnt/ e o fator transformador de crescimento beta (TGF-beta), associado à Proteína Morfogenética Óssea (BMP). (JENSEN; GOPALAKRISNAN; WESTENDORF, 2010; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Os osteoblastos são células cuboides que estão localizadas ao longo da superfície óssea compreendendo de 4 a 6% do total de células residentes do tecido ósseo (Figura 1). Essas células apresentam características morfológicas de células sintetizadoras de proteínas, incluindo abundante retículo endoplasmático rugoso e proeminente complexo de Golgi, bem como diversas vesículas secretoras. (Figura 2) (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).



**Figura 1:** Imagem representativa de osteoblastos corados com hematoxilina e eosina (HE): microscopia óptica, com aumento de 40x, mostra a estrutura cuboide do osteoblasto. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/lamosso3.html>



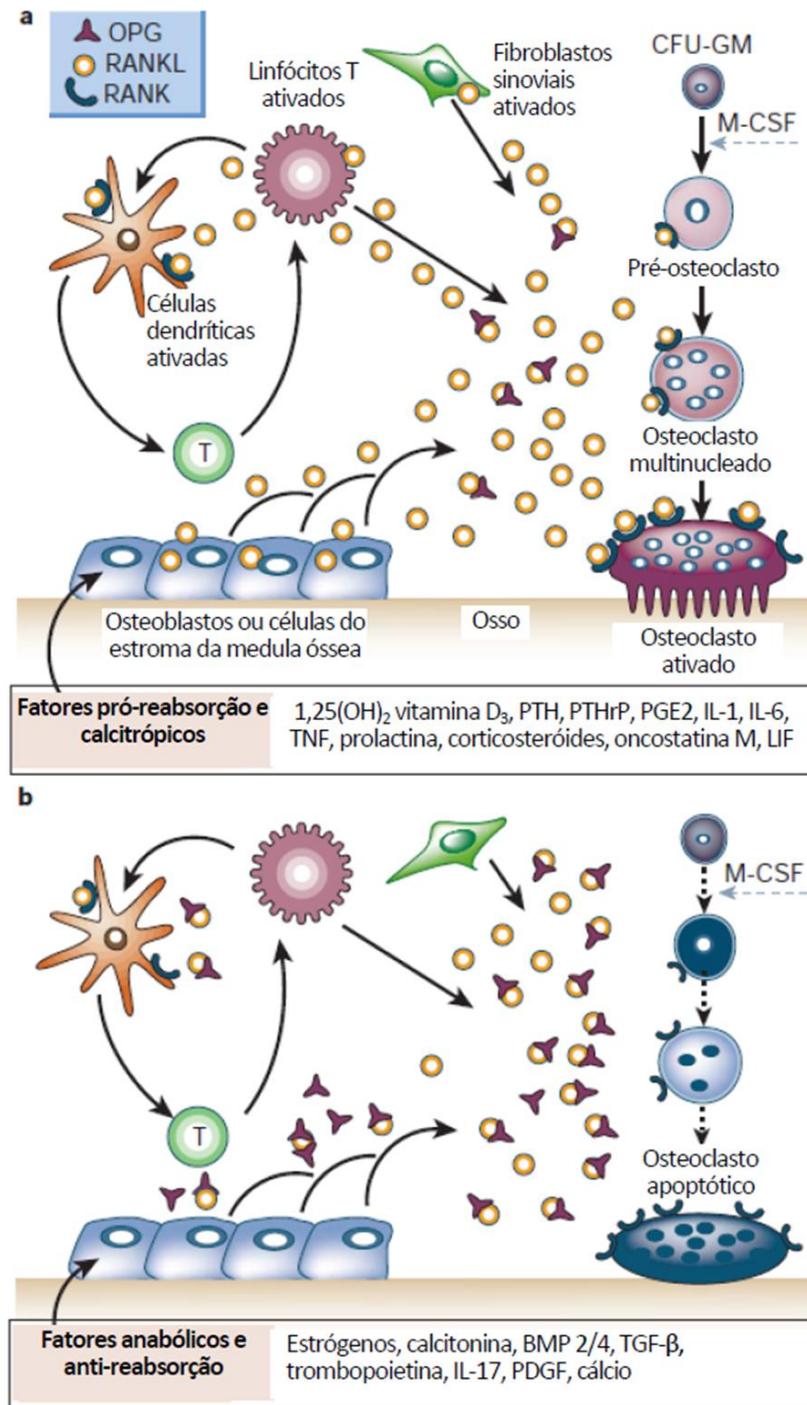
**Figura 2: Imagem representativa de um osteoblasto em microscopia eletrônica de transmissão.** Estão representadas as diversas organelas presentes como vesículas secretoras (seta vermelha), retículo endoplasmático rugoso (RER) e complexo de Golgi (G). Disponível em: <<https://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/externes/Wartenberg/Osteoblast3.jpg>>

A principal função dos osteoblastos é a formação e mineralização de matriz óssea ou osteóide. A síntese dessa matriz pelos osteoblastos ocorre por meio de duas etapas: deposição de matriz orgânica e sua subsequente mineralização. Na primeira etapa, os osteoblastos secretam colágeno, principalmente do tipo I, osteocalcina, osteonectina, osteoprotegerina, e proteoglicanos ósseos, que, em conjunto, formam a matriz orgânica. Posteriormente, a mineralização ocorre primeiramente na fase vesicular e em seguida na fase fibrilar (ANDERSON, 2003; YOSHIKO *et al.*, 2007). A fase vesicular ocorre quando porções com diâmetro variável (30 a 200 nm), denominadas de vesículas da matriz, são liberadas da membrana apical dos osteoblastos para a matriz óssea formada, onde elas se ligam a proteoglicanos e outros compostos orgânicos. Devido a sua carga negativa, os proteoglicanos sulfatados mobilizam íons cálcio que são estocados dentro das vesículas da matriz (YOSHIKO *et al.*, 2007). Por outro lado, compostos contendo fosfato são degradados pela fosfatase alcalina (FAO) secretada pelos osteoblastos, liberando íons fosfato dentro das vesículas. Os íons fosfato e cálcio se agregam no centro das vesículas, formando os cristais de hidroxiapatita. A fase fibrilar ocorre quando a supersaturação de íons cálcio e fosfato no interior das vesículas levam ao rompimento dessas estruturas e os cristais de hidroxiapatita se espalham em torno

da matriz circundante (BOIVIN; MEUNIER, 2002; BOIVIN *et al.*, 2008), rica em colágeno tipo I.

Outras proteínas sinalizadoras como a osteoprotegerina (OPG), o RANKL e o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) são minoritárias no tecido ósseo, no entanto desempenham papéis fundamentais nos processos de remodelamento. Todos estes fatores, secretados por osteoblastos, regulam a diferenciação e ativação de osteoclastos. O M-CSF é indispensável para a sobrevivência e proliferação dos precursores de osteoclastos.

O sistema RANK/RANK-L/OPG, como mencionado anteriormente, desempenha um papel chave na sinalização da osteoclastogênese e da remodelação óssea, (BAUD'HUIN *et al.*, 2007; BOYCE; XING, 2008). Pesquisas demonstraram que este sistema é capaz de interagir com diversas vias de sinalização e está envolvido na regulação do sistema osteoarticular (SINGH *et al.*, 2012, BAUD'HUIN *et al.*, 2007; BOYCE; XING, 2008) (Figura 3).



**Figura 3: Via de sinalização para a osteoclastogênese.** A expressão de RANKL é induzida em osteoblastos, células T ativadas, fibroblastos sinoviais e células do estroma da medula óssea; RANKL se liga ao seu receptor de membrana específico, ativa uma rede de cascatas de quinases mediadas por TRAF, que promovem diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Por outro lado, a expressão de OPG é induzida por fatores que bloqueiam o catabolismo ósseo e promovem efeito anabólico. OPG se liga e neutraliza RANKL, levando a um bloqueio na osteoclastogênese e a um decréscimo na sobrevivência de osteoclastos. CFU-GM – unidade formadora de colônia de granulócito/macrófago, M-CSF – fator estimulador de colônia de macrófago, PTH – paratormônio, PTHrP – proteína relacionada ao paratormônio, PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>, LIF – fator inibidor da leucemia, BMP – proteína morfogenética do osso, TGF-β – fator de crescimento tumoral β, PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas. Adaptado de BOYLE, SIMONET e LACEY (2003)

Além da importante participação dos osteoblastos na via RANK/RANK-L/OPG, essas células estão envolvidas na síntese de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que regulam a mitose e diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras, desempenhando, portanto, papel essencial no processo de remodelação óssea (RAUCH *et al.*, 2000; REDDI 1997; SPECTOR *et al.*, 2001). Essas proteínas, integrantes da superfamília do TGF- $\beta$ , são capazes, ainda, de estimular a atividade de osteoblastos (BOSEMARK *et al.*, 2013; KINGSLEY, 1994). Estudos clínicos, em animais e *in vitro*, indicam que a BMP-2 e a BMP-7 são capazes de estimular a regeneração óssea, promover o preenchimento de defeitos ósseos, participar da regulação do crescimento esquelético normal e da remodelação óssea em doenças metabólicas e acelerar a osseointegração e a formação óssea ao redor de implantes. (URIST MR, 1994)

## 1.2 Sinvastatina

A sinvastatina é parte do grupo das estatinas, substâncias que inibem de forma competitiva a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, bloqueando a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo a etapa inicial e limitante da biossíntese de colesterol (GRUNDY, 1988; SINENSKY *et al.*, 1990). As estatinas exercem seu efeito principal graças a uma porção semelhante ao ácido mevalônico, competindo com a enzima HMG-CoA redutase. (SINENSKY *et al.*, 1990).

A HMG-CoA redutase é encontrada principalmente em hepatócitos. Além do tecido hepático, outros tecidos ou órgãos periféricos como adrenais, gônadas, coração, vasos sanguíneos, cérebro e mama também contém essa enzima (GIBBONS *et al.*, 1983; BORGQUIST *et al.*, 2008; EISA-BEYGI *et al.*, 2014).

As estatinas podem ser agrupadas como drogas lipofílicas, representadas pela sinvastatina, mevastatina, lovastatina, fluvastatina, atorvastatina e pitavastatina, ou hidrofílicas, incluindo a rosuvastatina e a pravastatina (JAKOBISIAK; GOLAB, 2010). A mevastatina e a lovastatina são compostos naturais (derivados de fungos), a sinvastatina e pravastatina são moléculas semisintéticas, ao passo que as demais, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina, e pitavastatina, são sintéticas (CHAN *et al.*, 2003; SCHACHTER, 2005)

As estatinas emergiram para prevenção de doenças cardiovasculares após demonstrarem efetiva redução da morbidade de doença coronariana. Isso explica o grande sucesso médico e comercial dessas drogas (BARRIOS-GONZALEZ; MIRANDA, 2010). Apesar de serem amplamente prescritas e muito eficientes no tratamento de hiperlipidemias, as estatinas apresentam diversos efeitos colaterais como miopatias, cefaléia, flatulência, dispepsia, prurido e exantema cutâneo. Por isso, os níveis de estatinas no organismo do paciente devem ser monitorados com exames periódicos a fim de se evitar os efeitos colaterais e buscar sempre administrar a dose terapêutica mais apropriada para o paciente (SHITARA; SUGYIAMA, 2006).

Além de reduzir a morbidade / mortalidade cardiovascular, principalmente pelo efeito hipocolesterolêmico, as estatinas também têm efeitos benéficos sobre o tecido ósseo, tendo sido utilizadas para o tratamento da osteoporose (CHAN *et al.*, 2000; YATURU 2003). Estudos observacionais têm demonstrado que uso crônico das estatinas não apenas minimizam o risco de fratura óssea, mas também aumentam a densidade mineral óssea e a atividade osteoblástica (MARITZ *et al.*, 2001)

### **1.3 Sinvastatina e metabolismo ósseo**

Os primeiros estudos referentes ao uso da sinvastatina e sua ação benéfica no tecido ósseo foram realizados por Mundy e colaboradores (1999). Nesse estudo de referência, os autores mostraram que as estatinas aumentaram a expressão do RNAm para BMP-2 em culturas de células ósseas humanas e de camundongos, além de promover a formação óssea em calvárias murinas mantidas em cultura de órgão, sugerindo fortemente que essas drogas poderiam ter um efeito benéfico no reparo ósseo. Adicionalmente, esses autores demonstraram que a sinvastatina e a lovastatina aumentam a formação óssea, quando injetadas subcutaneamente no tecido conjuntivo em torno da calvária de camundongos, e também quando administradas por via oral em ratas ooforectomizadas osteopênicas, resultando em acréscimo no volume ósseo trabecular.

Ayukawa e colaboradores (2009) observaram que a administração local de sinvastatina promoveu maior formação óssea, com um aumento significativo na expressão gênica da fosfatase alcalina e BMP-2, além de diminuição na expressão

de catepsina K, um marcador da atividade de osteoclastos, e RANK-L em defeitos ósseos criados cirurgicamente em tibia de ratos. Corroborando com esses resultados, foi relatado na literatura que a aplicação local de sinvastatina, em defeitos ósseos criados em calvária de ratos, aumentou a formação óssea em 51,8% (semana 6) e 64,8% (semana 12) em comparação com grupos controle, tratados sem sinvastatina. Esse resultado sugeriu que o uso local da sinvastatina promove a cicatrização do defeito formado através do aumento da expressão de BMP-2, levando ao recrutamento de células mesenquimais osteogênicas, angiogênicas e diferenciação em osteoblastos (YUEYI *et al.*, 2013).

A sinvastatina requer um meio adequado para controlar a sua liberação local, estimulando a formação óssea. Alguns estudos testaram o efeito da aplicação local de sinvastatina associada a diferentes carreadores, como a gelatina (OZEC, *et al.*, 2008), ácido poliláctico coglicólico (WU, *et al.*, 2008), nanopartículas adicionadas ao PLGA (HO, *et al.*, 2011), sulfato de cálcio (NYAN, *et al.*, 2007) e beta tricálcio fosfato (NYAN, *et al.*, 2009), e têm demonstrado aumento na formação óssea (PARK, 2009). Não se encontra na literatura, no entanto, um consenso de qual carreador é o ideal para a sinvastatina nos defeitos ósseos e mais estudos são necessários.

Uma das limitações à aplicação clínica de sinvastatina para a regeneração óssea é definir a concentração mais adequada para cada meio de liberação. Baixas doses não apresentam impacto significativo na formação óssea, enquanto que altas dosagens estão associadas a uma citotoxicidade e estímulo de processo inflamatório, atrasando o reparo. Uma inflamação significativa do tecido mole foi observada quando administrada localmente 2,2mg de sinvastatina, associada a gel de metilcelulose, em defeitos de mandíbula de ratas, prejudicando o reparo ósseo, enquanto a dose de 1,1 mg não conseguiu estimular a formação óssea (STEIN, *et al.*, 2005). Já Nyan e colaboradores (2009), utilizando a mesma quantidade de sinvastatina combinada com beta tricálcio fosfato, em um modelo de defeito de calvária de ratos, reportaram maior formação de tecido ósseo, apresentando resultados melhores do que os observados com as dosagens de 0,25 e 0,5 mg de sinvastatina. Quando utilizadas concentrações superiores a 2,2 mg houve exacerbação do processo inflamatório e inibição da formação óssea. Para Lima e colaboradores (2011), a quantidade e duração da liberação de sinvastatina

por um carreador também tem papel importante na concentração local e na efetividade da sinvastatina.

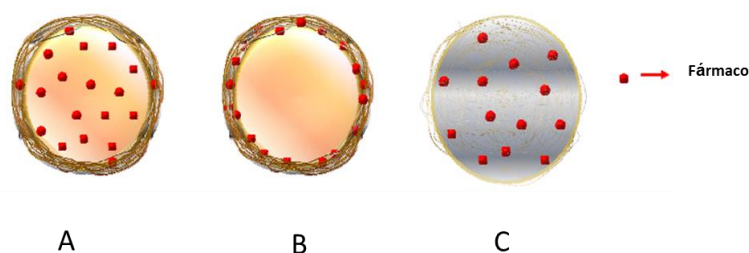
Estudo do nosso grupo mostrou efeitos positivos da administração oral de sinvastatina na redução da perda óssea associada à doença periodontal em ratos wistar. Os dados sugerem que a menor perda óssea, observada no grupo tratado com sinvastatina, está relacionada com uma diminuição significativa da inflamação e estresse oxidativo. O uso de sinvastatina aumentou os níveis de BMP-2 e osteoprotegerina, e diminuiu os de RANK-L (DALCICO *et al.*, 2013)

Dando continuidade aos estudos do grupo relacionados ao efeito osteogênico da sinvastatina, o presente trabalho investigou a ação direta de nanopartículas de poli(DL-ácido láctico) PDLLA carregadas com sinvastatina em osteoblastos murinos através de ensaios *in vitro*. Estes ensaios permitem avaliar, de forma rápida e quantitativa, várias concentrações de fármacos e definir toxicidade das formulações como uma forma de triagem no processo de avaliação de risco, podendo levar a redução do número de animais em futuro estudo *in vivo*. Estes ensaios permitem avaliar mecanismos básicos da célula e validar o método alternativo, *in vitro*, como relevante, para então, serem seguidos testes *in vivo*. (BALLS, M; 1995; BRUNER, L.H. *et al* 1996).

#### 1.4 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas (NP) foram desenvolvidas na década de 1970, sendo inicialmente utilizadas como carreadores de fármacos anti-neoplásicos e vacinas (KUMAR, 2000). O termo nanopartículas, neste caso, pode ser usado para designar nanocápsulas ou nanoesferas. As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso circundado por uma membrana polimérica. O fármaco pode estar dissolvido no núcleo oleoso ou adsorvido ao invólucro polimérico. As nanoesferas, por outro lado, não apresentam óleo em sua constituição, sendo formadas por uma densa rede polimérica na qual o fármaco pode estar retido ou adsorvido, (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; DU TOIT *et al.*, 2011), conforme ilustrado na figura 4. O presente trabalho utilizou nanoesferas para carrear sinvastatina, objetivando a liberação lenta do fármaco.





**Figura 4: Representação esquemática de nanocápsulas (A e B) e nanoesferas (C).** As nanocápsulas são: formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso (A e B). O fármaco pode estar dissolvido no núcleo (A) ou adsorvido à parede polimérica (B). As nanoesferas (C) são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode estar retido ou adsorvido. Fonte: adaptado Oliveira e colaboradores (2012)

A nanotecnologia trabalha na caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas, em escala nanométrica (10-1000 nm) (SAHOO *et al.*, 2007), com intuito de serem utilizados como ferramentas de diagnóstico e terapêutica. O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas na escala macro (CHAU *et al.*, 2007). Como consequência da diminuição do tamanho médio das partículas dos materiais, ocorre um aumento da área superficial em relação ao volume, o que resulta no aumento da solubilidade e da dissolução de moléculas insolúveis ou pouco solúveis, e, conseqüentemente, aumento da biodisponibilidade do fármaco (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2008)

Nos últimos anos, polímeros biodegradáveis tais como poli (ácido glicólico), poli(L-ácido láctico) e copolímeros como poli (ácido L-láctico-co-glicólico) tem sido pesquisados para aplicações cirúrgicas, associado a placas e parafusos de fixação, membranas, esponjas e microesferas (AGRAWAL; RAY,2001; BARBER;DOCKERY; COWDEN, 2013; TAKALE *et al.*, 2014). O Copolímero PDLLA, utilizado nesse estudo, pertence à família dos polímeros alifáticos da classe dos poli (alfa hidrociácidos) (SARAVIN, *et al* 2008). O PDLLA foi aprovado como biomaterial pela FDA (Food and drug administration) e trata-se de um polímero racêmico que não mostra atividade óptica. Esse copolímero tem sido pesquisado para uso em arcabouço celular devido a sua biocompatibilidade (ALVES *et al.*, 2008; YUNOS *et*

*al.*, 2013), apresentando ainda, bons resultados como arcabouço para regeneração de osso e cartilagem (WU *et al.*, 2008; YUNOS *et al.*, 2013).

## 2 RELEVANCIA E JUSTIFICATIVA

Considerando o grande número de trabalhos na literatura, incluindo estudos realizados por nosso grupo, demonstrando efeitos benéficos da sinvastatina na prevenção da perda óssea inflamatória e no reparo ósseo, propomos no presente trabalho, o desenvolvimento de uma nanopartícula polimérica carregada com sinvastatina para o reparo de defeitos ósseos. A motivação maior deste estudo foi viabilizar a liberação local, controlada e duradoura de sinvastatina, aumentando a oferta do fármaco no local de interesse e evitando os efeitos adversos indesejados.

Fundamentado na importância indiscutível dos osteoblastos no reparo ósseo, o presente estudo investiga, *in vitro*, o efeito desta nanopartícula na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos murinos. Os resultados obtidos nos permitiram avaliar vários aspectos da nanopartícula, como toxicidade e padrão de liberação de sinvastatina, informações essenciais para a determinação de concentrações viáveis para futuros estudos *in vivo*. Além disso, outro aspecto relevante do presente estudo envolve a investigação do efeito direto de sinvastatina na proliferação e ativação de osteoblastos, avaliando os possíveis mecanismos envolvidos.

Os resultados gerados neste trabalho sugerem fortemente que a associação desta nanopartícula a um arcabouço biodegradável, como as esponjas de colágeno desenvolvidas e caracterizadas por nosso grupo de pesquisa, represente um potencial terapêutico importante para o reparo de defeitos ósseos críticos. Esta será a próxima etapa na continuação deste estudo, objetivando contribuir substancialmente com o desenvolvimento de novos biomateriais para reparo ósseo e conhecimento científico de qualidade em um tema relevante para a saúde pública.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar o comportamento de nanopartículas carregadas com sinvastatina e seu efeito na proliferação e ativação de osteoblastos murinos cultivados in vitro e os possíveis mecanismos celulares envolvidos.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

1. Caracterizar o tamanho e estabilidade das nanopartículas carregadas com sinvastatina e investigar se são internalizadas por osteoblastos murinos em cultura;
2. Investigar o efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e proliferação de osteoblastos murinos com através do ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e imunomarcacão para ki-67;
3. Avaliar o efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na ativação de osteoblastos a partir de ensaio de mineralização e da expressão e liberaçao de fosfatase alcalina através de Western Blot e Elisa;
4. Avaliar o efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina no metabolismo de osteoblastos, através da investigação da expressao proteica de BMP-2, osteoprotegerina (OPG) e RANK-L através de Western blot e imunofluorescência.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Nanopartículas poliméricas

As Nanopartículas de poli(D,L-láctico) com terminação ácida (PDLLA) foram obtidas através de uma colaboração do nosso grupo com a Universidade Federal de Goiás (UFG) e o Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT). O preparo se deu a partir da técnica de deslocamento de solvente, utilizando uma fase aquosa e uma fase orgânica composta de 5,0 mg de sinvastatina e 50 mg de PDLLA dissolvido em 6,0 ml de acetonitrilo à temperatura ambiente (25 °C).

### 4.2 Ensaio de liberação de sinvastatina

O ensaio de liberação *in vitro* da sinvastatina foi feito através do método de diálise, utilizando o tubo PlusOne® (GE Healthcare Bio Sciences, Pittsburgh, PA, EUA) e uma membrana de 1.000Da que permite a passagem de sinvastatina (418,57 Da). Para este ensaio, foi colocado nos tubos de diálise 1 mL de uma formulação de nanopartículas de 1000 µg / mL, uma solução de sinvastatina preparada em 0,5% de dodecilsulfato de sódio (meio de liberação) e 5% de etanol na mesma concentração de nanoesferas. A solubilidade da sinvastatina nos meios de liberação é de 500 µg / mL. O tubo de diálise foi selado e imerso em 15 mL de meio receptor, sendo continuamente agitado a 300 rpm utilizando uma barra de agitação magnética a  $25 \pm 1$  ° C durante 6 dias.

A liberação de sinvastatina foi avaliada por amostragem intermitente do conteúdo (1 mL) do meio receptor a intervalos em tempo pré-definidos (0, 1, 2, 3, 18, 24, 48, 96, 120 e 144 horas).(figura 6)

Para manter condições de afundamento, a substituição do meio receptor (1 mL) ocorreu imediatamente após cada amostragem. O ensaio foi realizado em triplicata para a formulação de nanopartículas de sinvastatina (NP-SIN) e para a solução de sinvastatina não encapsulada.

### 4.3 Internalização de nanopartículas carregadas com sinvastatina

Para investigar se as nanopartículas carregadas com sinvastatina (NP-SIN) eram capazes de atingir o meio intracelular em um modelo de cultura de

osteoblastos, foi utilizada rodamina como um marcador fluorescente na formulação das nanopartículas. A marcação com imunofluorescência e a microscopia de fluorescência foram utilizadas para investigar, além da localização, a distribuição das nanopartículas no citoplasma celular. Para tanto, as células OFCOL II foram plaqueadas em meio completo com concentração de  $1,5 \times 10^5$  células por placa, foram deixadas aderir ao substrato de base em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% e temperatura de 37 °C. Depois desse período, as células foram incubadas com formulação de NP fluorescente durante 3 horas. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos à temperatura ambiente com agitação suave e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 3 vezes por 5 minutos cada. As imagens do núcleo e do citoesqueleto foram sobrepostas para aumentar o contraste da localização intracelular. Para isso, realizou-se a coloração nuclear utilizando DAPI (0,2 µg / mL) e os microtúbulos foram marcados com anticorpo monoclonal anti-alfa-tubulina (anticorpo monoclonal anti-alfa-tubulina (MOUSE IGg) e anticorpo secundário anti-rato (Alexa Fluor 488 - Invitrogen). As amostras foram lavadas em PBS durante 30 min e depois imagens da internalização foram registradas utilizando um microscópio de fluorescência (LEICA DMI4000B) com uma lente objectiva 20x.

#### **4.4 Cultura de osteoblastos OFCOL II**

Foram utilizados osteoblastos murinos (OFCOL II) adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, mantidos em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo 10 % de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37°C em estufa umidificada, incubada em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Neste estudo, as células foram utilizadas nas passagens de 16-30. As células foram mantidas, como estoque, em nitrogênio líquido. Partindo deste, foi preparada uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>3</sup>, contendo 1ml de cultura de células, adicionando-se 2 ml de meio de cultura, DMEM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação da confluência em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100).

Estas células foram subcultivadas após tripsinização quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2 ml de tripsina as células foram retiradas, adicionando-se 6 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jato forte com o auxílio de pipetador automático. Em seguida as células foram transferidas para um falcon de 15 ml, centrifugadas a 2000rpm, 4°C por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas com adição de 4 ml de meio completo. Deste volume foram retiradas alíquotas de, no mínimo, 1 ml e passadas para novas garrafas. O volume final da garrafa foi de 3 ml de meio suplementado com 10% SFB e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As trocas de meio foram realizadas a cada 48h.

#### **4.5 Grupos experimentais:**

- Grupo controle: Os osteoblastos recebiam apenas o meio de cultura completo
- Grupo nanopartícula (NP): Os osteoblastos recebiam a formulação de nanopartículas sem adição de sinvastatina
- Grupo nanopartículas carregadas com sinvastatina (NP-SIN): Os osteoblastos recebiam a formulação de nanopartículas carregadas com sinvastatina nas seguintes concentrações: 10<sup>-5</sup> μM, 10<sup>-4</sup> μM, 10<sup>-3</sup> μM, 10<sup>-2</sup> μM, 10<sup>-1</sup> μM, 1 μM, 10 μM e 10<sup>2</sup> μM.

#### **4.6 Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT)**

Para avaliação da viabilidade celular foi feito o ensaio de MTT que quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazan, produto formado pela redução de tetrazolium MTT. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase, fornecendo uma medida da função mitocondrial (LOBNER, 2000). Para a realização dos testes foram usadas placas de cultura de 96 poços e avaliados períodos de 24h a 7 dias. O número de células usado para cada período variou de 500 a 5000 células, previamente testado de modo que fosse possível obter uma confluência adequada. Para realização do teste de viabilidade com MTT as células foram plaqueadas e incubadas após 24h com a droga a ser testada.

A leitura das amostras foi feita após 24h em espectrofotômetro (Biotek) com comprimento de onda ajustado para 570 nm. Os resultados expressam a porcentagem média de células viáveis. O valor da média da densidade óptica do grupo controle foi considerado 100% e os resultados dos grupos experimentais foram comparados a este valor. Os gráficos foram obtidos utilizando o programa GrafPadPrism™5

#### **4.7 Imunofluorescência**

Os osteoblastos foram cultivados na concentração de  $9 \times 10^3$  células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura DMEM à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO<sub>2</sub>. Lamínulas de 13 mm serviram como superfície para fixação de células, colocadas previamente na placa de cultura.

O meio de cultura foi removido após 24h da semeadura das células que foram incubadas com nanopartículas carregadas com sinvastatina de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%); nanopartículas sem sinvastatina; nanopartículas com sinvastatina na concentração de  $10^{-2}$  e  $10^{-1}$  uM. Durante os períodos de 24h e 48h as células ficaram em contato com o fármaco.

Após este período de exposição, o meio foi removido e as células fixadas com 500 µL de paraformaldeído (PFA) 4% por poço durante 30 minutos. Em seguida, foi utilizada 500µL solução de bloqueio por 1h, seguida da incubação com o anticorpo primário diluído mantido por um período de overnight em refrigeração. Terminado este período, foi adicionado 100 µL do anticorpo secundário diluído em solução de lavagem por 1h. Para concluir o ensaio o núcleo das células foi corado com DAPI (1:2000) diluído em PBS 1x por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. Os preparados foram observados em um microscópio confocal, usando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com a câmara integrada e processador de imagem, usando uma objetiva de 20x. A análise quantitativa foi feita através de mensuração dos pixels de cada imagem obtida. Pelo menos 10 campos de cada lâmina, sendo um total de 4 lâminas por grupo no Photoshop.

#### **4.8 Mineralização pelo método de Von Kossa**



Com o intuito de investigar o efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na ativação dos osteoblastos, observou-se a formação de nódulos mineralizados através do ensaio de Von Kossa. Para tal, os grupos estudados foram semeados em quadruplicata em placas de 12 poços, a uma concentração de  $10^3$  células/poço, mantidos em meio de cultura padrão. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelo meio contendo nanopartículas carregadas com sinvastatina de acordo com os grupos já mencionados. Controle( DMEM + SBF 10%); nanopartículas sem sinvastatina; nanopartículas com sinvastatina na concentração de  $10^{-2}$  e  $10^{-1}$  uM. O período de incubação do fármaco foi de 21 dias. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1 mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1 mL de solução de 5% de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi colocado em cada poço e as células foram incubadas no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse. As análises foram feitas a partir de fotografias utilizando o microscópio invertido no aumento de 40x.

## **4.9 Western Blotting**

### ***4.9.1 Expressão protéica de BMP-2, Rank-L, OPG, Fosfatase Alcalina***

Para avaliar a expressão protéica de BMP-2, Rank-L, OPG, Fosfatase Alcalina nas células ósseas, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

#### ***4.9.1.1 Extração de proteínas***

As células foram cultivadas da concentração de  $6 \times 10^4$  células/poço em placas de 6 poços com meio de cultura completo à temperatura de 37 °C e na concentração de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 48h de semeadura, o meio foi trocado e as

células incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%); nanopartículas sem sinvastatina; nanopartículas com sinvastatina na concentração de  $10^{-2}$ . O período de incubação do fármaco foi de 48h. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente.

Colocou-se 100ml de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA) em cada poço da placa. Em seguida, com um raspador de células, as amostras foram removidas e colocadas em microtubos devidamente identificadas, vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

#### 4.9.1.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*Thermo Scientific*, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para a cuprosa ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

#### 4.9.1.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3%

glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e  $\beta$ -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (S100 $\beta$ , NF $\kappa$ B p65, RAGE e  $\beta$ -actina) ou 8% (iNOS e  $\beta$ -actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-S100 $\beta$  (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-7851, 1:100), anti-RAGE (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-5563, 1:100), anti-iNOS (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8310, 1:100), anti-NF $\kappa$ B p65 (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-372, 1:200) ou anti- $\beta$ -actina (Millipore, EP1123Y, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

#### 4.10 Dosagem de fosfatase alcalina (FAO)

A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade dos osteoblastos. Para avaliação deste parâmetro, amostras de meio completo foram coletadas das placas de cultura de 96 poços após 3 e 5 dias de exposição a nanopartículas carregadas com sinvastatina. Após a coleta, foi realizada a dosagem de fosfatase alcalina total (FAT), utilizando “Kit” específico, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Posteriormente, uma amostra do material foi aquecida para obtenção da atividade da fosfatase alcalina óssea (FAO). O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975)

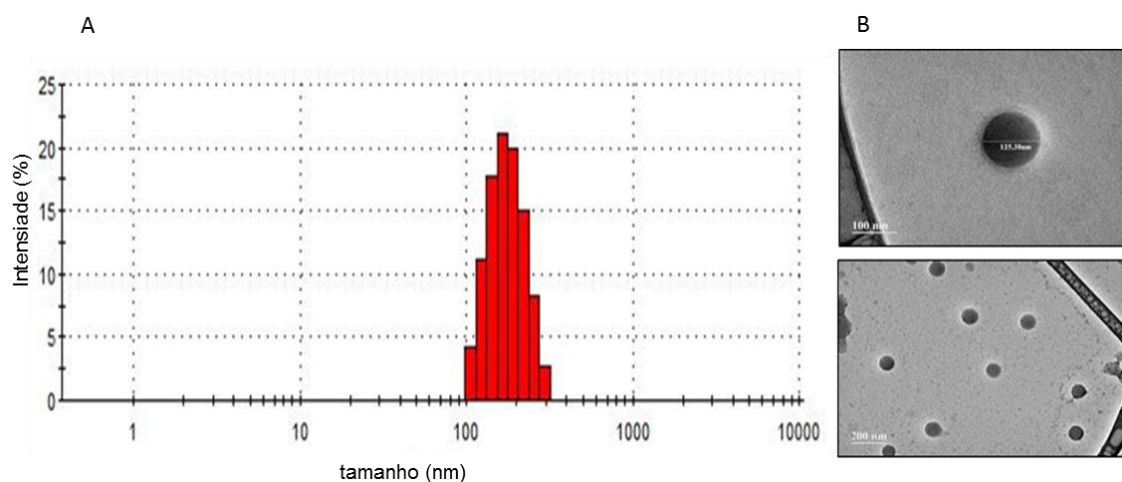
#### 4.11 Análise estatística

Foi empregada a análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias obtidas. Os valores foram expressos como Média ± Desvio Padrão. Foi considerado o nível de significância para  $p < 0,05$ . As análises foram executadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 (Graph-Pad Software, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise morfológica das nanopartículas por MET

Como é possível observar na figura 5, as nanopartículas de PDLLA apresentavam um diâmetro médio de 125,38nm, distribuição uniforme e morfologia esférica.

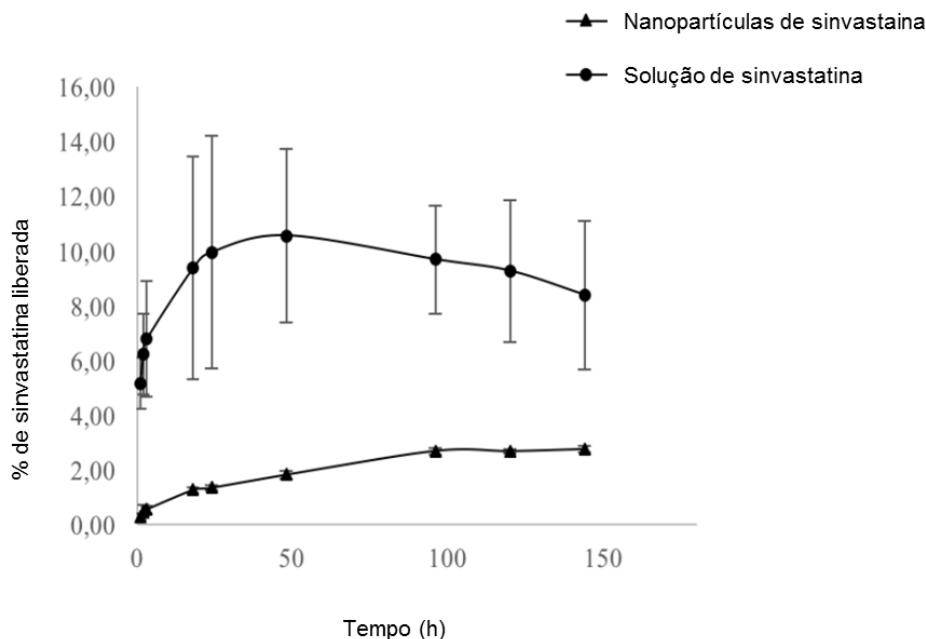


**Figura 5: Representação da intensidade dos perfis de distribuição de tamanho das nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina. O diâmetro médio foi de  $141,67 \pm 5,18$  nm (A) e micrografia MET após coloração negativa com acetato de uranilo (B).**

### 5.2 Liberação *in vitro* da sinvastatina por método de diálise

Os perfis cumulativos de liberação de sinvastatina a partir da formulação de nanopartículas e de solução de sinvastatina foram medidos nas mesmas condições, sendo a liberação de sinvastatina encapsulada mais lenta e uniforme (triângulo) que a liberação da sinvastatina não encapsulada (círculo) (Figura 6). Esse ensaio é uma representação *in vitro* do perfil de liberação da droga, encapsulada e não encapsulada e não reflete o comportamento das mesmas em cultura ou *in vivo*, uma vez que neste ensaio o suprimento da droga se deu por 6 dias. Em cultura de células ou *in vivo* a droga é disponibilizada apenas uma vez. Assim, a solução de sinvastatina, devido à imediata biodisponibilidade será rapidamente metabolizada. Já a sinvastatina encapsulada será liberada gradativamente mantendo níveis de

concentração adequados por um período prolongado e sendo metabolizada a medida em é disponibilizada pelas nanopartículas.

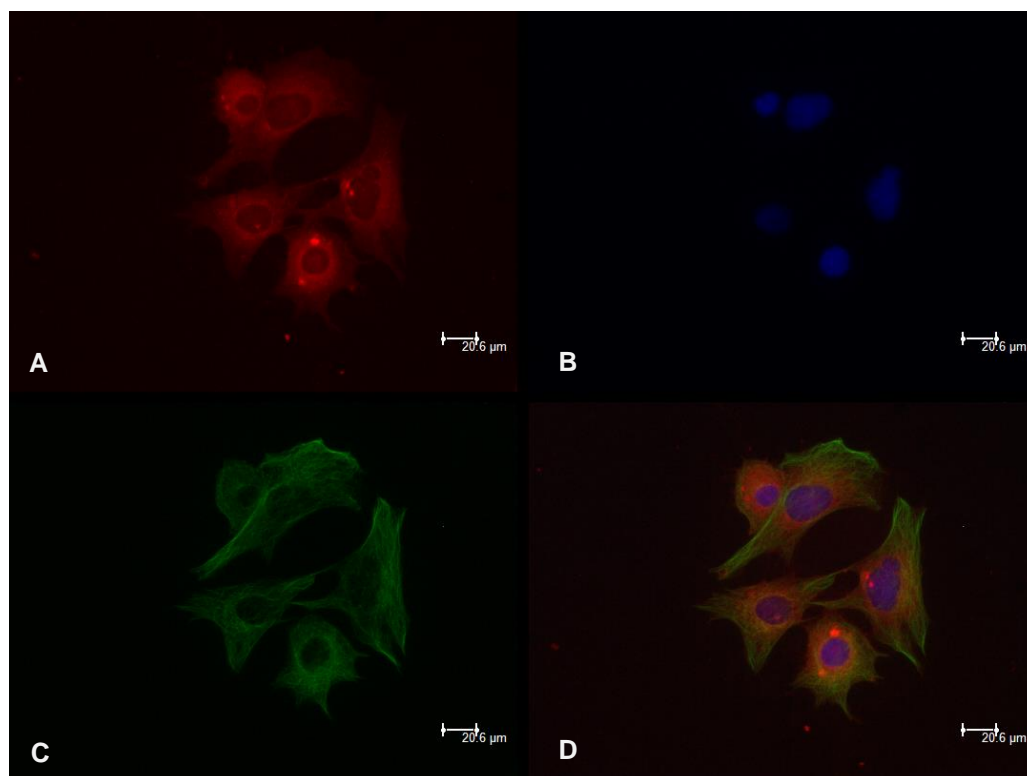


**Figura 6: Representação gráfica dos perfis de liberação cumulativa de sinvastatina encapsulada em nanopartículas.** As nanopartículas estão representadas como triângulo e a solução de sinvastatina, círculo. Tamanho da amostra  $n = 3$ . Valores expressos como média  $\pm$  DP. O eixo Y representa a porcentagem de sinvastatina liberada e o eixo X representa o tempo em horas.

### 5.3 Análise da internalização celular das nanopartículas carregadas com sinvastatina

A fluorescência das NP foi conseguida a partir do encapsulamento de Rodamina (Vermelho) durante o processo de produção (figura 7A). Após incubação dos osteoblastos com as NPs, as células foram fixadas com PFA 4%, e tiveram seus núcleos marcados com DAPI (azul), como é possível observar na figura 10B. Para observação das projeções citoplasmáticas, e conseqüente análise da morfologia celular, o citoesqueleto foi corado com alexa flúor 488 (verde), figura 7C. Na figura 7D estão representadas as imagens do núcleo(azul), citoplasma(verde) e NP(vermelho) sobrepostas para aumentar o contraste da localização intracelular das NP. Nessa figura (7D), pode ser claramente observado que os osteoblastos OFCOL II, quando em contato com NP, tiveram sua morfologia preservada, apresentando-se

com o citoesqueleto organizado, núcleo bem definido além de alongados e com projeções citoplasmáticas.

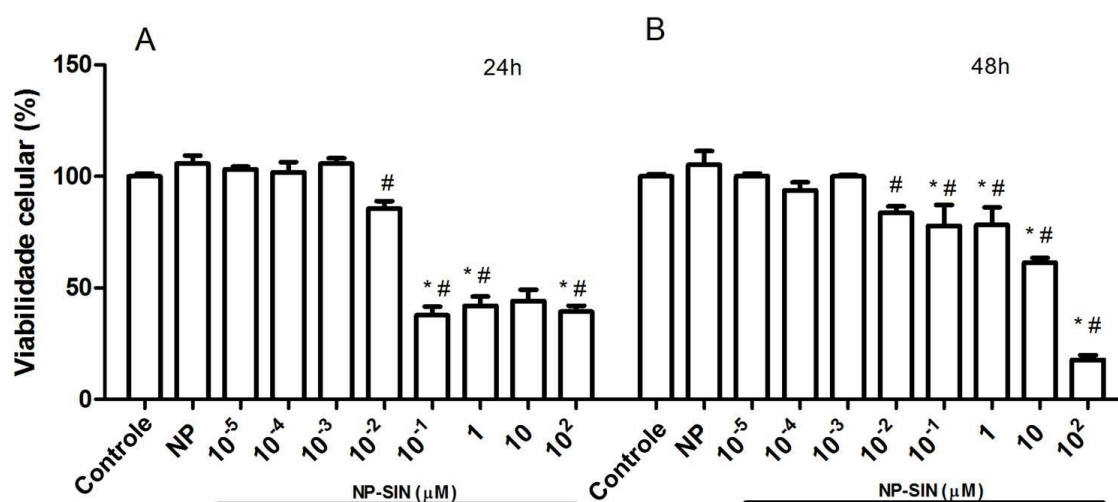


**Figura 7: Internalização de nanopartículas carregadas com sinvastatina em culturas de osteoblastos.** As células foram coradas em DAPI (azul) para visualização do núcleo, verde para o citoesqueleto e rodamina (vermelho) para as nanopartículas.

#### 5.4 Análise do efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e proliferação de osteoblastos OFCOL II

Ao tratar as células OFCOL II com nanopartículas carregadas com oito concentrações de sinvastatina, sendo a menor  $10^{-5}$   $\mu\text{M}$  e a maior  $10^2$   $\mu\text{M}$ , foi possível observar, nas primeiras 24h (figura 8A), que as nanopartículas carregadas com as concentrações  $10^{-1}$ , 1, 10 e  $10^2$   $\mu\text{M}$  reduziram para aproximadamente 40% a viabilidade dos osteoblastos quando comparada com o controle (100% das células viáveis) e com o grupo NP ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças significantes na viabilidade celular dos osteoblastos incubados com as concentrações de  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ , em relação ao grupo controle, conforme ilustra a figura 7A. Observando o período de 48h, a viabilidade celular nas concentrações  $10^{-1}$  e 1  $\mu\text{M}$  foi, em média, 80% quando comparada com o controle e NP (figura 8B). A

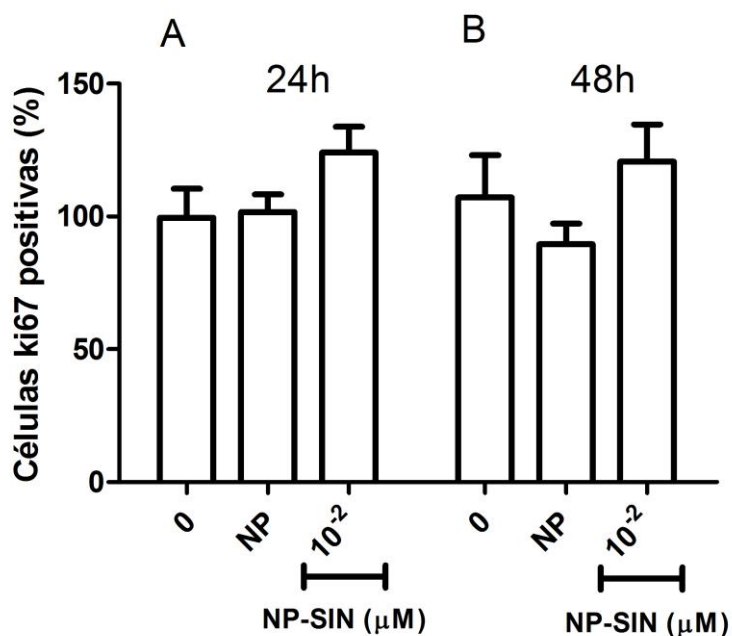
concentração  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$  não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle, essa diferença foi observada apenas comparando ao grupo NP. Nas concentrações 10 e  $10^2$   $\mu\text{M}$  a viabilidade foi de 60% e 17% respectivamente, com diferença significativa em relação ao controle e NP. As demais concentrações,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-3}$   $\mu\text{M}$  não apresentaram diferença significativa em relação ao controle e NP.



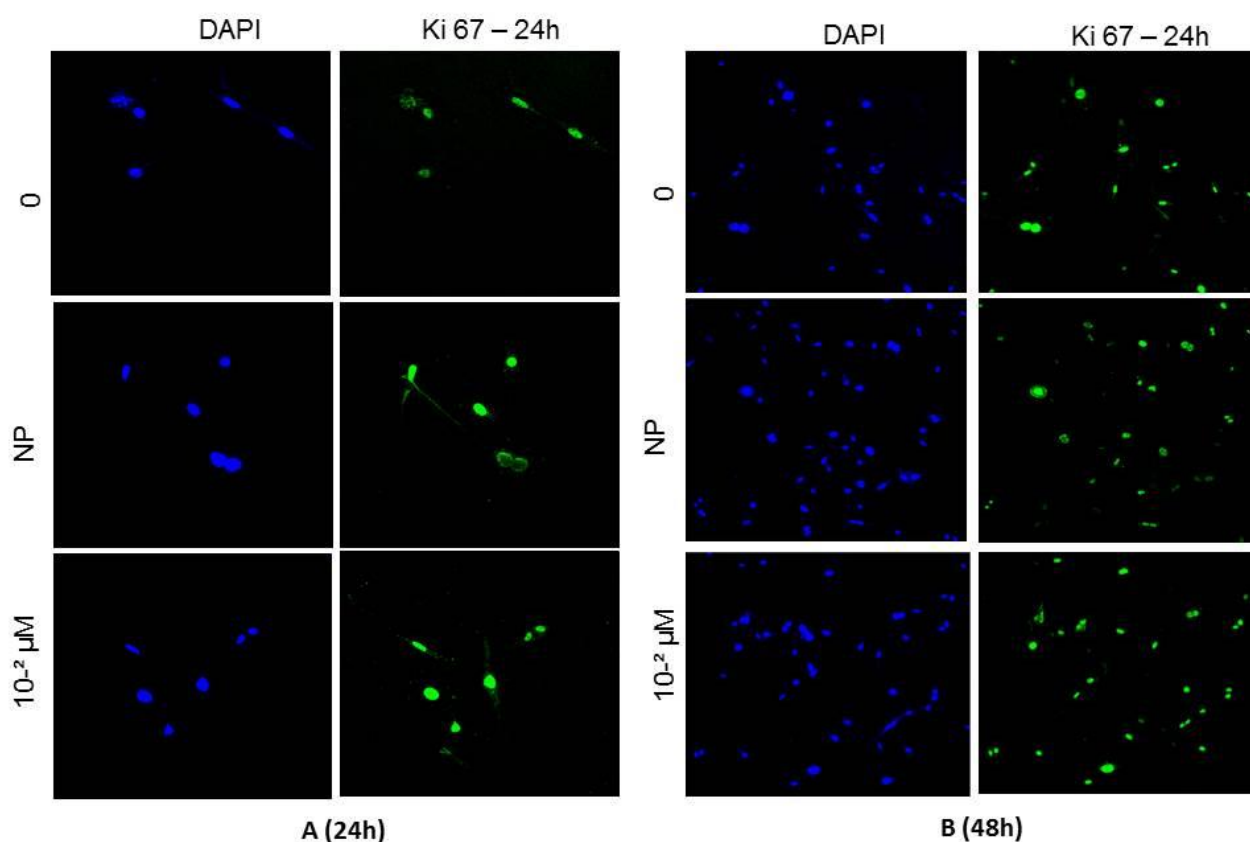
**Figura 8: Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade celular pelo teste MTT.** As células OFCOL II foram incubadas com ou sem NP-SIN durante 24h (A) ou 48h (B). \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o controle NP. Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni.

A proliferação celular foi avaliada, ainda, com base na marcação de ki 67, um antígeno nuclear presente em células em proliferação. Os grupos selecionados para este ensaio foram: controle, NP e NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ), e os períodos avaliados foram 24 e 48h. A figura 9 mostra claramente que a incubação de osteoblastos com sinvastatina (concentração  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ) não interferiu na proliferação de osteoblastos, em nenhum dos tempos avaliados, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ ), controle e NP. Estes resultados encontram-se ilustrados nas figuras 10A e 10B, aonde os núcleos apresentam-se corados com DAPI (azul) e as células ki 67 positivas, coradas com alexia 488 (verde).





**Figura 9: Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na quantificação de células ki67 positivas em 24h (A) e 48h (B).** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN(10<sup>-2</sup> μM). As Barras representam a média ± SEM para amostras de cada grupo (n = 4). foram quantificados pelo menos 10 campos de cada lâmina. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle. Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni

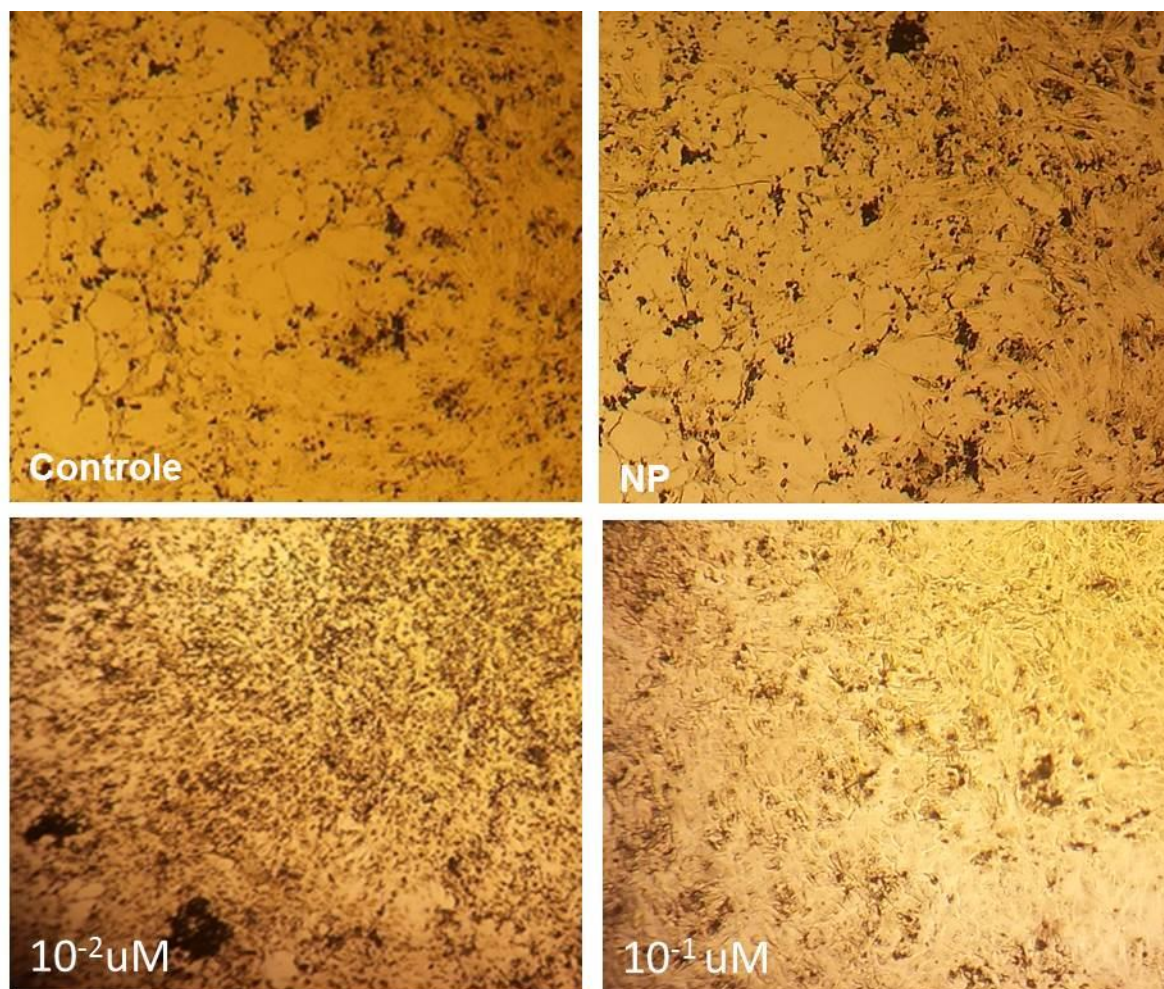


**Figura 10: Ilustração do efeito das nanopartículas sobre a proliferação dos osteoblastos OFCOL II.** As imagens digitais foram obtidas após o período de incubação de 24h ( A) ou 48h ( B) com NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu$ M), NP ou meio simples (controle 0). As células foram imunocoradas utilizando anticorpo anti-ki67 (verde). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

### 5.5 Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na ativação de osteoblastos OFCOL II

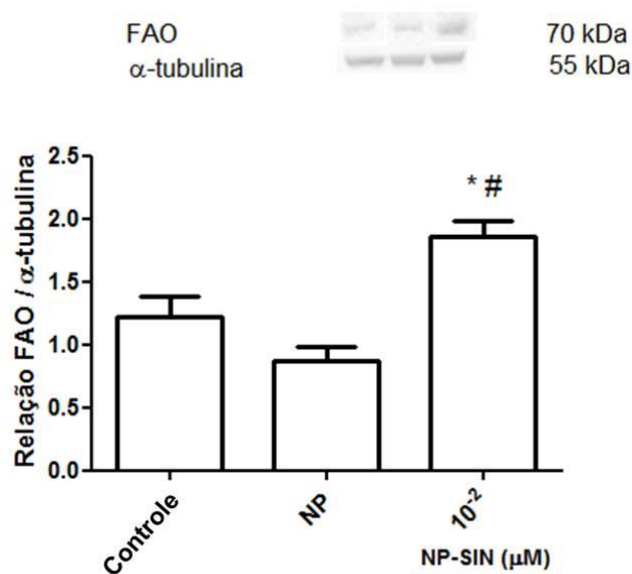
A ativação dos osteoblastos foi comprovada através do ensaio de mineralização de Von Kossa e da expressão e liberação de fosfatase alcalina (FAO), avaliadas por Western Blot e Elisa, respectivamente.

O ensaio de mineralização de Von Kossa (Figura 11) demonstrou que a incubação de osteoblastos murinos com sinvastatina, na concentração de  $10^{-2}$   $\mu$ M, por 21 dias, resultou no aumento do número de nódulos minerais quando comparado ao controle e NP, sugerido maior atividade dessas células.



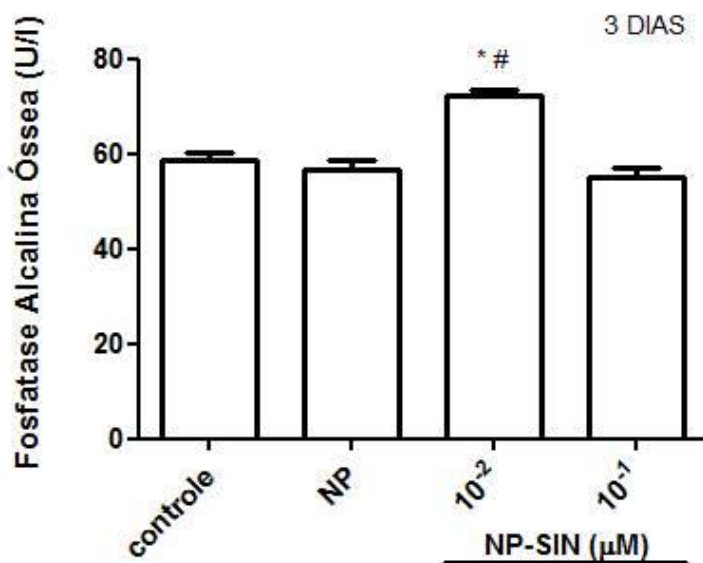
**Figure 11: Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por Von Kossa em osteoblastos OFCOL II.** Foram comparados os grupos controle, NP, NP-SIN( $10^{-2}$   $\mu$ M) e NP-SIN( $10^{-1}$   $\mu$ M). A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros. As imagens foram obtidas de microscópio invertido com aumento de 40x. Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina. Essas imagens foram obtidas após 21 dias.

A análise da expressão proteica de FAO através de Western Blot, após o período de 48h de incubação com NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu$ M), reforça os resultados obtidos a partir do ensaio de mineralização. Observou-se um aumento significativo nos níveis protéicos de FAO no grupo NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu$ M), após 48 h de incubação, quando comparado aos grupos controle e NP (Figura 12).



**Figura 12 : Efeito de nanopartículas carregadas de sinvastatina sobre a concentração protéica de fosfatase alcalina (FAO) em culturas de osteoblastos incubadas durante 48h.** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN( $10^{-2}$   $\mu$ M). Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o grupo NP. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni

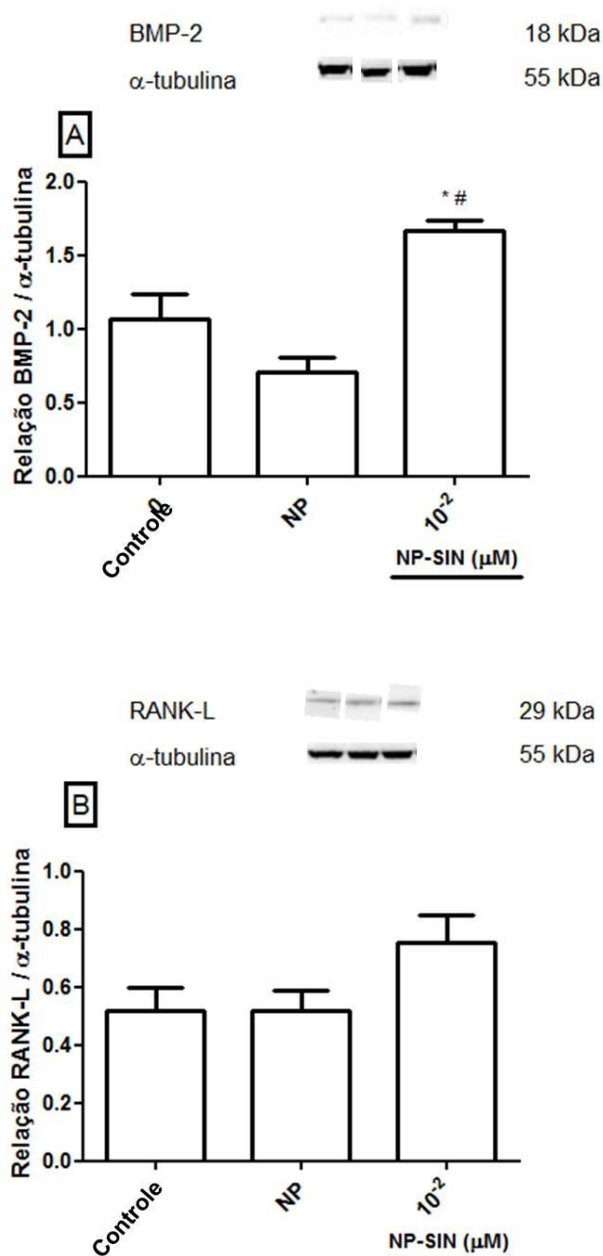
A figura 13 ilustra a quantificação de FAO no meio de cultura, por ELISA, no terceiro dia de incubação. Observou-se que a incubação de nanopartículas carregadas com sinvastatina, na concentração de  $10^{-2}$   $\mu$ M (NP-SIN  $10^{-2}$ ), aumentou de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a liberação de FAO, quando comparado aos grupos controle e NP.



**Figura 13: Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina sobre a liberação de fosfatase alcalina (FAO) em meio de cultura de osteoblastos incubados durante 3 dias.** Foram comparados os grupos controle, NP, NP-SIN( $10^{-2}$   $\mu$ M) e NP-SIN( $10^{-1}$   $\mu$ M). Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o grupo NP. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni

### 5.6 Análise do efeito de NP-SIN sobre a expressão protéica de BMP-2 e Rank-L

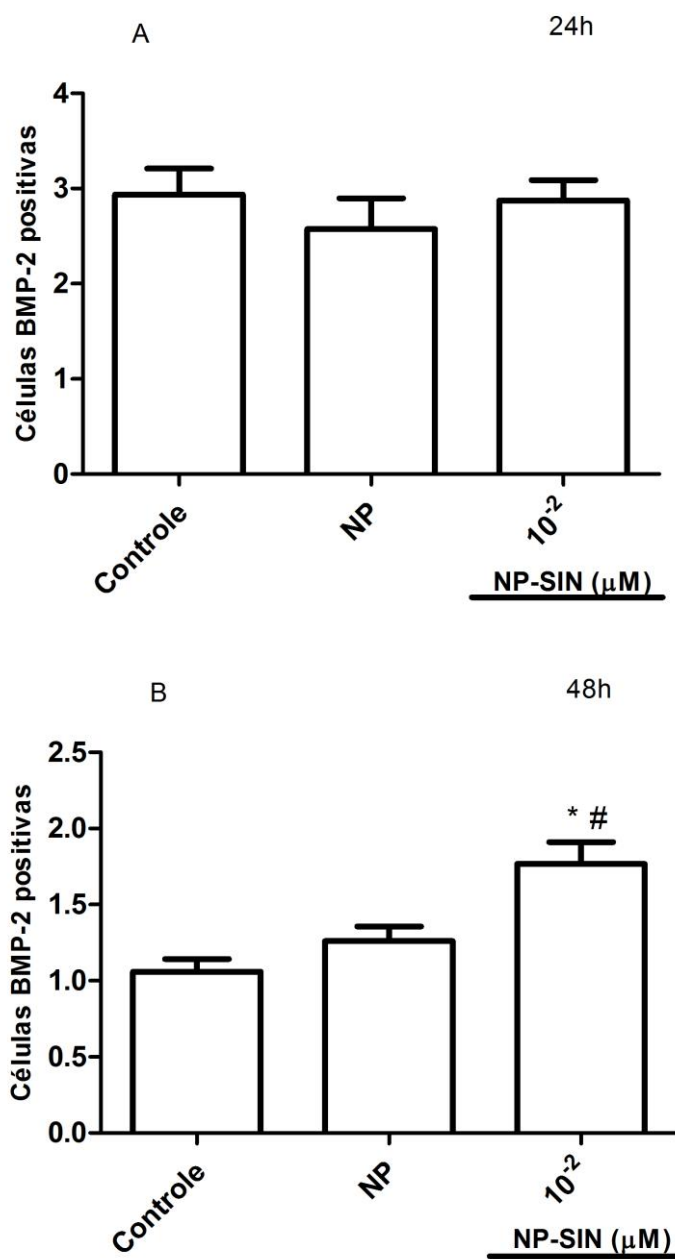
A incubação de osteoblastos murinos com nanopartículas carregadas com sinvastatina, na concentração de  $10^{-2}$   $\mu$ M (NP-SIN  $10^{-2}$ ), por 48h, resultou no aumento significativo, da expressão proteica de BMP-2 em relação aos grupos controle e NP, conforme ilustra a figura 14A. No entanto, não se observou nenhum efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina (NP-SIN  $10^{-2}$ ) na expressão protéica de RANK-L em osteoblastos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre o grupo NP-SIN  $10^{-2}$  e os grupos controle e NP (figura 14B).



**Figura 14: Efeito de nanopartículas carregadas de simvastatina sobre a concentração protéica da proteína morfogenética óssea (BMP-2) (A) e de RANK-L (B) em culturas de osteoblastos incubadas durante 48 h.** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN( $10^{-2}$   $\mu$ M). Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com simvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem simvastatina, respectivamente. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o controle NP. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni

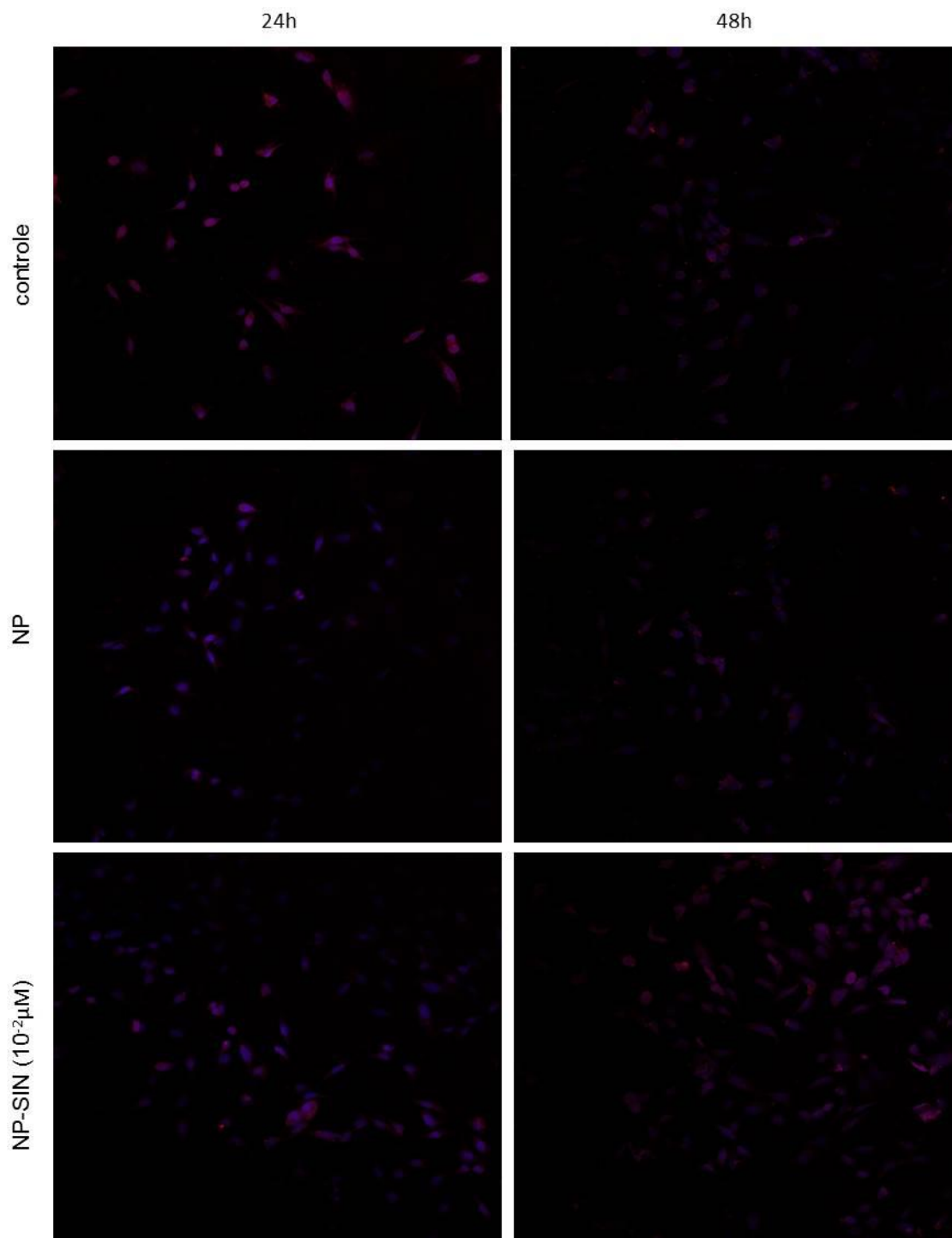
### **5.7 Análise do efeito de NP-SIN sobre a imunomarcagem de BMP-2 e Rank-L**

A incubação de osteoblastos murinos com nanopartículas carregadas com sinvastatina, na concentração de  $10^{-2}\mu\text{M}$  (NP-SIN  $10^{-2}$ ), por 24 e 48h, resultou no aumento expressivo ( $p<0,05$ ) da imunomarcagem de BMP-2 quando comparado ao controle e NP após 48h como ilustra a figura 15 B. No período de incubação de 24h não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15 A). As imagens representativas podem ser observadas na figura 16.



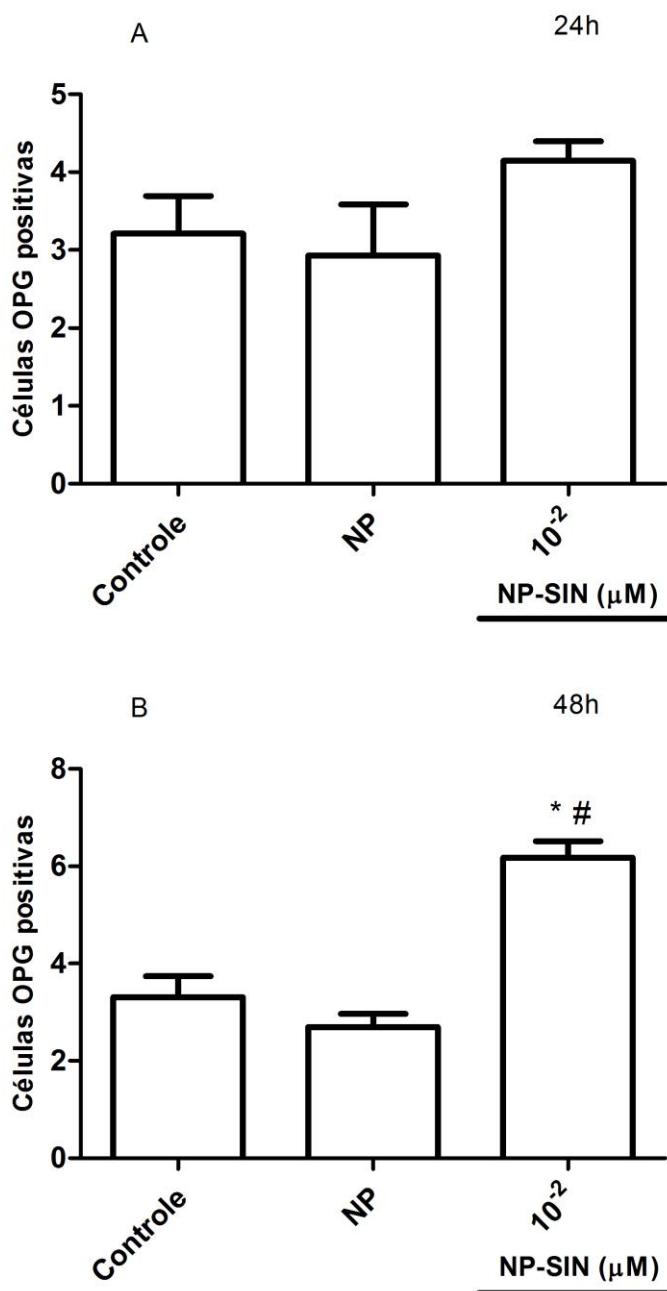
**Figura 15: Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imumarcção de BMP-2.** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN (10<sup>-2</sup>μM). Os grupo s controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o controle NP. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni.



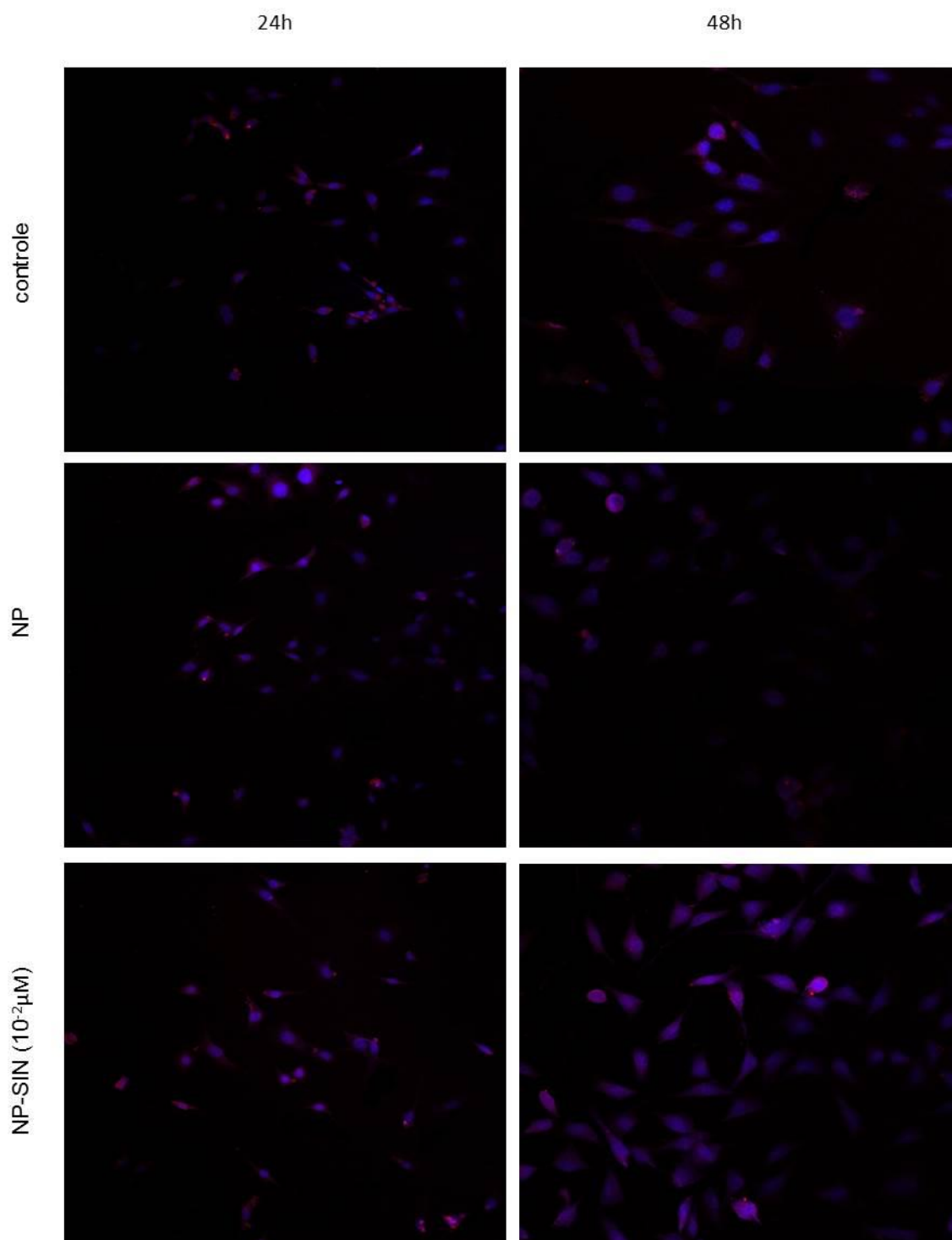


**Figura 16: Ilustração do efeito das nanoparticulas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcção de BMP-2 nos osteoblatos OFCOL II.** As Imagens digitais foram obtidas após o período de incubação de 24h ou 48h com NP-SIN (10<sup>-2</sup> uM), NP ou meio simples (controle). As células foram imunocoradas utilizando anticorpo anti-BMP-2 (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

O mesmo comportamento foi observado na imunomarcação de OPG. Nas primeiras 24h não houve diferena significativa entre os grupos (figura 17A). Apenas após exposio de 48h com nanopartículas carregadas com sinvastatina, na concentrao de  $10^{-2}\mu\text{M}$  (NP-SIN  $10^{-2}$ ), houve aumento expressivo ( $p < 0,05$ ) da imunomarcao de OPG quando comparado ao controle e NP (Figura 17 B). As imagens representativas podem ser observadas na figura 18.

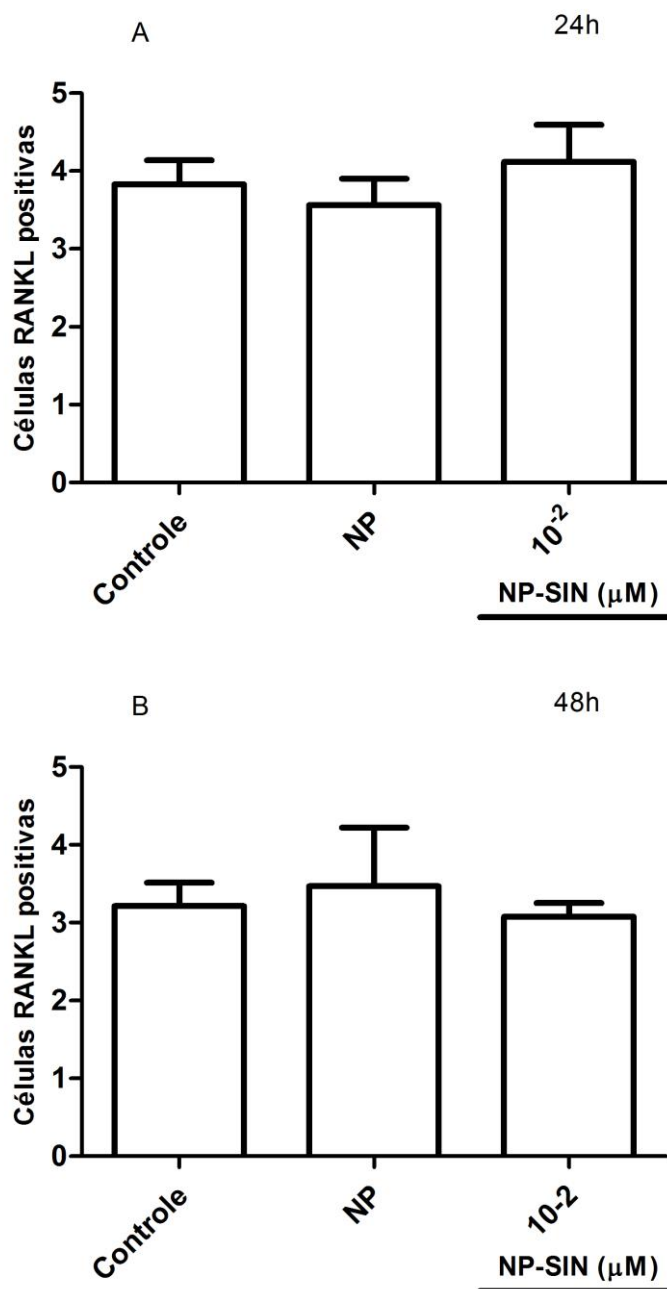


**Figura 17: Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imunmarcação de OPG em 24 (A) e 48h (B).** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN (10<sup>-2</sup>μM). Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. \*P <0,05 quando comparado com o grupo controle; # P<0,05 quando comparado com o controle NP. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni.

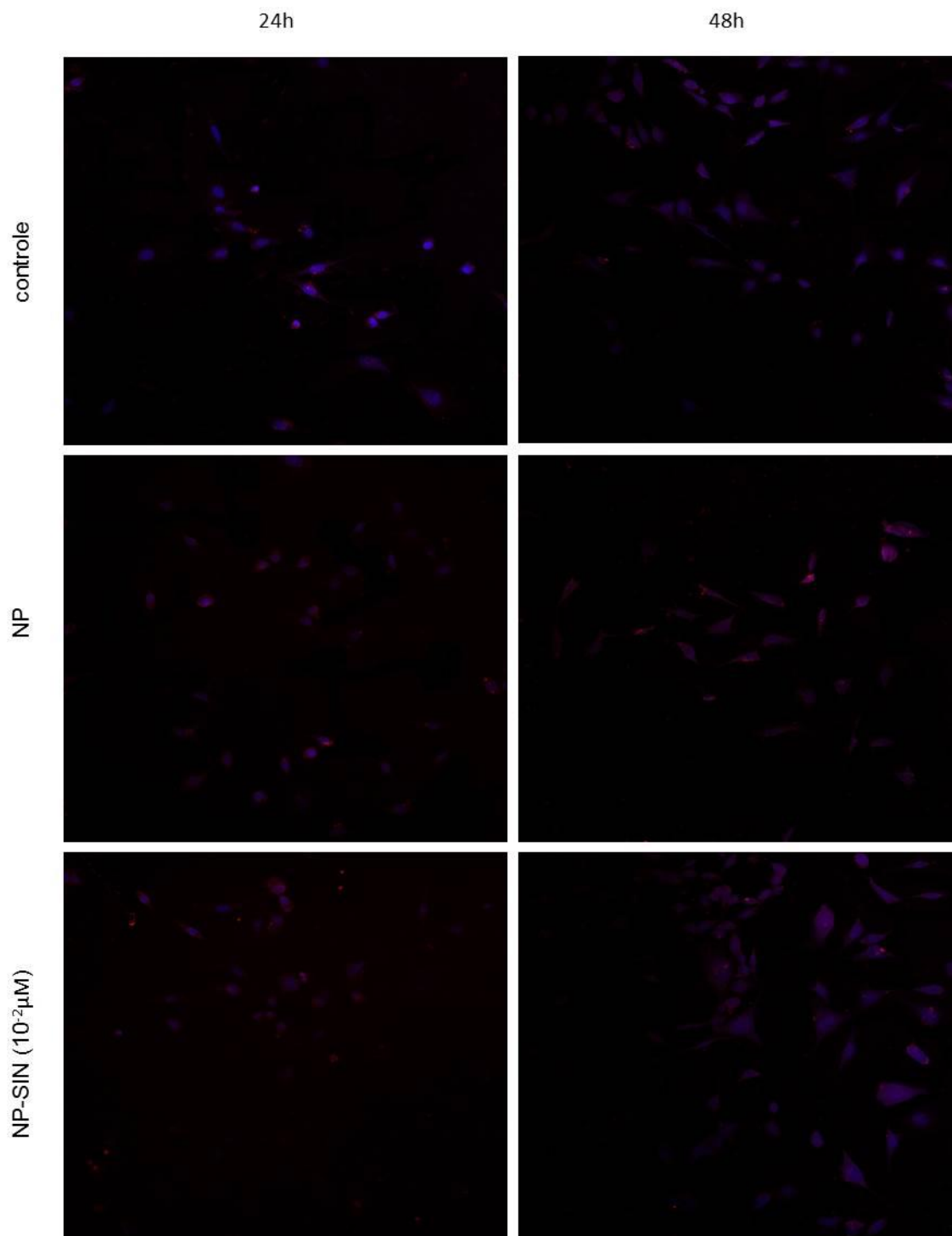


**Figura 18: Ilustração do efeito das nanoparticulas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcção de OPG nos osteoblatos OFCOL II.** As Imagens digitais foram obtidas após o período de incubação de 24h ou 48h com NP-SIN ( $10^{-2}$  uM), NP ou meio simples (controle). As células foram imunocoradas utilizando anticorpo anti-OPG (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

Quando avaliada a imunomarcção de RANK-L não foi possível observar diferença significativa entre os grupos em nenhum dos períodos avaliados (figura 19A e 19B), conforme está ilustrado na figura 20.



**Figura 15: Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na imunomarcção de RANK-L.** Foram comparados os grupos controle, NP e NP-SIN ( $10^{-2}$   $\mu$ M). Os grupos controle e NP representam os grupos que não receberam nanopartículas com sinvastatina e que receberam apenas as nanopartículas, sem sinvastatina, respectivamente. Análise de variância (Anova); Teste de Bonferroni



**Figura 20: Ilustração do efeito das nanoparticulas carregadas com sinvastatina sobre a imunomarcção de RANK-L nos osteoblatos OFCOL II.** As Imagens digitais foram obtidas após o período de incubação de 24h ou 48h com NP-SIN (10<sup>-2</sup> uM), NP ou meio simples (controle). As células foram imunocoradas utilizando anticorpo anti-RANK-L (vermelho). Os núcleos foram marcados com DAPI (azul).

## 6 DISCUSSÃO

O uso de nanopartículas incorporadas a polímeros biodegradáveis tem sido amplamente estudado, uma vez que possuem a capacidade de veicular fármacos pouco solúveis e direcioná-los para alvos específicos, o que gera aumento da biodisponibilidade, e conseqüente melhora na eficácia terapêutica. Os nanocarreadores podem ainda diminuir a toxicidade de formulações comuns e controlar sua liberação (ARAYNE; SULTANA, 2006). Relatos da literatura sugerem que as nanopartículas poliméricas associadas a drogas osteoindutoras podem, ainda, induzir a sinalização celular necessária para que haja reparo ósseo. (MA; 2008; LAGARON, 2011).

As nanopartículas de PDLLA foram usadas no presente estudo como veículo de entrega de sinvastatina para osteoblastos murinos da linhagem OFCOL II, com o intuito de avaliar o efeito desta associação na proliferação e atividade dessas células. A escolha da sinvastatina baseou-se em estudos prévios que sugerem efeitos benéficos no tecido ósseo. Tem sido descrito que a sinvastatina aumenta a ação dos osteoblastos *in vitro* (RUIZ-GASPA S, *et al.*, 2007; MAEDA T, *et al.*, 2004) e é capaz de aumentar a massa óssea *in vivo* quando injetada subcutaneamente ou administrada por via oral em roedores (MUNDY G, 1999).

Trabalhos desenvolvidos por pesquisadores vinculados ao nosso grupo demonstraram que a administração de sinvastatina, por via oral, preveniu a perda óssea inflamatória em modelo de doença periodontal experimental em ratos, possivelmente mediado por efeitos antiinflamatórios e antioxidante (DALCICO *et al.*, 2012). Efeitos semelhantes foram encontrados, utilizando-se o mesmo modelo experimental, quando os animais foram tratados com atorvastatina, outro fármaco membro da família das estatinas (GOES *et al.*, 2016). Esses efeitos positivos da atorvastatina, prevenindo inflamação e perda óssea associada à doença periodontal, foram também observados, em ratas com osteoporose induzida por glicocorticoides (SOUSA *et al.*, 2016).

O uso da sinvastatina por via oral, para tratar hipercolesterolemia, é bem estabelecido e eficaz para manter os níveis de colesterol dentro dos níveis normais. As concentrações e a posologia utilizadas para este fim, por outro lado, devido a sua seletividade hepática e pobre distribuição para a periferia, chegam ao micro ambiente ósseo em concentrações muito baixas, insuficientes para, em curto

período de tempo, estimular reparo ósseo. De fato, um estudo *in vivo* relata que a dosagem recomendada para a hipercolesterolemia é insuficiente para a osteogênese em torno de implantes dentários (AYUKAWA, Y, 2010; JADHAV, JAIN, 2006; MA *et al.*, 2008). Algumas pesquisas sugerem, no entanto, que o uso crônico por via oral, mesmo em doses recomendadas para reduzir os níveis de colesterol no sangue, apresenta efeitos positivos na melhora da densidade óssea e redução do risco de fraturas (WHANG, *et al.*, 2000; MAEDA, *et al.*, 2001).

O presente estudo foi delineado com o intuito de desenvolver um sistema de entrega local de sinvastatina, com liberação lenta e controlada, baseando-se em estudos relatados na literatura que sugerem a aplicação de sinvastatina encapsulada, diretamente no local de ação, podendo ter melhor eficácia e menos efeitos colaterais, já que oferta de sinvastatina de forma livre leva a uma rápida absorção celular e metabolização (WHANG, *et al.*, 2005).

Vários trabalhos na literatura têm investigado diferentes carreadores para a entrega local de sinvastatina, como gelatina (OZEC, *et al.*, 2008), sulfato de cálcio (NYAN, *et al.*, 2007) nanopartículas de PLGA (HO, *et al.*, 2011) com resultados positivos na formação óssea local. O polímero utilizado no presente trabalho, o PDLLA, possui características de biocompatibilidade e rápida degradação quando aplicado *in vivo* (HELEN; GOUGH *et al.*, 2008; YUNOS *et al.*, 2013). Essas características nos motivaram a investigar a ação direta de nanopartículas de PDLLA, carregadas com sinvastatina, em osteoblastos murinos. As nanopartículas foram desenvolvidas na Universidade Federal de Goiás, seguindo um protocolo estabelecido no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT, sigla em inglês), a partir de uma proposta do nosso grupo de estudo. Durante todo o período de desenvolvimento e confecção das nanopartículas, realizamos, concomitantemente, testes *in vitro* com o objetivo de otimizar a formulação, a obtenção de partículas viáveis, uniformes e em escala nanométrica para permitir a internalização por osteoblastos. De fato, foi observado, através de microscopia de fluorescência, a internalização celular das nanopartículas, possivelmente por endocitose.

Considerando a perspectiva de aplicação local de sinvastatina, iniciamos nossos estudos buscando determinar as concentrações viáveis de nanopartículas carregadas com este fármaco (NP-SIN), ou seja, concentrações que não fossem tóxicas para os osteoblastos em cultura. Para tanto, avaliamos a viabilidade dessas células, quando incubadas com NP-SIN, através do ensaio colorimétrico de MTT. Foi



observada, após 24h de incubação, viabilidade celular preservada quando utilizadas concentrações de sinvastatina abaixo de  $10^{-2}$   $\mu\text{M}$ , em relação aos grupos controles, que incluem: 1. células cultivadas apenas com o meio de cultura padrão e 2. células incubadas com nanopartículas sem fármaco, utilizadas para garantir que todos os efeitos encontrados sejam atribuídos à sinvastatina. O mesmo foi observado após 48h de incubação. Estudos *in vitro* anteriores indicam que estatinas, em concentrações variando de  $10^{-2}$  - 5  $\mu\text{M}$ , além de serem viáveis, aumentam a expressão de genes marcadores osteogênicos, tais como RUNX-2, BMP-2, osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina, em osteoblastos e células derivadas da medula óssea (MAEDA T, *et al.*, 2001; SONG C, *et al.*, 2003). Em 2013 Pullisaar e colaboradores testaram uma esponja de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) em culturas primárias de osteoblastos associada a diversas concentrações de sinvastatina e observaram uma viabilidade aceitável apenas em concentrações abaixo de 10  $\mu\text{M}$ .

A redução da viabilidade de concentrações maiores que  $10^{-2}\mu\text{M}$  observada no presente trabalho, pode estar associada ao efeito da sinvastatina na produção de colesterol. Especulamos que concentrações mais altas podem ter reduzido drasticamente a síntese desta substância, essencial para a manutenção da integridade das membranas celulares (WHANG, *et al.*, 2005).

Diante dos resultados obtidos no ensaio de MTT, associado a dados descritos na literatura, escolhemos trabalhar com a concentração  $10^{-2}\mu\text{M}$  de sinvastatina, encapsulada nas nanopartículas (NP-SIN), uma vez que se apresentou viável tanto em 24 como em 48h, além de ter sido a menor concentração capaz estimular a atividade de osteoblastos já descrita (PULLISAAR, HELEN *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o ensaio MTT realizado no presente estudo, não sugere efeitos proliferativos da sinvastatina nos osteoblastos, nem mesmo quando incubados com concentrações viáveis, aonde não foi observada diminuição significativa no número de células em relação aos controles. Esse resultado foi confirmado através da imunomarcção para ki67, marcador específico de proliferação celular, aonde não se observou diferenças significativas entre o número de células imunomarcadas entre os grupos incubados com sinvastatina e os controles. Este achado, provavelmente, pode estar associado ao tempo de observação. No entanto, novos ensaios são necessários para confirmar esta hipótese.

Partindo desse resultado, investigamos a atividade dos osteoblastos a partir da expressão protéica, por Western Blot, de marcadores relacionados à atividade de osteoblastos, como BMP-2, FAO e RANK-L. As nanopartículas carregadas com sinvastatina, na concentração testada, foram capazes de aumentar a expressão protéica de BMP-2 e fosfatase alcalina, mas não alteraram de forma significativa a expressão proteica de RANKL após 48h de exposição. Diversos estudos têm associado o potencial osteogênico da sinvastatina ao aumento da biossíntese de BMP-2 de forma direta, bem como ao aumento da diferenciação de osteoblastos (MUNDY *et al*, 1999; SUGIYAMA *et al.*, 2000; SKOGLUND *et al.*, 2002; PARK, 2009; MASUZAKI *et al.*, 2010; NYAN *et al.*, 2010; MOSHIRI, A., 2015). De fato, estudos, *in vivo* realizados na UFC em modelo de reabsorção óssea induzida por doença periodontal experimental em ratos, demonstraram efeito positivo da sinvastatina, reduzindo os parâmetros inflamatórios e prevenindo a perda óssea. Estes efeitos foram associados ao aumento considerável de BMP-2 e osteoprotegerina (OPG) nos tecidos periodontais.(DALCICO *et al.*, 2012) Corroborando com este trabalho, Zhang e colaboradores em 2016, utilizando sinvastatina em gel de silicato de cálcio para liberação lenta da droga, em modelo de calota craniana em coelhos, observaram aumento da expressão de BMP-2, osteocalcina e colágeno tipo 1 e uma consequente melhora no parâmetro de formação óssea.

As proteínas ósseas morfogênicas (BMPs) foram descritas pela primeira vez em 1965 por Urist como fatores capazes de guiar a aglomeração e diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, além de induzir a proliferação dessas células. Neste estudo, observou-se formação óssea ectópica em tecido muscular de animais após aplicação de preparações de matriz óssea desmineralizada.

Em 2013, Qi e colaboradores fizeram um estudo em tíbia de ratos, utilizando sulfato de cálcio associado a células tronco mesenquimais e sinvastatina. Os autores observaram aumento da atividade de BMP-2, FAO, osteocalcina e OPG, o que aponta para o efeito positivo da sinvastatina na diferenciação de osteoblastos a partir das células mesenquimais indiferenciadas.

Mais de 20 tipos de BMPs já foram identificadas, no entanto a BMP-2 é descrita como a principal proteína da família relacionada ao reparo ósseo. Tendo em vista o potencial efeito osteogênico das BMPs, foi desenvolvida uma recombinação humana da *bmp-2*, chamada *rhBMP-2*, fabricada por meio da utilização de um gene

que é colocado sobre uma esponja absorvível de colágeno e, quando implantada em um defeito ósseo, permite a indução da formação de tecido ósseo (CARTER T.G *et al.*, 2008; HERFORD, BOYNE P.J, 2008).

As principais desvantagens do uso das BMPs recombinantes são a necessidade de grandes doses para serem eficazes em seres humanos, a liberação rápida e o alto custo. Além disso, demonstrou-se que a aplicação local de rhBMP-2 induz um exacerbado processo inflamatório que pode inativar uma parte considerável de rhBMP-2 devido a atividade de proteases, presentes no sítio inflamatório. Logo, sistemas de liberação controlada podem ser úteis para reduzir a resposta inflamatória inicial e melhorar a efetividade da rhBMP-2 (CARREIRA *et al.*, 2014). Tendo em vista o alto custo relacionado ao uso de BMP recombinante, o uso de um fármaco como a sinvastatina, de baixo custo, liberado de forma controlada e capaz de estimular a expressão proteica de BMP-2 promovendo osteoindução, seria bastante promissor.

No presente trabalho, a expressão e liberação de FAO também foram investigadas para avaliar a influência de NP-SIN na atividade dos osteoblastos. Observamos, após 48h de incubação, um aumento da expressão de FAO, evidenciado por Western Blot, no grupo tratado com NP-SIN  $10^{-2}\mu\text{M}$ . Este resultado nos sugeriu que a partir do terceiro dia, já teríamos liberação de FAO no meio de cultura, permitindo sua alcalinização e dando condições adequadas para que ocorresse o processo de mineralização. No terceiro dia de incubação, portanto, foi avaliada a liberação de FAO no meio de cultura, o que confirmou nossa hipótese, uma vez que foi observado um aumento significativo de FAO no grupo NP-SIN  $10^{-2}\mu\text{M}$ , em relação ao controle. Esses resultados estão em concordância com trabalhos que apontam para o aumento da expressão de FAO associado ao efeito da sinvastatina no metabolismo ósseo (QI *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016). FAO é uma enzima sintetizada por osteoblastos com a função de promover alcalinização do meio, propiciando um ambiente adequado para que ocorra o processo de mineralização (WITTKOWSKE, C. *et al.*, 2016).

Uma vez detectado o aumento da expressão e liberação de FAO na concentração de NP-SIN  $10^{-2}\mu\text{M}$ , partimos para a realização do ensaio de Von Kossa para avaliação da deposição de sais cálcio no meio de cultura, dado que evidencia indiscutivelmente a atividade de osteoblastos. Esse ensaio foi realizado após 21 dias de incubação com NP-SIN e mostrou (figura 11) que a sinvastatina

atuou efetivamente como osteoindutor para a formação de sais de cálcio, confirmando estudos prévios mostrando o potencial osteoindutor da sinvastatina na concentração  $10^{-2}\mu\text{M}$  (PULLISAAR, HELEN *et al.*, 2013). O uso de NP sem sinvastatina mostrou resultados semelhantes ao grupo controle, sugerindo que o efeito osteoindutor deve-se exclusivamente à sinvastatina, ou seja, exclui qualquer participação do polímero em si.

Observou-se ainda um efeito positivo da sinvastatina encapsulada, na concentração de  $10^{-2}\mu\text{M}$ , sobre a imunomarcação de OPG, após 48 horas de incubação. A OPG é produzida e liberada pelos osteoblastos ativados e possui um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, já que inibe a maturação e ativação dos osteoclastos *in vivo* e *in vitro* (LIU, W; ZHANG, X. 2015). A OPG liga-se com alta afinidade ao RANKL nos osteoblastos, impedindo que este, por sua vez, se ligue ao RANK na superfície dos osteoclastos. Isto faz com que a OPG iniba a reabsorção óssea produzida pelos osteoclastos maduros estimulados pelo RANKL (RIFAS. WEITZMANN, 2009). No presente trabalho, não observamos aumento na expressão e imunomarcação de RANK-L nos osteoblastos com NP-SIN, indicando que sinvastatina não foi capaz de interferir na expressão desse marcador. Por outro lado, um estudo *in vivo* de nosso grupo mostrou que sinvastatina, administrada por via oral, em ratos Wistar submetidos à doença periodontal experimental, promoveu uma redução significativa da expressão de RANK-L nos animais tratados, associado ao aumento da expressão de OPG nos tecidos periodontais, prevenindo a reabsorção óssea induzida pela doença (DALCICO *et al.*, 2012).

As nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina foram capazes de ativar osteoblastos, apresentando-se como um biomaterial promissor para uso *in vivo*, especialmente quando associados a esponjas de colágeno reabsorvíveis já desenvolvidas e testadas por nosso grupo.

## 7 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos nesse trabalho, é possível concluir que as nanopartículas de PDLLA podem atuar como veículo para a entrega contínua e gradual da sinvastatina, induzindo a ativação de osteoblastos murinos em cultura. As nanopartículas carregadas com  $10^{-2}\mu\text{M}$  de sinvastatina não apresentaram citotoxicidade e aumentaram de forma significativa a atividade celular. As nanopartículas livres de sinvastatina não interferiram na atividade dos osteoblastos, reiterando o potencial osteogênico da sinvastatina. As NP-SIN não foram capazes de aumentar a proliferação dos osteoblastos em cultura. No entanto, novos estudos são necessários a fim de se verificar a ação dessa associação, nanopartícula de PDLLA carregadas com sinvastatina, na melhora dos parâmetros ósseos *in vivo*, podendo representar uma estratégia promissora para a regeneração do tecido ósseo.

