PRISCILA LUCENA MENDES

**Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na
viabilidade e diferenciação osteogênica de
células-tronco do ligamento periodontal**

São Paulo

2019

PRISCILA LUCENA MENDES

**Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na
viabilidade e diferenciação osteogênica de
células-tronco do ligamento periodontal**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Adde

Coorientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Mendes, Priscila Lucena.

Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal / Priscila Lucena Mendes ; orientador Carlos Alberto Adde; coorientador Marinella Holzhausen Caldeira -- São Paulo, 2019.

86 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida

1. Células-tronco. 2. Ligamento periodontal. 3. Sinvastatina. 4. Nanopartículas. 5. Regeneração tecidual. I. Adde, Carlos Alberto. II. Caldeira, Marinella Holzhausen. III. Título.

Mendes PL. Efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 30 / 01 /2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Carla Renata Sipert

Instituição: FOUSP Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Danillo Fabrini Maciel Costa Veloso

Instituição: UFG Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Emanuel da Silva Rovai

Instituição: USF Julgamento: Aprovada

À Deus que não coloca sonhos no nosso coração que não sejam realizáveis.

AGRADECIMENTOS

À **FOUSP**, em nome do **Diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura durante o curso de mestrado.

Aos **pacientes da FOUSP**, sem os quais não existiria clínica ou mesmo pesquisa odontológica, agradeço aos pacientes que um dia concordaram em doar material biológico para pesquisas no país.

Aos **professores da FOUSP**, os quais tiveram papel importante na minha formação acadêmica no período de cumprimento de disciplinas. Aos **professores da disciplina de clínica integrada** o meu muito obrigada por todos os ensinamentos. Agradeço por me receberem tão bem e pela confiança em mim depositada durante as disciplinas em que pude colaborar junto aos alunos de graduação, tanto nas atividades teóricas quanto clínicas. Em especial: **Prof. Dr. Marcelo Romano, Prof. Dr. Alexandre Illanos, Prof. Dr. José Leonardo, Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti**. Aos **pós-graduandos Raissa, Roberta e Bruno** pelo aprendizado e ótimo convívio diário.

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Carlos Alberto Adde**, sou grata pela amizade, por respeitar meu lento processo de readaptação ao voltar ao meio acadêmico, acreditar nesse projeto, por me estimular à docência sendo um grande exemplo de um professor que se faz próximo ao aluno, que está sempre ali para edificar e não criticar.

À **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira** pela co-orientação e por estar sempre tão disponível para me ajudar. Muito obrigada por respeitar minha curva de aprendizagem nesse novo e encantador mundo da pesquisa acadêmica. Agradeço por apoiar esse projeto e, ainda, por se preocupar comigo não só no âmbito profissional. Obrigada por cada abraço e por toda a força que me deu diante das dificuldades.

Ao **Laboratório de Pesquisa Básica** da FOUSP, em nome da Professora **Dra. Carla Renata Sipert** por todos os recursos disponibilizados. À **Profa. Dra. Carla** pelo suporte técnico-científico, por ser sempre tão acessível e simplificar tudo que parecia impossível de realizar. Obrigada pelo carinho e amizade e por ser exemplo de professor que se dedica à pesquisa. Acho que o mundo precisa de mais profissionais assim. Você é um exemplo de professora que inspira.

À **Silvana**, técnica do laboratório de pesquisa pelo suporte, pela ajuda diária e amizade. Você não sabe o quanto seu apoio foi essencial para essa pesquisa. Aos colegas de pós-graduação pela paciência e ensinamentos nas reuniões científicas e no laboratório. Em especial: **Tomaz, Marlus, Giovanna, Bruno, Juliana e Rafael**.

Letícia muito obrigada por compartilhar da sua experiência de e se fazer disponível para me ensinar mesmo com todas as ocupações que tem. Pelo apoio nos momentos difíceis e por tornar a pós-graduação um ambiente mais leve.

Claudia, sou grata a Deus por ter te colocado na minha vida. Agradeço por se fazer tão presente mesmo estando do outro lado do mundo, obrigada sua paciência em me ensinar praticamente tudo que sei sobre um laboratório de cultura celular. Você é uma grande inspiração para mim e torço muito pelo seu sucesso profissional e pessoal.

Ao meu esposo, **Eduardo**, pelo estímulo em todos os meus projetos de vida, você sempre me impulsiona a crescer, meu parceiro, amor e amigo.

À minha mãe, **Fátima**, pelo exemplo de superação, por me estimular a crescer como profissional, mesmo que isso significasse minha ausência. Obrigada por abrir mão de tanta coisa para que eu chegasse até aqui. Espero ser uma mãe tão zelosa quanto à senhora para o nosso **João Pedro**. Ao **Johnson** por ser um grande amigo e sempre acreditar no meu potencial, até mais que eu mesma. Obrigada por fomentar em meu coração a vontade de estudar. À **Cíntia** por sonhar a docência e tantos outros projetos comigo e me motivar a voltar ao meio acadêmico.

Ao meu anjo, **Humberto**, a quem Deus decidiu chamar para que olhasse por mim. Aquele que plantou a sementinha da caridade e cuja fé foi viva em obras nessa terra. Espero estar te orgulhando nesse momento, Pai.

Ao Laboratório de Farmácia e tecnologia da UFG (**FARMATEC**), em nome da Profa. **Dra. Eliana Martins Lima**, do **Dr. Danilo Fabrini** e da aluna **Kamila** pela parceria, produção e envio da nanopartícula para realização dessa pesquisa.

Agradeço à **FAPESP** pelo fomento à pesquisa e à **CAPES** pelo suporte financeiro na forma da bolsa de mestrado, que possibilitou minha dedicação à pesquisa durante esse período.

Também agradeço a todos os alunos da graduação com quem mais aprendi que ensinei e que me fizeram amar ainda mais a docência.

RESUMO

Mendes, PL. Efeito de nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e diferenciação osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal[Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

O uso de polímeros como nanocarreadores de fármacos oferece flexibilidade na dosagem e na cinética de liberação, melhorando a eficácia dos tratamentos. A sinvastatina, medicamento utilizado para a redução do colesterol tem demonstrado ação na estimulação da formação óssea. Acredita-se que este efeito pleiotrópico, associado à possibilidade de obtenção de um sistema de liberação controlada pode levar a um aumento na osteogênese. No presente estudo, investigamos os efeitos das nanopartículas carregadas com sinvastatina na viabilidade e diferenciação de PDLSCs, *in vitro*, quando cultivadas em meio indutor específico. As culturas foram divididas nos seguintes grupos: 1) PDLSC em meio clonogênico (C); 2) PDLSC em meio clonogênico com dimetilsufóxido (C+D); 3) PDLSC em meio clonogênico com dimetilsufóxido e sinvastatina (S); 4) PDLSC em meio osteogênico (MO); 5) Grupo nanopartícula branca (NB): PDLSC receberam a formulação de nanopartículas sem sinvastatina em meio osteogênico; 6) Grupo nanopartículas carregadas com sinvastatina (NS): PDLSC receberam a formulação da sinvastatina encapsulada em nanopartículas poliméricas de PDLLA em meio osteogênico. As concentrações de $10^{-3}\mu\text{M}$, $10^{-2}\mu\text{M}$ foram selecionadas após o ensaio de proliferação. A avaliação da mineralização por deposição de cálcio foi realizada através da coloração com vermelho de alizarina. 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. As nanopartículas carregadas com $10^{-2}\mu\text{M}$ de sinvastatina não apresentaram citotoxicidade e aumentaram de forma significativa a atividade celular. As nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina causaram um aumento no depósito de cálcio, sugerindo que esse pode ser um biomaterial promissor para osteoindução *in vivo*, reiterando o potencial osteogênico da sinvastatina. Novos estudos são necessários a fim de se verificar a melhora dos parâmetros ósseos *in vivo*.

Palavras-chave: Células-tronco. Ligamento periodontal. Sinvastatina. Nanopartículas poliméricas. Regeneração tecidual

ABSTRACT

Mendes, PL. The effect of nanoparticles loaded with simvastatin on viability and osteogenic differentiation in periodontal ligament stem cell cultures. Sao Paulo: University of Sao Paulo, School of Dentistry; 2019. Corrected Version.

The use of polymers as drug nanocarriers offers flexibility in dosage and release kinetics, improving the effectiveness of treatments. Simvastatin, a drug used to reduce cholesterol has been shown to stimulate bone formation. It is supposed that this pleiotropic effect, associated with the possibility of using a controlled release system, can cause an increase in osteogenesis. In the current study, we investigated the effects of nanoparticles loaded with simvastatin on the viability and differentiation of PDLSCs, in vitro, when grown in a specific inducing medium. As cultures, they were divided into the following groups: 1) PDLSC in clonogenic medium (C); 2) PDLSC in a clonogenic medium with dimethylsulfoxide (C + D); 3) PDLSC in a clonogenic medium with dimethylsulfoxide and simvastatin (S); 4) PDLSC in osteogenic medium (MO); 5) White nanoparticle group (NB): PDLSC received the application of nanoparticles without simvastatin in the osteogenic medium; 6) Nanoparticles group loaded with simvastatin (NS): PDLSC received the application of simvastatin encapsulated in polymeric nanoparticles of PDLLA in osteogenic medium. As 10-3 μ M, 10-2 μ M were selected after the proliferation test. An assessment of mineralization by calcium deposition was performed by staining with alizarin red. Given the data selected in this work, it is possible to conclude that PDLLA nanoparticles can perform as a vehicle for continuous and gradual delivery of simvastatin. As nanoparticles carried with 10-2 μ M of simvastatin, no cytotoxicity was found and significantly increased cell activity. As simvastatin-loaded PDLLA nanoparticles cause an increase in calcium deposits, suggesting that this may be a biomaterial promoter for osteoinduction in vivo, reiterating the osteogenic potential of simvastatin. Further studies are needed to verify improvements in bone parameters in vivo.

Keywords: Stem cells. Periodontal ligament. Simvastatin. Polymeric nanoparticles. Tissue Regeneration

LISTA DE FIGURAS

Figura1.1- Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas:	27
Figura 2.1 -Via de sinalização para a osteoclastogênese	30
Figura 5.1 - Via de sinalização para a osteoclastogênese	37
Figura 7.1 -Caracterização das células através de citometria de fluxo	43
Figura 7.2 - MTT após 24h do estímulo	44
Figura 7.3 - MTT após 24h do estímulo das nanopartículas	45
Figura 7.4 - MTT após 48h do estímulo	46
Figura 7.5 - MTT após 48h do estímulo das nanopartículas	47
Figura 7.6 - MTT após 72h do estímulo.	48
Figura 7.7 - MTT após 72h do estímulo das nanopartículas	49
Figura 7.8 - MTT após 144h do estímulo.	50
Figura 7.9 - MTT após 144h do estímulo das nanopartículas	51
Figura 7.9.1 -. Formação de depósitos de cálcio após 7 dias de experimento.....	52
Figura 7.9.2 - Diferenciação osteogênica após 7 dias de experimento	53
Figura 7.9.3 - Formação de depósitos de cálcio após 14 dias de experimento.....	54
Figura 7.9.4 - Diferenciação osteogênica após 14 dias de experimento	54
Figura 7.9.5 - Diferenciação osteogênica após 21 dias de experimento	55
Figura 7.9.6 - Formação de depósitos de cálcio após 21 dias de experimento.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Do inglês <i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
anti-DIG-POD	anti-digoxigenina conjugado à peroxidase
AT	Atividade de telomerase
ATP	Do inglês <i>adenosintriphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
BMP-2; BMP-4	Do inglês <i>bone matrix protein 2</i> (proteína da matriz óssea 2 e 4)
BSA	Do inglês <i>bovineserumalbumine</i> (albumina de soro bovino)
CA	Estado da Califórnia, <i>EUA</i>
C	Controle
C + D	Controle com dimetilsulfoxido (DMSO);
cDNA	Do inglês <i>complementar deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
CFU-F	Do inglês <i>ColonyFormingUnits - Fibroblastic</i> (unidades formadoras de colônia – fibroblástica)
cit c	Do inglês cytochrome c oxidase (citocromoc oxidase)
CL	Do inglês <i>ciclethreshold</i> (ciclo limiar)
CTs	Células-tronco
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DP	Dobra populacional
DPSCs	Do inglês <i>dental pulpstemcells</i> (células-tronco da polpa dentária)
EDTA	Do inglês <i>ethylenediaminetetracetic acid</i> (ácido etileno diaminotetracético)
ELISA	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Eficiência de Plaqueamento
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Do inglês <i>fluorescein isothiocyanate</i> (fluoresceína)
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GAPDH	Do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

GMSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cells derived from human Gingiva</i>
hDPSCs	Do inglês <i>humandental pulp stem cells</i>
HE	Hematoxilina e eosina
HGF	Do inglês, <i>hepatocytegrowth fator</i>
hTERT	Do inglês <i>humantelomerase reverse transcriptase</i>
IB	Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo
IgG1k	Imunoglobulina G 1 kappa
IgG2k	Imunoglobulina G 2 kappa
MEC	Matriz Extra celular
MSC	Do inglês <i>mesenchymal stem cell</i> (células-tronco mesenquimais)
MTT	<i>Teste de citotoxicidade pelo método direto</i>
NB 10 ⁻¹	Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de 10 ⁻¹ µM
NB 10 ⁻²	Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de 10 ⁻² µM
NB 10 ⁻³	Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de 10 ⁻³ µM
NO	Do inglês nitric oxide (óxido nítrico)
Notch-1	Do ingles <i>translocation-associated Notch homolog 1</i>
NIH	Do ingles <i>National Institutes of Health</i>
NY	Estado de New York, EUA
P1	Primeira Passagem de subcultivo da célula em uso
P2	Segunda Passagem de subcultivo da célula em uso
P3	Terceira Passagem de subcultivo da célula em uso
PBS	Do inglês <i>phosphatebuffered saline</i> (tampão fosfato-salina)
PBSA	Do inglês <i>calciumandmagnesium-freephosphatebuffered saline</i> (tampão fosfato-salino sem cálcio e magnésio)
PCR	Do inglês <i>polimerase changereaction</i>
PDL	Do inglês <i>Periodontal LigamentCells</i>
PDLSC	Do inglês <i>Periodontal LigamentStemCells</i> (células-tronco do ligamento periodontal)

PE	Do inglês <i>phycoerythrin</i> (eficoeritrina)
PFA	Paraformaldeído
pPDLSC	Do inglês <i>Pig Periodontal LigamentStemCells</i>
RNA	Do inglês <i>ribonucleicacid</i> (ácido ribonucléico)
ROS	Do inglês <i>reactiveoxygenspecies</i> (espécies reativas de oxigênio)
RT – Qpcr	Do inglês <i>Reverse Transcriptase - Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
S 10 ⁻¹	Sinvastatina na concentração de 10 ⁻¹ μM
S 10 ⁻²	Sinvastatina na concentração de 10 ⁻² μM
S 10 ⁻³	Sinvastatina na concentração de 10 ⁻³ μM
SN 10 ⁻¹	Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração 10 ⁻¹ μM
SN 10 ⁻²	Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração 10 ⁻² μM
SN 10 ⁻³	Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração 10 ⁻³ μM
SCAP	Do inglês <i>Stem Cells from the Apical Papilla</i>
SCs	Do inglês <i>stem cells</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHEDs	Do inglês <i>Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth</i> (células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos)
SP	São Paulo
TGF-β	Do inglês <i>transforminggrowthfactor-β</i> (fator de crescimento transformador β)
TRAP	Do inglês <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelialgrowthfactor</i>
VC	Vitamina C (Ácido ascórbico)
α-MEM	Do inglês α- <i>Minimal Essential Medium</i> (Meio Mínimo Essencial α)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µg/µl	Miligramma por microlitro
µg/ml	Miligramma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Milímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
G	Gramma
H ₂ O	Água
J	Joules
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
M	Molar
mM	Milímetro
mW	Miliwatt
ng/µl	Nanogramma por microlitro
Nm	Nanogramma
NO	Óxido nítrico
Pmol	Picomol
W/cm ²	Watt por centímetro quadrado
-ΔΔCt	<i>Do inglês cycle threshold variation</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
4	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	33
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E SELEÇÃO DE PACIENTES	35
5.2	CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DO LIGAMENTO PERIODONTAL.....	35
5.3	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA POR CITOMETRIA DE FLUXO	37
5.4	INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR	38
5.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	38
1)	MEIO CLONOGÊNICO (MC)	38
2)	MEIO OSTEOGÊNICO (MO)	38
3)	MEIO CLONOGÊNICO + DIMETILSUFOXIDO (C+D).....	38
4)	SINVASTATINA (S)	38
5)	NANOPARTÍCULA CARREGADA COM SINVASTATINA (NS).....	38
6)	NANOPARTÍCULA BRANCA (NB)	38
5.6	TESTE DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DIRETO (MTT)	38
5.7	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO IN VITRO ATRAVÉS DA COLORAÇÃO COM VERMELHO DE ALIZARINA.....	39
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
7	RESULTADOS	43
8	DISCUSSÃO.....	57
9	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS	67

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial que resulta na destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. (American Academic of periodontology, 2001). A regeneração do osso alveolar é um dos principais desafios do tratamento periodontal. Visando superar tal desafio e frente à identificação e ao isolamento de células-tronco mesenquimais, o interesse em pesquisas na área de engenharia tecidual tem sido crescente, especialmente no que tange à restituição de tecidos ósseos (Hu et al., 2018).

O dente humano e suas estruturas de suporte são fontes de múltiplas linhagens de células-tronco adulta. Estas células podem ser isoladas da polpa dentária (DPSC, do inglês, *Dental Pulp Stem Cells*) (Gronthos et al., 2000); da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED, *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous*)(Miura et al., 2003); da papila apical (SCAP, *Stem Cells from the Apical Papilla*) (Sonoyama et al., 2008), do folículo dental (DFPCs, *Dental Follicle Stem Cells*) (Morsczeck et al., 2008), da gengiva humana (GMSCs, *Mesenchymal Stem Cells derived from human Gingiva*) (Zhang et al., 2009); e do ligamento periodontal (PDLSCs, *Periodontal Ligament Stem Cells*) (Seo et al., 2004).

As células mesenquimais de origem dental tem capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares de interesse para a regeneração tecidual e apresentam as vantagens de fácil isolamento, cultivo e baixa imunogenicidade, além de não despertar conflitos éticos, por serem provenientes de um tecido que seria descartado após extrações dentárias (Mao et al., 2006; Gronthos et al., 2000).

As PDLSCs são células progenitoras que têm a capacidade para proliferar e diferenciar em osteoblastos, osteócitos, adipócitos e condrócitos (Heino et al., 2008; Han et al., 2014) são as que desempenham maior potencial para regeneração de tecidos periodontais, o que tem fomentado estudar o seu uso como opção terapêutica (Sowmya et al., 2015). O estudo de Seo et al. (2004) sugere um potencial das PDLSCs na regeneração tecidual óssea, quando transplantadas para defeitos periodontais criados cirurgicamente em camundongos.

Visando estimular a osteoindução de células mesenquimais de origem dental, alguns trabalhos utilizam fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas do tipo 2 e 4 (BMP-2 E BMP-4). Apesar do sucesso com essa terapia celular, o uso desses fatores de crescimento apresenta algumas desvantagens como necessidade de grandes doses, complexa síntese, liberação rápida, fácil degradação e alto custo financeiro. Portanto, uma estratégia mais viável e rentável seria utilizar um medicamento que fosse capaz de estimular a BMP-2 endógena (Maeda et al., 2003; Pauly et al., 2009; Diniz et al., 2018).

Tendo em vista o alto custo relacionado ao uso de BMP, 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, e dessa forma promover osteoindução, seria bastante promissor. Além disso, sistemas de liberação controlada podem ser úteis para reduzir a resposta inflamatória inicial e melhorar a efetividade desse fator de crescimento (Carreira et al., 2014).

A sinvastatina é uma estatina lipofílica semi-sintética desenvolvida inicialmente para controle da hipercolesterolemia. As estatinas inibem de forma competitiva a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, reduzindo a síntese do mevalonato e seus subprodutos, os quais são responsáveis pela prenilação de proteínas GTPases envolvidas na biossíntese do colesterol. A redução dessa prenilação promove um aumento da expressão de RNAm para BMP-2, estimulando assim efeitos anabólicos no tecido ósseo. As estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos, visto que podem atuar no remodelamento ósseo por três mecanismos: estímulo da osteogênese, supressão da apoptose de osteoblastos e inibição da osteoclastogênese (Maeda et al., 2003).

Os primeiros estudos de referências quanto ao uso da sinvastatina e sua ação benéfica no tecido ósseo foram realizados por Mundy e colaboradores em 1999. Nesses estudos 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. Adicionalmente, esses autores demonstraram que a sinvastatina aumenta a formação óssea, quando injetada subcutaneamente no tecido conjuntivo em torno da calvária de camundongos, e também quando administrada por via oral em ratas ovariectomizadas osteopênicas, resultando em acréscimo no volume ósseo trabecular.

Uma das limitações à aplicação clínica de sinvastatina para a regeneração óssea é definir a concentração adequada. 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 (Stein et al., 2005; Nyan et al., 2007).

A utilização de nanoesferas de poli (DL-ácido lático) PDLLA (Figura 2) seria estratégica como um sistema de entrega lenta local do fármaco, para viabilizar a liberação controlada e duradoura, aumentando a oferta do medicamento no local de interesse. O PDLLA foi aprovado como biomaterial pela FDA (Food and drug administration) esse copolímero tem sido pesquisado para uso em arcabouço celular devido a sua biocompatibilidade, apresentando ainda, bons resultados como arcabouço para regeneração de osso e cartilagem (Yunos et al., 2013).

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 aumento da biodisponibilidade do fármaco (Merisko-Liversidge et al., 2008).

Figura 1.1 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas:

- 1) Nanocápsula com fármaco dissolvido no seu núcleo;
- 2) Nanocápsula com o fármaco adsorvido na membrana polimérica;
- 3) Nanoesfera com fármaco retido na sua matriz polimérica;
- 4) Nanoesfera com fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica

(Fonte: Adaptado de Schaffazick et al., 2003).

Observamos que há necessidade de mais estudos a fim de elucidar a toxicidade das formulações do fármaco incorporado à nanopartícula. Portanto, a presente proposta objetiva avaliar, "*in vitro*", a capacidade osteoindutora de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal quando cultivadas em um meio com liberação controlada de sinvastatina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Pesquisas *in vivo* e *in vitro* revelaram que as estatinas reduzem a atividade dos osteoclastos, ativam a diferenciação em osteoblastos e têm efeitos benéficos na densidade óssea (Liu et al., 2012; Pullisaar et al., 2014; Lee et al., 2019; Venkatesan et al., 2019).

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 et al., 1998).

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 (demonstrado na Figura 2.1) representa uma importante descoberta para o entendimento da biologia óssea, sugerindo a interação entre osteoblastos e osteoclastos (Boyle et al., 2003).

Alguns autores 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 reduzir a absorção óssea, o que é demonstrado pela menor expressão de catepsina K, um marcador da atividade de osteoclastos, e RANK-L em defeitos ósseos criados cirurgicamente em tíbia de ratos (Ayukawa et al., 2009; Nyan et al., 2007; Stein et al., 2005; Zhao et al., 2014; Zhang et al., 2018).

O sistema RANK/RANK-L/OPG desempenha um papel importante na sinalização da osteoclastogênese e da remodelação óssea. Os osteoblastos estão

envolvidos na síntese de proteínas morfogênicas ósseas (BMPs), que regulam a mitose e diferenciação de células mesenquimais em células osteoprogenitoras, desempenhando, portanto, papel essencial no processo de remodelação óssea (Boyle et al., 2003).

Figura 2.1 -Via de sinalização para a osteoclastogênese

(Fonte: Adaptado de Boyle et al., 2003).

A Figura 2.1 mostra a via de sinalização da osteoclastogênese, em que 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 TRAP, 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 (Boyle et al., 2003).

Dados indicam efeito anabólico das estatinas no tecido ósseo, visto que essas aumentam a expressão de genes marcadores osteogênicos em osteoblastos e derivados da medula óssea. Em particular, aumentam a expressão da BMP-2 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Tai et al., 2015).

3 OBJETIVOS

- Principal:

Avaliar a diferenciação osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal quando cultivadas com nanopartículas carregadas com sinvastatina *in vitro*.

- Específicos:

- a) Investigar a citotoxicidade das diferentes concentrações de nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina sobre as células-tronco do ligamento periodontal.
- b) Avaliar o efeito das diferentes concentrações de nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina na diferenciação osteoblástica sobre as células-tronco do ligamento periodontal.

4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Considerando o grande número de trabalhos na literatura demonstrando efeitos benéficos da sinvastatina na prevenção da perda óssea inflamatória e no reparo ósseo, propomos no presente trabalho, o uso de uma nanopartícula polimérica carregada com sinvastatina que possibilite liberação local, controlada e duradoura de sinvastatina, aumentando a oferta do fármaco no local de interesse.

A motivação deste estudo foi avaliar a capacidade desta formulação em promover diferenciação das PDLSCs.

Esperamos com este projeto contribuir substancialmente com a área de farmacologia, biomateriais e reparo ósseo. Deste modo, objetiva-se desenvolver biomateriais inovadores, e de menor custo, para o reparo ósseo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental e seleção de pacientes

As células-tronco do ligamento periodontal foram obtidas de 3 pacientes saudáveis (idade entre 18 e 25 anos) que necessitaram de extração dos terceiros molares na Clínica da Disciplina de Cirurgia dentro do ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP).

A doação dos dentes pelos pacientes foi feita mediante assinatura de formulário específico devidamente aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da FOUSP (CAAE: 993368518.6.0000.0075) (ANEXOS).

Os critérios de inclusão foram: pacientes entre 18 e 25 anos de idade, sistemicamente saudáveis e com terceiros molares hígidos.

Foram excluídos os pacientes que apresentassem doença periodontal, pacientes com algum comprometimento sistêmico, como diabetes mellitus, terceiros molares em processo de rizogênese incompleto, terceiros molares com processo inflamatório pericoronário e terceiros molares não totalmente hígidos.

5.2 Cultura de células-tronco do ligamento periodontal

Após lavagem com tampão fosfato-salino (PBS do inglês *phosphate buffered saline*) dos terceiros molares selecionados e recém extraídos, os espécimes foram transportados em meio mínimo essencial α (α -MEM do inglês *α -Modified Eagle Medium* - Gibco, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (Hyclone, UT, EUA), 100 μ m de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamina, 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 0,5 mg/mL de anfotericina B até o laboratório de cultura de células. Em câmara de fluxo laminar e sob condições assépticas, o tecido gengival que ainda estivesse aderido foi removido e devidamente descartado. O tecido do ligamento periodontal foi obtido por

meio de raspagem no terço médio da raiz, utilizando lâmina de bisturi número 15 estéril e evitando assim eventual contaminação com tecido gengival ou pulpar.

Os tecidos coletados foram fragmentados em espécimes de 1 mm de espessura aproximadamente. Após a fragmentação, foram centrifugados a 800 g/5min/temperatura ambiente (TA). Tal suspensão foi depositada em frascos para cultura de 25 cm² imersa em α -MEM suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF), 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 0,5 mg/mL de anfotericina B (todos os reagentes provenientes de Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 100% de umidade (Freshney, 2005).

Aproximadamente 5 a 10 dias após as células migrarem dos tecidos e atingirem 80% de confluência, os tecidos foram delicadamente removidos, as células coletadas por tripsinização e submetidas à nova cultura em frascos de 75cm². As células do ligamento periodontal apresentaram um formato fusiforme (Freshney, 2006). A pureza e a homogeneidade das células foram confirmadas por análise de citometria de fluxo. Células obtidas entre a 3–8 passagens foram utilizadas nos experimentos. Todos os meios de cultura e suplementos utilizados foram da Gibco (Grand Island, NY, USA).

Figura 5.1 - Ilustração do passo a passo realizado para a obtenção de células-tronco do ligamento

5.3 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo

Para identificar e caracterizar imunofenotipicamente as células-tronco do ligamento periodontal foram utilizados os anticorpos primários fluoresceína (FITC) ou eficoeritrina (PE). Para a identificação do fenótipo de células mesenquimais, aproximadamente 5×10^5 células isoladas do ligamento periodontal foram lavadas em PBS e incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: CD14-FITC, CD90-FITC (eBioscience, San Diego, CA), CD34-FITC (Biolegend, USA), CD-44- PE, CD45-PE (eBioscience, San Diego, CA) e CD146-PE (Biolegend, USA) por 30 minutos a 4°C. A suspensão de células foi então lavada duas vezes com PBS e analisada com o citômetro de fluxo FACSsort (Becton Dickinson).

Um total de 5–10.000 eventos foi examinado usando-se um comprimento de onda de 488 nm. Os eventos registrados foram analisados usando-se o software Cell Quest (Becton Dickinson). Os resultados foram expressos como % de células positivas.

5.4 Indução de Diferenciação Celular

Para avaliação da capacidade de diferenciação das células do ligamento periodontal em osteoblastos, as mesmas foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 25.000 células/cm². Após a privação de soro por 16 h, as células tiveram seu meio de cultura substituído por meio controle, MC (α -MEM/15% SBF) ou por meio de diferenciação MO (MC acrescido de 0,1 mM de dexametasona e 1,8 mM de KH₂PO₄ - Invitrogen, Sigma-Aldrich). Após 7, 14 e 21 dias, a linhagem osteogênica das células foi confirmada pela habilidade de calcificação comprovada pela marcação positiva com vermelho de alizarina (descrição detalhada destes métodos segue mais adiante).

5.5 Grupos experimentais

Tabela 5.1 – Grupos experimentais

1) Meio Clonogênico (MC)	2) Meio Osteogênico (MO)	3) Meio clonogênico + dimetilsufóxido (C+D)	4) Sinvastatina (S)	5) Nanopartícula carregada com sinvastatina (NS)	6) Nanopartícula branca (NB)
α -MEM + 15% de SBF	α -MEM + 15% de SBF + dexametasona	α -MEM + 15% de SBF + DMSO	10 ⁻³ μ M C+D em	10 ⁻³ μ M MO em	10 ⁻³ μ M MO em
α -MEM + 15% de SBF	α -MEM + 15% de SBF + dexametasona	α -MEM + 15% de SBF	10 ⁻² μ M C+D em	10 ⁻² μ M MO em	10 ⁻² μ M MO em
α -MEM + 15% de SBF	α -MEM + 15% de SBF + dexametasona	α -MEM + 15% de SBF	10 ⁻¹ μ M C+D em	10 ⁻¹ μ M MO em	10 ⁻¹ μ M MO em

A sinvastatina pura (S) foi diluída em dimetilsufóxido. Para cada 10mg de sinvastatina, se utilizou 10ml de DMSO em 1000 μ g/ml de Meio Clonogênico.

5.6 Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT)

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio de MTT. Para a realização dos testes as células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após

atingirem 80% de confluência, foram estimuladas com as diferentes concentrações do fármaco a ser testado. O efeito das concentrações $10^{-3}\mu\text{M}$, $10^{-2}\mu\text{M}$ e $10^{-1}\mu\text{M}$ de sinvastatina na proliferação/ viabilidade celular, após 24, 48, 72 e 144 horas de estímulo, foi analisado através do ensaio de MTT. A proliferação celular é acompanhada por um aumento na atividade das desidrogenasesmitocondriais, o que conduz ao aumento na conversão do sal de tetrazólio em cristais de Formazan.

A leitura das amostras foi realizada após 24, 48, 72 e 144 horas em espectrofotômetro (Epoc, Biotek Instruments, Winoosky, Vermont, USA) com comprimento de onda ajustado para 570 nm. Como o grupo sinvastatina (S) foi diluído em α -MEM + Dimetilsulfóxido (C+D), esse foi utilizado como controle estatístico para esse grupo. Já para controle estatístico das amostras de nanopartículas carregadas sinvastatina (NS) e nanopartículas sem fármacos (nanopartículas brancas: NS) foi utilizado o Meio Controle (MC: α -MEM). Os resultados expressaram a porcentagem média de células viáveis em relação às células não tratadas. Os gráficos foram obtidos utilizando o programa Graph PadPrism™6 (San Diego, CA, EUA).

5.7 Ensaio de mineralização *in vitro* através da coloração com vermelho de alizarina

A mineralização *in vitro* foi analisada aos 7, 14 e 21 dias de experimento por marcação com vermelho de alizarina e através de ensaio de deposição de cálcio. Para a coloração com vermelho de alizarina, as células foram cultivadas em placas com 24 poços e estimuladas assim que as células atingiram 80% da confluência. Após 7, 14 e 21 dias do estímulo, as células foram fixadas com formaldeído a 10% por 30 min. Então, as células foram lavadas duas vezes com 500 μL de água destilada e coradas com 500 μL de solução de vermelho de alizarina 40mM (Sigma) por 30 min a temperatura ambiente. O valor de pH para a solução foi ajustado a 4.3. Após a coloração, o excesso de corante foi lavado com água destilada, esperou-se secar e as imagens digitais dos depósitos minerais foram obtidas por câmera (poços) e por microscópio (fotomicrografia).

Para a análise da densitometria semi-analítica da deposição de cálcio, os 24 poços com as células foram lavados com hidróxido de amônio a 10% e colocadas em mesa agitadora por 10 minutos. A reação entre o cálcio e o complexo orto-

cresolftaleína produziu uma coloração violeta. Foram transferidos 200µL para poços de uma placa de 96 poços, a qual foi mensurada a 405 nm e 550nm utilizando o espectrofotômetro (Epoc, Biotek Instruments, Winoosky, Vermont, USA).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em planilhas do Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Washington, EUA) e posteriormente transferidos para o GraphPadPrism versão 6.1 (San Diego, CA, EUA). A análise de diferença estatística entre os grupos foi realizada mediante One-Way Anova com post-hoc teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média para todos os experimentos quantitativos. Os dados obtidos serão representativos de três experimentos independentes realizados com células derivadas de três doadores diferentes.

Para o ensaio de viabilidade celular, os dados foram normalizados pela absorbância. Já para o ensaio de diferenciação celular, os dados foram normalizados pelo meio de diferenciação, assim, a precipitação de cálcio dos grupos experimentais é dada em razão do grupo controle.

7 RESULTADOS

7.1 Perfil característico de células-tronco do ligamento periodontal

Os marcadores de superfície celular foram analisados através da citometria de fluxo (figura 7.1). As células foram positivas para CD90(98,9%), CD44(99,6%), CD146 (83,8%), que costumam ser expressos em células indiferenciadas e negativas para CD14(0,4%), CD34 (0,9%) e CD31 (0,7%), expressos em células endoteliais e hematopoiéticas respectivamente.

Figura 7.1 – Caracterização das células através de citometria de fluxo:

A: Marcação para CD90; B: Marcação para CD44; C: Marcação para CD146; D: Marcação para CD14; E: Marcação para CD34; Marcação para CD31

7.2 Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT)

Para o ensaio de MTT, os dados são apresentados segundos os valores de absorbância no comprimento de onda de 570nm. No período de 24h não foi observada diferença estatisticamente significativa entre sinvastatina em relação ao controle, nem entre as concentrações do mesmo fármaco.

Figura 7.2. - MTT após 24h do estímulo

C + D= controle com dimetilsulfoxido (DMSO);

S 10^{-3} : Sinvastatina na concentração de $10^{-3}\mu\text{M}$.; S 10^{-2} = Sinvastatina na concentração de $10^{-2}\mu\text{M}$.;

S 10^{-1} : Sinvastatina na concentração de $10^{-1}\mu\text{M}$.;

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$);

**Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,01$);

Ao se analisar os grupos de nanopartículas carregadas com sinvastatina e nanopartículas brancas em relação ao meio controle (Alfa-Mem) após 24h de estímulo, não foi observado diferença estatisticamente significativa. Os resultados para nanopartículas brancas na concentração de 10^{-3} foram estatisticamente menores

em relação a nanopartículas brancas na concentração de 10^{-2} como mostra a figura 7.3.

Figura 7.3. - MTT após 24h do estímulo das nanopartículas

C= controle; SN 10^{-3} = Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração de $10^{-3}\mu\text{M}$.; SN 10^{-2} = Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração de $10^{-2}\mu\text{M}$.; SN 10^{-1} = Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração de $10^{-1}\mu\text{M}$.;

NB 10^{-3} = Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de $10^{-2}\mu\text{M}$.; NB $10^{-2}\mu\text{M}$. = Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de $10^{-2}\mu\text{M}$.; NB 10^{-1} = Nanopartículas brancas (sem fármaco) na concentração de $10^{-1}\mu\text{M}$.;

*Diferença estatisticamente significante em relação ao NB 10^{-3} ($p<0,05$);

No período de 48 horas foi observado diferença estatisticamente significante da sinvastatina nas três concentrações estudadas em relação ao controle ($p<0,0001$)

Figura 7.4 - MTT após 48h do estímulo

C + D: controle mais dimetilsulfoxido (DMSO); S 10^{-3} : Sinvastatina na concentração de 10^{-3} ; S 10^{-2} : Sinvastatina na concentração de 10^{-2} ; S 10^{-1} : Sinvastatina na concentração de 10^{-1} ; ***Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$).

Ao se analisar os grupos com nanopartículas em relação ao controle (C), foi observado diferença estatisticamente significativa da sinvastatina 10^{-1} e 10^{-2} ($p < 0,05$) e das nanopartículas brancas 10^{-3} ($p < 0,001$) em relação ao controle. Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que na concentração de 10^{-1} e 10^{-2} . Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-2} ($p < 0,05$) e NB 10^{-3} ($p < 0,001$) foram estatisticamente menores que na concentração de 10^{-1} .

Figura 7.5 - MTT após 48h do estímulo das nanopartículas

C: Controle; SN 10^{-3} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} ; SN 10^{-2} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-2} ; SN 10^{-1} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-1} ; NB 10^{-1} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-2} ; NB 10^{-2} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-2} ; NB 10^{-3} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-3} ; *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); ***Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$); #Diferença estatisticamente significativa em relação ao SN 10^{-1} ; +Diferença estatisticamente significativa em relação ao NB 10^{-1} ($p < 0,05$); +++Diferença estatisticamente significativa em relação ao NB 10^{-1} ($p < 0,001$).

No período de 72 horas após estimulação, foram observadas diferenças estatisticamente significante em relação ao controle ($p < 0,0001$) para controle com dimetilsulfoxido (DMSO), sinvastatina nas três concentrações estudadas.

Figura 7.6. - MTT após 72h do estímulo

C + D: controle mais dimetilsulfoxido (DMSO); S 10^{-3} : Sinvastatina na concentração de 10^{-3} ; S 10^{-2} : Sinvastatina na concentração de 10^{-2} ; S 10^{-1} : Sinvastatina na concentração de 10^{-1} ; ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,01$);

Após 72 horas de estímulo dos grupos com nanopartículas foram observadas diferenças estatisticamente significante da sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} em relação ao controle ($p < 0,05$) e diferença estatisticamente significante da sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} em relação a concentração 10^{-2} e 10^{-1} ($p < 0,05$) como mostra a figura 7.7.

Figura 7.7. - MTT após 72h do estímulo das nanopartículas

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$);

No período de 144 horas após o estímulo, foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle para meio controle com dimetilsulfoxido (DMSO), nas concentrações de 10^{-3} ($p < 0,05$) e 10^{-1} ($p < 0,01$) em relação ao controle; diferença estatisticamente significativa da sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-2} ($p < 0,01$) e 10^{-1} ($p < 0,001$) em relação a concentração 10^{-3} ; E diferença estatisticamente significativa da sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-1} ($p < 0,01$) em relação a concentração de 10^{-2} como mostra a figura 7.8..

Figura 7.8 - MTT após 144h do estímulo

C + D: controle mais dimetilsulfoxido (DMSO); S 10^{-3} : Sinvastatina na concentração de 10^{-3} ; S 10^{-2} : Sinvastatina na concentração de 10^{-2} ; S 10^{-1} : Sinvastatina na concentração de 10^{-1} ; *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); ***Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$); ##Diferença estatisticamente significativa em relação ao S 10^{-3} ($p < 0,01$); ###Diferença estatisticamente significativa em relação ao S 10^{-3} ($p < 0,01$). #### Diferença estatisticamente significativa em relação ao S 10^{-3} ($p < 0,0001$); +++Diferença estatisticamente significativa em relação ao S 10^{-1} ($p < 0,001$).

Foram observadas diferenças significantes em relação ao controle estatístico para meio controle (C) ao se comparar com os grupos com nanopartículas carregadas com sinvastatina nas três concentrações e diferença estatisticamente significativa da sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-1} em relação a concentração 10^{-3} ($p < 0,01$) como mostra a figura 7.9.

Figura 7.9 - MTT após 144h do estímulo das nanopartículas

* C: controle; SN 10^{-3} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} ; SN 10^{-2} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-2} ; SN 10^{-1} : Sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-1} ; NB 10^{-3} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-3} ; NB 10^{-2} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-2} ; NB 10^{-1} : Nanopartículas brancas na concentração de 10^{-1} ; *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$); **Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); ***Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$); ****Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$); ##Diferença estatisticamente significativa em relação ao SN 10^{-3} ($p < 0,01$).

7.3 A ativação com nanopartículas de sinvastatina levou a maior deposição de cálcio em células-tronco do ligamento periodontal

A formação de depósitos de cálcio foi avaliada através da coloração com vermelho de alizarina aos 7, 14 e 21 dias. De uma maneira geral, uma maior formação de depósitos de cálcio foi formada nos grupos cultivados em meio osteogênico, em comparação aos cultivados em meio controle (clogonênico). No período de sete dias, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre o meio osteogênico e o meio controle de diferenciação. Entretanto, foi observado que a sinvastatina em nanopartículas na concentração de 10^{-3} (SN 10^{-3}) apresentou diferença estatística significativa em relação ao SN 10^{-2} ($p < 0,05$).

Após 7 dias, o tratamento com nanopartículas de sinvastatina levaram a um aumento significativo na formação de cálcio em comparação com o MO + controle + MO nanopartículas brancas ($p < 0,05$). Aos 14 dias, todos os grupos, com exceção do MC,

apresentaram níveis elevados de coloração com vermelho de alizarina. Após 21 dias, os grupos cultivados com sinvastatina apresentaram colocaração mais intensa que os demais.

Figura 7.9.1 -. Formação de depósitos de cálcio após 7 dias de experimento.

MC= Meio clonogênico; MO= Meio osteogênico; SN10⁻³= Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração de SN10⁻³; SN10⁻²= Nanopartículas carregadas com sinvastatina na concentração de SN10⁻²;

(Magnificação de 100x)

Figura 7.9.2 - Diferenciação osteogênica após 7 dias

MC: Meio controle; MO: Meio osteogênico; SN 10^{-2} : Nanopartículas carregadas com Sinvastatina na concentração de 10^{-2} em meio de diferenciação; SN 10^{-3} : Nanopartículas carregadas com Sinvastatina na concentração de 10^{-3} em meio de diferenciação.

*Diferença estatística significativa em relação ao SN 10^{-2} ($p < 0,05$).

No período de 14 dias após estimulação, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o meio de diferenciação e o meio controle ($p < 0,0001$). Foram observadas diferenças significantes para as nanopartículas carregadas com sinvastatina nas concentrações de 10^{-2} ($p < 0,0001$) e 10^{-3} ($p < 0,0001$). Ainda, SN 10^{-2} apresentou valores significativamente maiores em relação a concentração de 10^{-3} ($p < 0,0001$). Já para nanopartículas brancas, a concentração de 10^{-2} ($p < 0,05$) foi estatisticamente menor comparada com a concentração de 10^{-3} ($p < 0,0001$).

Figura 7.9.3 - Formação de depósitos de cálcio após 14 dias de experimento.

(Magnificação de 100x)

Figura 7.9.4 - Diferenciação osteogênica após 14 dias

* Diferença estatística significativa em relação ao meio de diferenciação ($p < 0,05$);

****Diferença estatística significativa em relação ao meio de diferenciação ($p < 0,0001$);

Diferença estatística significativa em relação SN 10-2 ($p < 0,0001$);

No período de 21 dias após estimulação, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o meio osteogênico e o meio controle de

diferenciação ($p < 0,0001$). Foram observadas diferenças estatísticas significantes para sinvastatina em nanopartículas nas concentrações de 10^{-2} e 10^{-3} ($p < 0,0001$).

Figura 7.9.5 - Formação de depósitos de cálcio após 21 dias de experimento

(Magnificação de 100x)

Figura 7.9.6 - Formação de depósitos de cálcio após 21 dias de experimento

*** Diferença estatística significativa em relação ao meio de diferenciação ($p < 0,001$);

**** Diferença estatística significativa em relação ao meio de diferenciação ($p < 0,0001$).

8 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 consequente melhora a eficácia terapêutica. Os nanocarreadores podem ainda diminuir a toxicidade de formulações comuns e controlar sua liberação (Arayne et al., 2006).

Baseado em estudos prévios que sugerem efeitos benéficos no tecido ósseo, as nanopartículas de PDLLA foram usadas no presente estudo como veículo de entrega de sinvastatina, com o intuito de avaliar o efeito desta associação na proliferação e diferenciação osteoblástica dessas células (Maeda et al, 2004; Mundy 1999).

Autores sugerem que o uso crônico por via oral, mesmo em baixas doses que são as recomendadas para reduzir os níveis de colesterol no sangue, apresenta os efeitos pleiotrópicos de melhora da densidade óssea e redução do risco de fraturas (Whang, et al., 2000; Maeda, et al., 2001), além de evitar a perda óssea inflamatória em modelo de doença periodontal experimental em ratos (Dalcico et al. ,2012).

Em contrapartida, outros pesquisadores afirmam que o uso da sinvastatina por via oral é insuficiente para, em curto período de tempo, aumentar a osteogênese, visto que as concentrações e a posologia utilizadas para este fim, devido à sua seletividade hepática e pobre distribuição para a periferia, fazem com que concentrações muito baixas do fármaco cheguem ao osso (Ayukawa et al., 2010; Tai et al., 2013; Venkatesan et al., 2019).

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 pesquisas 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; Tai et al., 2013; Venkatesan et al., 2019).

Ao investigar através de uma revisão sistemática se a ação benéfica das estatinas no tecido ósseo poderia melhorar a osseointegração em torno de implantes de titânio concluem que apesar dos dados dos estudos incluídos apontarem para

benefícios, seria necessária uma padronização de doses para se esclarecer o papel das estatinas na osseointegração (Sendyk et al., 2016).

Em recente revisão sistemática e metanálise Bertl e colaboradores (2019) inferiram que o uso local ou sistêmico de estatinas não resultou em efeitos adversos graves, além de ter um efeito positivo no tratamento periodontal. No entanto, nem todas as estatinas disponíveis foram testadas até o momento, e mais pesquisas são necessárias para identificar a concentração / dose efetiva máxima e o transportador ideal.

Diversos trabalhos na literatura têm investigado diferentes carreadores para a entrega local de sinvastatina, como gelatina (Kiliç et al., 2008), sulfato de cálcio (Nyan, et al., 2007) nanopartículas de PLGA (Hoet 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* (Yunos et al., 2013). Essas características nos motivaram a investigar a ação direta de nanopartículas de PDLLA, carregadas com sinvastatina, em PDLSC's.

Considerando a perspectiva de aplicação local de sinvastatina, nossos estudos buscaram determinar as concentrações viáveis de nanopartículas carregadas com sinvastatins (SN), ou seja, concentrações que não fossem tóxicas para as PDLSC's sem cultura. Para tanto, avaliamos a viabilidade dessas células, quando incubadas com SN, através do ensaio colorimétrico de MTT. Foi observada, após 24 e 48 horas, viabilidade celular preservada quando utilizadas concentrações de sinvastatina iguais ou abaixo de $10^{-2}\mu\text{M}$, o que corrobora com estudos anteriores (Whang, et al., 2005; Tai et al., 2013; Venkatesan et al., 2019).

Um estudo *in vitro* indica 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 et al., 2001). Em 2013, Pullisaar e colaboradores testaram uma esponja de dióxido de titânio (TiO_2) em culturas primárias de osteoblastos associada a diversas concentrações de sinvastatina e observaram uma viabilidade aceitável apenas em concentrações abaixo de $10\mu\text{M}$.

Acreditamos que a redução na viabilidade celular em concentrações maiores que $10^{-2}\mu\text{M}$ observada no presente trabalho podem ter reduzido drasticamente a do colesterol que é uma 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 as concentrações $10^{-2}\mu\text{M}$ e $10^{-3}\mu\text{M}$ de sinvastatina, encapsulada em nanopartículas (SN), uma vez que se apresentou viável em 24, 48, 72 e 144h, tempo de liberação do fármaco. Além disso, estas foram as menores concentrações capazes estimular de estimular a atividade de osteoblastos já descritas (Helenet al., 2013; Pullisaar et al., 2014).

Em 2013, Qi e colaboradores fizeram um estudo em tibia 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.

Diferente do estudo atual, Lee e colaboradores (2019) ao analisarem a deposição de cálcio, não observaram aumento na coloração com vermelho de alizarina, apesar de o seu estudo ter demonstrado que a aplicação da sinvastatina melhorou a expressão de colágeno tipo I e Runx2.

No presente trabalho, no período de 21 dias após o estímulo, foi observado diferença estatisticamente significativa entre o meio osteogênico e o meio controle de diferenciação ($p < 0,05$), o que confirmou nossa hipótese, uma vez que foi observado um aumento significativo na coloração para vermelho de alizarina nos grupos cultivados com nanopartículas carregadas com sinvastatina. Esses resultados estão em concordância com trabalhos recentes que apontam para o aumento da deposição de cálcio associado ao efeito da sinvastatina no metabolismo ósseo (Qi et al., 2013).

Estudos indicaram que as estatinas exercem efeitos anabólicos ósseos e podem ser usadas como agentes osteocondutores em engenharia de tecidos ósseos (Tai et al., 2013). Por a sinvastatina ser um pó e pouco solúvel em meio de cultivo celular, para avaliar a citotoxicidade da nanoesfera em comparação à sinvastatina pura, a solução foi dissolvida em DMSO e SBF e observamos que a sinvastatina pura se mostra citotóxica quanto comparada com a mesma concentração de nanoesfera, como no estudo anterior de Tai e colaboradores (2015).

A sinvastatina em liberação lenta não alterou a viabilidade celular. E a biodegradação do veículo possibilitou a liberação da sinvastatina sustentada por até 6 dias no presente estudo, assim como em um sistema de micropartículas de liberação lenta de trabalho anterior (Ficher et al., 2014).

Nossos resultados sublinham a sugestão de que os efeitos da sinvastatina são sensíveis à dose, ao tipo e tempo de liberação o que poderia explicar os resultados parcialmente controversos mostrados em muitos estudos. As nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina causaram um aumento no depósito de cálcio, sugerindo que esse pode ser um biomaterial promissor para osteoindução, reiterando o potencial osteogênico da sinvastatina. No entanto, novos estudos são necessários a fim de se verificar a ação dessa associação entre nanopartícula de PDLLA e sinvastatina, na melhora dos parâmetros ósseos *in vivo*, podendo representar uma estratégia promissora para a regeneração do tecido ósseo.

9 CONCLUSÕES

- a) 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. As nanopartículas carregadas com 10^{-2} μ M de sinvastatina não apresentaram citotoxicidade e aumentaram de forma significativa a atividade celular.
- b) As nanopartículas de PDLLA carregadas com sinvastatina causaram um aumento no depósito de cálcio, sugerindo que esse pode ser um biomaterial promissor para osteoindução *in vivo*, reiterando o potencial osteogênico da sinvastatina.

REFERÊNCIAS¹

American Academy of Periodontology – APP. Glossary of periodontal terms. 4th ed. Chicago: APP; 2001.

Arayne MS, Sultana N. Porous nanoparticles in drug delivery systems. *Pak J Pharm Sci.* 2006 Apr;19(2):158-69. Review. PubMed PMID: .

Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Mar;107(3):336-42. doi:10.1016/j.tripleo.2008.07.013. Epub 2008 Sep 17. PubMed PMID: 18801677.

Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *J Oral Rehabil.* 2010 Feb;37(2):123-30. doi:10.1111/j.1365-2842.2009.02011.x. Epub 2009 Nov 2. PubMed PMID: 19889034.

Bertl K, Steiner I, Pandis N, Buhlin K, Klinge B, Stavropoulos A. Statins in non-surgical and surgical periodontal therapy. A systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo trials. *J Periodontol Res.* 2018 Jun;53(3):267-287. doi: 10.1111/jre.12514. Epub 2017 Dec 6. PubMed PMID: 29211309. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*; 2003. May 15;423(6937):337-42.

Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res.* 2014 Apr;93(4):335-45. doi: 10.1177/0022034513518561. Epub 2014 Jan 3. Review. PubMed PMID: 24389809.

Diniz IMA, Carreira ACO, Sipert CR, Uehara CM, Moreira MSN, Freire L, Pelissari C, Kossugue PM, de Araújo DR, Sogayar MC, Marques MM. Photobiomodulation of mesenchymal stem cells encapsulated in an injectable rhBMP4-loaded hydrogel directs hard tissue bioengineering. *J Cell Physiol.* 2018 Jun;233(6):4907-4918. doi: 10.1002/jcp.26309. Epub 2018 Jan 15. PubMed PMID: 29215714.

Fisher PD, Palomino P, Milbrandt TA, Hilt JZ, Puleo DA. Improved small molecule drug release from in situ forming poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds incorporating poly(β -amino ester) and hydroxyapatite microparticles. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(11):1174-93. doi: 10.1080/09205063.2014.923368. Epub 2014 Jun 6. PubMed PMID: 24903524; PubMed Central PMCID: PMC4106901.

Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique.. New York: 2005.

Freshney RI. Basic principles of cell culture. Hoboken: John Wiley & Sons; 2006.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000

¹De acordo com o Estilo Vancouver

Dec5;97(25):13625-30. PubMed PMID: 11087820; PubMed Central PMCID: PMC17626.

Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2014 Jun;59Suppl 1:117-30. doi: 10.1111/adj.12100. Epub 2013 Sep 23. Review. PubMed PMID: 24111843.

Heino TJ, Hentunen TA. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2008 May;3(2):131-45. Review. PubMed PMID: 18473879.

Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis*. 2018 Jul;24(5):696-705. doi: 10.1111/odi.12703. Epub 2017 Jul 24. Review. PubMed PMID: 28636235.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):165-76. PubMed PMID: 9568710.

Lee H, Lee H, Na CB, Park JB. The effects of simvastatin on cellular viability, stemness and osteogenic differentiation using 3-dimensional cultures of stem cells and osteoblast-like cells. *Adv Clin Exp Med*. 2019 May;28(5):699-706. doi: 10.17219/acem/94162. PubMed PMID: 30729760.

Liu S, Bertl K, Sun H, Liu ZH, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells. *Hum Cell*. 2012 Jun;25(2):29-35. doi: 10.1007/s13577-011-0028-x. Epub 2012 Mar 8. PubMed PMID: 22399266.

Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):681-92. PubMed PMID: 12538631.

Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 2006 Nov;85(11):966-79. Review. PubMed PMID: 17062735; PubMed Central PMCID: PMC2571078.

Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol*. 2008 Jan;36(1):43-8. doi:10.1177/0192623307310946. Review. PubMed PMID: 18337220.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25. PubMed PMID: 12716973; PubMed Central PMCID: PMC156282.

Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008 Jun;12(2):113-8. doi: 10.1007/s00784-007-0170-8. Epub 2008 Jan 3. Review. PubMed PMID: 18172700.

Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1946-9. PubMed PMID: 10583956.

Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*. 2007 Aug;104(4):384-6. PubMed PMID: 17721043.

Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*. 2009 Sep;45(3):505-11. doi: 10.1016/j.bone.2009.05.010. Epub 2009 May 21. PubMed PMID: 19464400.

Pullisaar H, Reseland JE, Haugen HJ, Brinchmann JE, Ostrup E. Simvastatin coating of TiO₂ scaffold induces osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Apr 25;447(1):139-44. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.133. Epub 2014 Apr 2. PubMed PMID: 24704451.

Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*; 2003. 26:726-737.

Sendyk DI, Deboni MC, Pannuti CM, Naclério-Homem MG, Wennerberg A. The influence of statins on osseointegration: a systematic review of animal model studies. *J Oral Rehabil*. 2016 Nov;43(11):873-882. doi: 10.1111/joor.12438. Epub 2016 Sep 29. Review. PubMed PMID: 27611923.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Jul 10-16;364(9429):149-55. PubMed PMID: 15246727.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):166-71. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021. PubMed PMID: 18215674; PubMed Central PMCID: PMC2714367.

Sowmya S, Chennazhi KP, Arzate H, Jayachandran P, Nair SV, Jayakumar R. Periodontal Specific Differentiation of Dental Follicle Stem Cells into Osteoblast, Fibroblast, and Cementoblast. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Oct;21(10):1044-58. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0603. Epub 2015 Jun 22. PubMed PMID: 25962715.

Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, Marx DB, Cullen DM, Reinhardt RA. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11):1861-70. PubMed PMID: 16274305; PubMed Central PMCID: PMC1350642.

Tai IC, Fu YC, Wang CK, Chang JK, Ho ML. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. *Int J Nanomedicine*.

2013;8:3895-904. doi: 10.2147/IJN.S48694. Epub 2013 Oct 11. PubMed PMID:24143094; PubMed Central PMCID: PMC3798145.

Venkatesan N, Liyanage ADT, Castro-Núñez J, Asafo-Adjei T, Cunningham LL, Dziubla TD, Puleo DA. Biodegradable polymerized simvastatin stimulates bone formation. *ActaBiomater*. 2019 Jul 15;93:192-199. doi: 10.1016/j.actbio.2019.04.059. Epub 2019 May 2. PubMed PMID: 31055123; PubMedCentral PMCID: PMC6615997.

Yunos DM, Ahmad Z, Salih V, Boccaccini AR. Stratified scaffolds for osteochondral tissue engineering applications: electrospun PDLLA nanofibre coated Bioglass®-derived foams. *J Biomater Appl*. 2013 Jan;27(5):537-51. doi:10.1177/0885328211414941. Epub 2011 Nov 16. PubMed PMID: 22090433.

Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*. 2009 Dec 15;183(12):7787-98. doi: 10.4049/jimmunol.0902318. Erratum in: *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1656. PubMed PMID: 19923445; PubMed Central PMCID: PMC2881945.

Zhang M, Bian YQ, Tao HM, Yang XF, Mu WD. Simvastatin induces osteogenic differentiation of MSCs via Wnt/ β -catenin pathway to promote fracture healing. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 May;22(9):2896-2905. doi:10.26355/eurrev_201805_14992. PubMed PMID: 29771446.

Zhao BJ, Liu YH. Simvastatin induces the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014 Oct;28(5):583-92. doi: 10.1111/fcp.12050. Epub 2013 Nov 8. PubMed PMID: 24112098.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DO LIGAMENTO PERIODONTAL QUANDO CULTIVADAS COM NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM SINVASTATINA.

Pesquisador: PRISCILA LUCENA MENDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 93368518.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.943.891

Apresentação do Projeto:

Devido às dificuldades de obtenção de células-tronco embrionárias e considerando os aspectos éticos e legais, inúmeros pesquisadores têm realizado estudos com células-tronco adultas. Visando promover a diferenciação osteogênica e melhorar o processo de reparo ósseo, tem-se associado células-tronco do ligamento periodontal à sinvastatina, um fármaco usado clinicamente para o tratamento da hipercolesterolemia, mas que exibe o efeito pleiotrópico de osteoindução. Acredita-se que este efeito pleiotrópico associado a um sistema de liberação controlada do fármaco pode levar a um aumento na osteoindução de células tronco. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do ligamento periodontal, quando cultivadas em meio indutor específico, carregadas com nanopartículas de sinvastatina com diâmetro aproximado de 123nm. As culturas serão submetidas aos tratamentos dos grupos experimentais: 1) Grupo controle: Células-tronco do ligamento periodontal apenas no meio de cultura completo; 2) Grupo nanopartícula (NP): Células-tronco receberão a formulação de nanopartículas sem sinvastatina; 3) Grupo nanopartículas carregadas com sinvastatina (NP-SIN): Células tronco

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.943.891

do ligamento periodontal receberão a formulação da sinvastatina encapsulada em nanopartículas poliméricas de PDLLA(NP-SIN). A sinvastatina encapsulada será submetida ao teste de liberação para se avaliar o tempo de liberação progressiva e degradação do fármaco. Proliferação e viabilidade celular serão avaliadas nas concentrações 10-5 M, 10-4 M, 10-3 M, 10-2M, 10-1M, 1M, 10 M e 102 Matravés do ensaio de MTT, enquanto o efeito da nanopartícula de sinvastatina na ativação dessas células será avaliado através do ensaio de mineralização, da mensuração dos níveis de fosfatase alcalina óssea no meio de cultura por ELISA, e da sua expressão protéica por WerternBlotting. Para avaliação da capacidade de diferenciação das células do ligamento periodontal, a linhagem osteogênica das células será confirmada pela habilidade de calcificação comprovada pela marcação positiva com Vermelho de Alizarina. Será estudado, ainda, o mecanismo de ação da nanopartícula polimérica de sinvastatina no metabolismo ósseo através de imunofluorescência e Western Blot para RANK-L, OPG E BMP-2. A análise estatística será realizada por meio de variância ANOVA.PALAVRAS-CHAVE: Células tronco do ligamento periodontal, sinvastatina, nanopartículas poliméricas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a diferenciação osteogênica de células-tronco do ligamento periodontal quando cultivadas com nanopartículas carregadas com sinvastatina in vitro.

Objetivo Secundário: a) Investigar os efeitos das diferentes concentrações de sinvastatina na viabilidade e proliferação de células-tronco do ligamento periodontal através do ensaio 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)- 2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) b) Avaliar o efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina na ativação de osteoblastos a partir de ensaio de mineralização e da expressão e liberação de fosfatase alcalina.c) Avaliar o efeito das nanopartículas carregadas com sinvastatina no metabolismo de osteoblastos, através da investigação da expressão protéica de BMP-2, osteoprotegerina (OPG) e RANK-L através de Western blot e imunofluorescência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco envolvido ao paciente que aceite participar desta pesquisa é mínimo, porque todo o procedimento de raspagem será feito após o dente ser extraído.

Benefícios:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.943.891

O participante da pesquisa terá atendimento odontológico gratuito, dentro do que é oferecido aos pacientes da clínica integrada. É livre para recusar-se a participar, retirar o consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios. Esta pesquisa irá colaborar no desenvolvimento da área de periodontia, farmacologia e cirurgia, através do melhor entendimento do mecanismo da sinvastatina sobre as células-tronco da gengiva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desenho do projeto é apropriado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados de forma correta.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1148864.pdf	01/10/2018 17:48:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	01/10/2018 17:48:09	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
Cronograma	cronograma_priscila.pdf	01/10/2018 17:47:01	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
Folha de Rosto	Plataforma_Priscila.pdf	18/09/2018 10:39:36	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_PRISCILA_1.pdf	10/07/2018 12:15:51	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.943.891

Justificativa de Ausência	TCLC_PRISCILA_1.pdf	10/07/2018 12:15:51	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_LABORATORIO.pdf	24/06/2018 21:12:25	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CLINICA_.pdf	24/06/2018 21:11:55	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	UFG.pdf	24/06/2018 21:10:25	PRISCILA LUCENA MENDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da diferenciação osteogênica de células mesenquimais do ligamento periodontal quando cultivadas com nanopartículas carregadas com sinvastatina.

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Priscila Lucena Mendes

COLABORADORES: *Prof. Dr. Carlos Alberto Adde e Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira.* **ORIENTADOR:** *Dr. Carlos Alberto Adde.*

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

LOCAL: Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

CONTATO: (11)959407535 ou (11) 3091-7813

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”,
CEP: 05508-900

Convite para participação voluntária:

Você está sendo convidado para participar, voluntariamente, ou seja, se você quiser, dessa pesquisa, e se em algum momento, desejar parar de participar, você tem total liberdade para retirar esse consentimento, sem prejuízo algum na continuidade do seu tratamento. Antes de qualquer coisa é necessário que você leia atentamente as informações que estão neste documento.

OBJETIVOS DO ESTUDO: Esclarecer, por meio de pesquisa laboratorial, qual a concentração ideal de sinvastatina em nanopartículas, de liberação controlada, carregadas com esse medicamento induziria a formação de osso em células-tronco da gengiva.

SELEÇÃO DE PARTICIPANTES: Serão selecionados 10 participantes que forem extrair os terceiros molares no ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOPUSP) na disciplina de clínica integrada.

Crítérios de inclusão: Pacientes com idade entre 20 e 35 anos, sem histórico de doenças graves que estejam passando por atendimento na clínica da disciplina de clínica integrada da Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo (FOPUSP).

Crítérios de exclusão: Serão excluídos os pacientes que tenham sido avaliados pelo cirurgião-dentista com os respectivos terceiros molares com cárie e processo inflamatório.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

PROCEDIMENTOS: Os procedimentos clínicos realizados, caso o/a senhor (a) aceite participar da pesquisa, serão exatamente os que já são realizados durante extrações de dentes pelos profissionais da clínica Integrada da FOU SP. Após concordar em participar desta pesquisa ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, irá doar os dentes recém extraídos para que algum membro da equipe da pesquisa raspe parte da raiz do dente e então armazene o material em local apropriado para futuras análises laboratoriais

TEMPO: O tempo necessário para a realização dessa pesquisa será de aproximadamente 10 (dez) minutos e após realizada o/a senhor (a) continuará o tratamento normal na clínica Integrada da FOU SP.

BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO: Não haverá benefícios diretos para o (a) participante da pesquisa, porém essa pesquisa permitirá avaliar se o medicamento sinvastatina induz a diferenciação de células-tronco da gengiva em células ósseas. Esperamos com este projeto gerar conhecimento científico de qualidade em um tema relevante para a saúde pública, tendo em vista que a perda dentária associada à reabsorção óssea atinge grande parte da população brasileira. Queremos, ainda, contribuir substancialmente com a área de farmacologia e cirurgia comprovando que um medicamento de menor custo pode ajudar na formação de osso.

RISCOS E DESCONFORTOS: O risco envolvido a você paciente que aceite participar desta pesquisa é mínimo, porque todo o procedimento de raspagem será feito após o dente ser extraído. O desconforto é semelhante ao de uma extração de terceiro molar (Ex: dor ao mastigar na região operada após cirurgia).

AJUDA DE CUSTO: Não haverá nenhum custo extra ao participante para a realização desta pesquisa.

RESSARCIMENTO: As despesas que o (a) participante da pesquisa e seu (sua) acompanhante, exclusivamente, tiverem de locomoção e alimentação serão ressarcidos.

ASSISTÊNCIA EM VIRTUDE DE DANOS DECORRENTES DA PESQUISA/ INDENIZAÇÃO: O (a) participante da pesquisa receberá assistência integral e imediata, de forma gratuita pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrente da pesquisa. O (a) participante da pesquisa tem direito a indenização em caso de danos decorrentes do estudo.

GARANTIA DO SIGILO DA IDENTIDADE DO (A) PARTICIPANTE DA PESQUISA: As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. O (a) participante da pesquisa não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

DESISTÊNCIA: O (a) participante da pesquisa tem o direito de desistir desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável

REUTILIZAÇÃO DOS DADOS OU MATERIAL BIOLÓGICO:

O/A senhor (a) autoriza a utilização dos dados ou amostra de gengiva coletada em outras pesquisas:

- () NÃO autorizo a utilização de dados ou amostra de gengiva coletados em outra pesquisa. Então, caso seja, o material biológico este será descartado.
 () SIM autorizo a utilização de dados ou amostra de gengiva coletados em outra pesquisa.

Para utilizar os dados ou amostra de gengiva coletados em outra pesquisa o sujeito da pesquisa quer ser consultado:

- () NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou amostra de saliva coletados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.
 () SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou amostra de saliva coletados em outra pesquisa.

FORMA DE CONTATO: O participante voluntário terá garantia de que receberá respostas a quaisquer perguntas ou esclarecimento dos procedimentos. Também estaremos à disposição para qualquer informação ou queixa de sua parte, nos seguintes telefones: (11) 959407535 ou (11) 3091-7813.

Se o/a senhor (a) tiver dúvidas quanto à ética da pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia:

Av. Prof. Lineu Prestes 2227 - Cidade Universitária, CEP 05508-000, São Paulo - SP
 Telefone (11) 30917960 - E-mail: cepfo@usp.br

Consentimento Livre Esclarecido por escrito:

EU _____, RG _____, certifico que, tendo lido as informações e sido suficientemente esclarecido sobre os itens da pesquisa: *“AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DO LIGAMENTO PERIODONTAL QUANDO CULTIVADAS COM NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM SINVASTATINA.”* de responsabilidade da pesquisadora Priscila Lucena Mendes, sob orientação e colaboração do Prof. Dr. Carlos Alberto Addee da Profa. Dra. MarinellaHolzhausen Caldeira plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, com a minha colaboração espontânea.

 Assinatura do participante

 Assinatura do pesquisador responsável

São Paulo, __/__/__ Nome: _____