

Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da citotoxicidade de microesferas de PLGA com sinvastatina encapsulada

Gabriela Ribeiro Sumar



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Gabriela Ribeiro Sumar

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MICROESFERAS DE
PLGA COM SINVASTATINA ENCAPSULADA**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza
Magini

Florianópolis

2018

Gabriela Ribeiro Sumar

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MICROESFERAS DE
PLGA COM SINVASTATINA ENCAPSULADA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

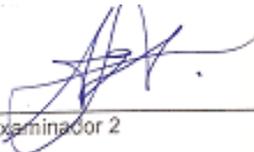
Florianópolis, 5 de junho de 2018.

Banca Examinadora:



Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Presidente da Banca Examinadora (Orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina



Examinador 2

Prof. Dr. Águedo Aragoes
Universidade Federal de Santa Catarina



Examinador 1^a

Mestranda Suzeli Dias
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo apoio e amor que sempre
deram a mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por iluminar meus caminhos, sempre me guiar nas escolhas da vida e por me cercar de pessoas tão especiais, que tornam as dificuldades mais leves e a vida mais prazerosa.

Aos meus pais, **Sônia e Marcos**, não existem palavras para expressar a imensa gratidão que sinto por tudo que sempre fizeram para proporcionar o que há de melhor a mim e ao meu irmão. Agradeço por serem meu maior porto seguro, por sempre apoiarem minhas escolhas e me incentivarem a seguir em frente independente de qualquer coisa. Vocês são para mim o maior exemplo de amor, cumplicidade e integridade que tenho. A vocês, meu mais sincero obrigada!

Ao meu irmão, **Leandro**, obrigada pela amizade que temos, por todas as horas de conversas e brincadeiras depois de um dia exaustivo. Você me entende e me faz acreditar que sou capaz daquilo que nem eu mesma acredito.

À minha avó, **Nina**, por cuidar tão bem da nossa família e dedicar boa parte de seu tempo à nós. Ter você em nossa casa é sinônimo de alegria, obrigada por tornar nossos dias menos “sérios”.

Agradeço aos **demais familiares**, por serem tão presentes em minha vida, estar com vocês é sempre uma certeza de que sou amada. Ter vocês como família é um privilégio e eu sou muito grata por isso.

Ao meu namorado e melhor amigo, **Ícaro**, que mesmo quando longe sempre se fez presente de alguma forma. Obrigada por trazer paz em meio aos meus desesperos, por acreditar em mim e me incentivar em tudo o que eu faço. Obrigada por me fazer enxergar as dificuldades com outros olhos e a viver valorizando cada aprendizado. Sou imensamente grata por ter você e sua família na minha vida.

Às minhas amigas da graduação **Maria Eduarda, Samanta e Tarla**, por terem sido muito mais que amigas durante todo o curso, mas irmãs. Obrigada pela companhia de todos os dias, por compartilharem comigo alegrias e tristezas, pela troca de conhecimento e experiências vividas não só na faculdade, mas as fora dela também. Aprender ao lado de vocês e, com vocês, durante todos esses anos foi um privilégio. Sou grata pelo carinho e consideração sempre demonstrados, que a distância nunca seja um obstáculo para nossa amizade.

À **Clara**, amiga que ganhei na faculdade e com quem posso contar até hoje, mesmo fora dela. Sou muito grata pela sua generosidade, por dedicar horas do seu tempo a mim sempre que precisei. Você com certeza foi um presente que a UFSC me trouxe.

Ao **Gustavo**, colega da vida e que o curso veio a nos aproximar. Agradeço pela paciência durante os anos de graduação, por sempre ouvir minhas angústias e acreditar em mim, muitas vezes até, mais do que eu mesma. Você sempre me incentivou e me ensinou a ver as situações de forma mais simples. Muito obrigada!

À minha amiga **Alexia**, por estar sempre ao meu lado, por me ouvir e tentar me entender em todas as situações. Obrigada por somar momentos bons aos meus e dividir os ruins também! Você sempre se preocupa comigo e sou muito grata por isso! Saber que tenho sua amizade é um conforto para mim.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, pela oportunidade dada. Trabalhar com pesquisa durante minha graduação não fazia parte dos meus planos e você, além de me apresentar essa alternativa, me fez acreditar, em meio a tantas dificuldades, que eu seria capaz de realizá-la. Serei sempre grata pelo carinho e por toda a confiança que depositaste em mim. Aproveito para agradecer também, a **Nathalia Jordão**, colega que iniciou os estudos dos quais dei continuidade. Foi através do trabalho e pesquisas desenvolvidos pela Nathalia, durante seu mestrado, que obtive ajuda para o desenvolver este estudo.

Ao **Prof. Dr. Águedo Aragones**, sempre tão gentil e atencioso. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo e estar presente no laboratório durante a primeira etapa desta pesquisa. Sua contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

À **Prof. Dra. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz**, por todo suporte concedido durante a etapa final desta pesquisa. Infelizmente não tive o prazer de ser sua aluna durante minha graduação, mas, dentre tantas coisas boas que este estudo me trouxe, conhecer você foi uma delas! Tenho muita admiração pela profissional que és, sempre muito atenciosa com todos e dedicada ao máximo com tudo que fazes e se propõe a fazer.

Às mestrandas **Suzeli Dias** e **Raissa Curtarelli** e à doutoranda **Mariane Sordi**, palavras não seriam suficientes para agradecer o tanto que vocês fizeram por mim. Sou grata por terem compartilhado comigo tanto conhecimento, por entenderem minhas dificuldades na realização desta pesquisa e também meus receios, sempre me receberam com uma palavra de carinho e incentivo, isto, com certeza, fez toda a diferença. Vocês, para mim, são exemplo de responsabilidade e persistência!

Aos **demais professores**, com quem tive o prazer de aprender durante o curso de Odontologia, a todos vocês, sem exceção, bem como a todos os **colegas da graduação** e **funcionários** com quem convivi

diariamente, muito obrigada por fazerem parte da minha trajetória acadêmica!

Concluir este trabalho me deu ainda mais certeza de que sozinho chegamos mais rápido, mas juntos vamos muito mais longe! Sem cada um de vocês, nada disso seria possível!

“ Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas! ”

(Mário Quintana, 1951)

RESUMO

A perda do elemento dental, ou até mesmo a doença periodontal e sua consequente perda óssea, fazem com que estudos por estratégias e/ou materiais regeneradores sejam frequentes na odontologia, principalmente devido a busca incessante pela estética. Devido às suas características biológicas e mecânicas, o osso exige estratégias complexas para permitir a reconstituição da sua estrutura e função. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* a biocompatibilidade de microesferas de PLGA contendo sinvastatina (SIN) para a obtenção de um biomaterial de preenchimento a ser utilizado na regeneração óssea. Para a realização desta pesquisa, outras três importantes etapas foram realizadas, sendo elas a produção, caracterização e esterilização das microesferas de PLGA com SIN encapsulada. As microesferas, com e sem SIN, foram produzidas através do método de simples emulsão e evaporação do solvente. A relação obtida e utilizada neste estudo entre fármaco e polímero foi de 0,03% m/m. A morfologia foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as amostras foram esterilizadas por meio do óxido de etileno para serem submetidas ao teste de citotoxicidade. A avaliação da citotoxicidade das microesferas de PLGA e PLGA+SIN foi realizada através do teste MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]. Além disso, foram utilizadas linhagens de fibroblastos L929 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 2593™), pré-osteoblastos MC3T3-E1 subclone 4 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 2593™) e células-tronco obtidas por cultura primária de tecido adiposo de bolas de Bichat. Os testes foram

realizados em triplicata, utilizando placas de 96 cavidades, onde as células foram cultivadas a uma densidade de 2×10^4 por cavidade, e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Os tempos experimentais foram de 1, 3 e 7 dias. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que tanto as amostras com SIN, quanto as sem SIN não foram tóxicas às células testadas. Portanto, pode-se sugerir que estas são promissoras ferramentas para estudos futuros de diferenciação osteogênica.

Palavras-chave: PLGA 1. Sinvastatina 2. Microesferas 3.

ABSTRACT

The loss of a dental element, or even periodontal disease and its consequent bone loss, demand that studies involving strategies or regenerative materials be frequent topics in dentistry, mainly due to the patients incessant appeal for esthetics. Because of its biological and mechanical characteristics, bone tissue requires complex strategies to allow reconstitution of its structure and function. In this sense, the aim of this study was the evaluation of the *in vitro* biocompatibility of PLGA microspheres containing simvastatin to obtain a filling biomaterial to be used in bone regeneration. For the accomplishment of this research, three other important steps were carried out: the production, characterization and sterilization of the PLGA microspheres with encapsulated simvastatin. The microspheres, with and without simvastatin, were produced by the simple method of emulsion and evaporation of the solvent. The proportion between drug and polymer obtained and used in this study was 0,03% m/m. Their morphology was obtained by scanning electron microscopy and the samples were sterilized by ethylene oxide, in order to be submitted through the cytotoxicity test. The cytotoxicity of the PLGA and PLGA+Simvastatin microspheres were evaluated by the MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] test. Besides that, strains of L929 fibroblasts (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 2593™), MC3T3-E1 subclone 4 pre-osteoblasts (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, 2593™) and stem cells obtained by primary adipose tissue culture from Bichat balls were used. Tests were performed in triplicate, using

plates of 96 cavities, where the cells were cultured at a density of 2×10^4 per cavity, and incubated at 37°C ($98,6^\circ\text{F}$) and 5% of CO_2 . Experimental times were of 1, 3 and 7 days. The results obtained were promising, since both samples (with and without simvastatin) were not toxic to the cells tested. Thus, it can be argued that they are promising instruments for future studies on osteogenic differentiation.

Keywords: PLGA 1. Simvastatin 2. Microspheres 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fibroblastos da linhagem L929.....	33
Figura 2. Osteoblastos da linhagem MC3T3-E1.....	34
Figura 3. Células tronco mesenquimais de tecido adiposo de bolas de Bichat (cultura primária).....	35
Figura 4. Placa de 96 cavidades, onde foram semeadas as células (L929, MC3T3-E1 e CTAB) e adicionadas as microesferas.....	37
Figura 5. Após os períodos experimentais, foi adicionada a solução MTS para realização do teste colorimétrico. Observe a coloração amarelada do MTS antes da reação.....	38
Figura 6. Placa após determinação espectrofotométrica de absorbância. Observe a coloração vermelho-arroxeadada do MTS após a reação.....	38
Figura 7. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).....	41
Figura 8. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina sobre osteoblastos MC3TE-E1 após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).....	42
Figura 9. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina células tronco de tecido adiposo de bolas de Bichat (CTAB) após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l – Microlitro(s)

BMP – Proteína óssea morfogenética (*Bone Morphogenetic Protein*)

CTAB – Células tronco mesenquimais de tecido adiposo de bolas de Bichat

CERMAT – Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*

Et al. – E outros (*Et alii*)

FDA – *Food and Drug Administration*

g – Grama(s)

h – Hora(s)

HMG-CoA – hidroximetilglutaril coenzima A

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*)

kV – Quilovolt (medida de tensão elétrica)

L – Litro

mg – Miligrama(s)

ml – Mililitro(s)

m/m ou w/w – relação entre massas (*weight/weight*)

mm – Milímetro

MPS – Microesferas

nm – Nanômetro

O/W – Oil-in-Water

p.a. – Para análise

PBS – Tampão salina-fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PS – Solução de penicilina/estreptomicina

PLGA – Ácido polilático-co-glicólico

PVA – Álcool polivinílico (*Polivinil acetate*)

RANKL – Receptor ativador do ligante $\text{NF}\kappa\beta$ (*Receptor activator of $\text{NF}\kappa\beta$ ligand*)

rhBMP2 – Proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (*recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

rpm – Rotação por minuto

SFB – Soro Fetal Bovino

SIN ou SIM – Sinvastatina (*Simvastatin*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

β -TCP – alfa tricálcio fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Percentagem

°C – Graus Celsius

> – Maior

± - Desvio padrão

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	18
2.	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo Geral	30
2.2	Objetivos Específicos.....	30
3.	METODOLOGIA	31
3.1	Materiais	31
3.2	Síntese das microesferas.....	31
3.3	Caracterização das microesferas.....	32
3.4	Esterilização das amostras para avaliação da citotoxicidade.....	32
3.5	Linhagens celulares e meios de cultura	42
3.5.1	Fibroblastos L929.....	33
3.5.2	Osteoblastos MC3T3-E1.....	34
3.5.3	Células tronco mesenquimais do tecido adiposo de bolas de Bichat.....	35
3.6	Teste de citotoxicidade.....	36
4.	RESULTADOS.....	39
5.	DISCUSSÃO	45
6.	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	Anexo 1.....	56

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O processo alveolar é uma estrutura dependente do dente, que se desenvolve simultaneamente à sua erupção. Após a perda dentária, o processo alveolar, que agora se pode designar de crista óssea pós-extração, sofre uma inevitável atrofia, pela inexistência de suporte nutritivo proveniente do ligamento periodontal, que ocorre tanto em altura como em largura, e que varia de pessoa para pessoa (PIETROKOVSKI e MASSLER, 1967; LEKOVIC *et al.*, 1997; CARDAROPOLI, ARAUJO e LINDHE, 2003; SCHROPP *et al.*, 2003; ARAUJO e LINDHE, 2005). Em uma revisão sistemática feita por Van Der Weijden e colaboradores em 2009, conclui-se que no período pós-extração dentária há uma perda dimensional do alvéolo, sendo a perda em largura maior que a em altura, clínica e radiograficamente (VAN DER WEIJDEN, DELL'ACQUA e SLOT, 2009). É importante saber também que, a perda de osso alveolar pode ocorrer antes mesmo da extração dentária, por doença periodontal, patologia periapical ou trauma em dentes e ossos (SCHROPP *et al.*, 2003).

Esta remodelação que o tecido ósseo sofre após a perda dentária, poderá, muitas vezes, dificultar ou, até mesmo, impossibilitar a reabilitação com implantes osseointegráveis (OLIVEIRA, 2016). Se nada for realizado para compensar a inevitável perda óssea, o indivíduo em questão poderá sofrer prejuízos funcionais e estéticos. Como tal, para reabilitar pacientes edêntulos, possuidores de rebordos ósseos atróficos, há a necessidade de recorrer a procedimentos de reconstrução óssea (CHIAPASCO, CASENTINI e ZANIBONI, 2009).

Atualmente, existe uma crescente demanda pela estética na Odontologia. Por esse motivo, é importante conseguir uma manutenção de volume ósseo adequado no local a se restaurar (GRUNDER, GRACIS e CAPELLI, 2005). Esta necessidade que existe em lançar mão de estratégias que compensem a contração da crista óssea já está bem descrita na literatura. Uma revisão sistemática realizada por Vignoletti e col. (2012) concluiu que o uso de biomateriais como substitutos ósseos no alvéolo pós-extração resultam na menor contração da crista óssea, sem apontar o uso de um biomaterial específico (VIGNOLETTI *et al.*, 2012).

O substituto ósseo ideal não deve apenas estimular nova formação óssea e promoção da neovascularização, mas também deve ter baixa taxa de substituição para manter a estabilidade do volume durante a remodelação em curso ao longo do tempo (BROGGINI *et al.*, 2015). Quando se pretende obter uma maior estabilidade de volume nas regiões enxertadas deve-se optar por biomateriais que possuam uma taxa lenta de reabsorção como os xenógenos ou os cerâmicos (JUNG *et al.*, 2013; ARAUJO *et al.*, 2015; BROGGINI *et al.*, 2015).

As propriedades desejáveis dos biomateriais, quando utilizados em procedimentos de regeneração óssea associado à colocação de implantes, sujeitos a cargas estáticas e dinâmicas são: biocompatibilidade; condutividade e/ou indutividade na cicatrização da região cirúrgica; homeostasia dos tecidos periimplantares; completa ausência de antigenicidade; o biomaterial deve servir como um arcabouço para crescimento capilar (tecidual); e substituição por tecido ósseo neoformado (LEMONS, 2004).

Enxertos de osso autógeno, apesar de considerado excelente escolha para procedimentos regenerativos, por ser o único material a ter os três mecanismos de formação óssea (osteoindução, osteocondução e osteogênese), apresentam algumas desvantagens, tais como limitada disponibilidade, morbidade da área doadora e tendência à reabsorção parcial (VALENTINI *et al.*, 1998; WANG, 2003; MCALLISTER e HAGHIGHAT, 2007). Motivos estes, que nos levam a estudar biomateriais alternativos para preencher esta lacuna ou até mesmo somar a essas limitações, uma vez que a evidência científica não é explícita no que diz respeito ao tipo de biomaterial ou abordagem cirúrgica a serem usados (VIGNOLETTI *et al.*, 2012).

Frente as dificuldades encontradas na técnica de obtenção do osso autógeno, têm sido criadas constantemente alternativas de biomateriais de enxerto ósseo em diversas apresentações (HAMMERLE e KARRING, 1998; CORDEIRO *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2010). Dentre esses produtos, encontra-se o copolímero Poli L-ácido láctico-co-glicólico (PLGA), um polímero sintético, biorreabsorvível, biocompatível, com excelentes propriedades físico-químicas, sendo um bom material osteocondutor (GOMEZ *et al.*, 2006; LANSMAN *et al.*, 2006; MOTTA e DUEK, 2006).

O PLGA tem aplicação clínica diversificada, seja na medicina, farmacologia ou odontologia, onde tem sido mais usado como arcabouço de osso e membranas (MOTTA e DUEK, 2006), em função de suas características como: biocompatibilidade, degradação e reabsorção em meio aquoso (SCHALDACH, 2000). O uso de microesferas de PLGA tem sido reportado como sistemas de dispersão de fármacos e em procedimentos regenerativos (BAO *et al.*, 2011). Uma

vez que não possui proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e portanto não são capazes de induzir a célula mesenquimal indiferenciada, presente na área receptora, a se transformar em uma célula formadora de osso, um osteoblasto. O uso das proteínas morfogenéticas exógenas (rhBMP-2) como fatores de crescimento na regeneração óssea se apresenta como uma alternativa de tratamento, embora seja de custo e risco elevados (MOTTA e DUEK, 2006).

A utilização de uma dosagem única de rhBMP-2 exógena tem sido questionada por não induzir o estímulo adequado à osteoindução, devido à sua rápida meia vida, principalmente quando existem grandes defeitos ósseos ou quando o potencial biológico do hospedeiro está de alguma forma comprometido (DRAGOO *et al.*, 2003; JUNG, THOMA e HAMMERLE, 2008) e por ser requerido uma quantidade seis vezes maior que a BMP endógena (SERVICE, 2000), além de ser uma modalidade de tratamento que apresenta alto custo e riscos, dentre eles destacam-se a falta de controle na atuação desses fatores (devido à cinética de liberação complexa), o uso de dosagens não fisiológicas, a duração da expressão dos genes, imunogenicidade e segurança a longo prazo, o que exige cautela na sua utilização (BODEN, 1999; CASAGRANDE *et al.*, 2011; RIOS *et al.*, 2011).

Por esses motivos, têm-se procurado outras alternativas com menores custos e riscos, que sejam capazes de promover a osteoindução, regulando favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos e conseguindo, assim, realizar a osteogênese e associá-los a substitutos osteocondutores, sem que haja prejuízo para a efetividade da regeneração óssea.

Como alternativa osteoindutora, têm-se estudado e utilizado as estatinas, que já são aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA), tão comumente usadas para diminuição do colesterol e com custo reduzido 16.000 vezes frente às rhBMP-2, devido sua fácil sintetização (MUNDY *et al.*, 1999). As estatinas são moléculas menores, estáveis, não susceptíveis à degradação proteolítica. Elas são responsáveis pela diminuição da síntese do colesterol e a sua ampla utilização deve-se à sua capacidade de inibir a redutase da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato e impedindo, assim, a síntese do colesterol endógeno (ZHANG, DRICU e SJOVALL, 1997). Porém, uma alta concentração local de estatinas pode ser tóxica devido à redução drástica da produção de colesterol, substância importante na manutenção da integridade das membranas celulares (WHANG *et al.*, 2005).

A redução dos níveis de colesterol é acompanhada de efeitos benéficos secundários, designados pleiotrópicos, acompanhados por numerosos efeitos cardioprotetores, que afetam quase todo o processo de aterogênese, desde a injúria endotelial inicial até a progressão e reparo das lesões de aterosclerose, além de influenciar a agregação plaquetária e a deposição de trombos (LACOSTE *et al.*, 1995; DUBUC *et al.*, 2004). Destacam-se ainda sua ação anti-inflamatória e antioxidante (SAKODA *et al.*, 2006; NAKA *et al.*, 2008), a supressão da ativação de linfócitos T (KWAK *et al.*, 2000), o estímulo à angiogênese (KUREISHI *et al.*, 2000) e a redução dos peptídios amiloides relacionados ao mal de Alzheimer (FASSBENDER *et al.*, 2001; KOJRO *et al.*, 2001).

A SIN, forma mais estudada das estatinas, foi descrita pela primeira vez como estimulador da formação óssea *in vivo* por Mundy et al. em 1999, ao ser injetada subcutaneamente na calvária de ratos. Além de obterem aumento na largura óssea, houve também aumento do volume de osso esponjoso na tíbia quando administrada oralmente. Seu efeito aumentou o nível de expressão de BMPs nas células ósseas e estimulação da formação óssea (MUNDY *et al.*, 1999; MAEDA *et al.*, 2001; OHNAKA *et al.*, 2001; SUGIYAMA *et al.*, 2005; MACIEL-OLIVEIRA, BRADASCHIA-CORREA e ARANA-CHAVEZ, 2011).

Maciel-Oliveira et al. (2011) avaliaram o uso de sinvastatina em um gel de polietilenoglicol contendo 2,5 % de sinvastatina em defeitos ósseos criados na mandíbula de ratos. Devido ao diâmetro favorável (0,8mm) o preenchimento do defeito ocorreu nos grupos com e sem tratamento. Porém, observou-se uma formação óssea mais rápida nos defeitos tratados com sinvastatina, que apresentaram tecido ósseo neoformado com um aspecto mais organizado, além da ausência de osteoclastos (MACIEL-OLIVEIRA, BRADASCHIA-CORREA e ARANA-CHAVEZ, 2011).

Um estudo *in vitro*, mostrou também que as estatinas são capazes de inibir a reabsorção óssea por meio da supressão da cascata do mevalonato, bloqueando moléculas essenciais a atividade osteoclástica (STAAL *et al.*, 2003), como demonstrado em um estudo realizado por Moon *et al.* (2011), em que inibiu a sinalização induzida pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) o que, por sua vez, acarretou na inibição de formação de osteoclastos, que é induzida pela cascata do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (MOON *et al.*, 2011). Entretanto, promove diferenciação osteoblástica e

mineralização pela mediação da expressão de diversos fatores de crescimento críticos à regulação da função dos osteoblastos e o aumento na produção de matriz óssea proteica (MAEDA, KAWANE e HORIUCHI, 2003; MAEDA *et al.*, 2004; RUIZ-GASPA *et al.*, 2007).

A sinvastatina tem sido alvo de diversos estudos na área da Odontologia como possível alternativa aos materiais usados para regeneração óssea. Em um modelo de ratos ovariectomizados tratados com sinvastatina, ela mostrou diminuir a perda de osso esponjoso e aumentou a formação de osso cortical (OXLUND e ANDREASSEN, 2004).

A maior limitação à sua aplicação clínica é o meio apropriado de entrega e liberação. A engenharia tecidual tem encontrado algumas dificuldades, dentre elas a busca pela dose ideal e o meio apropriado de entrega e liberação da sinvastatina. Ultrapassadas estas dificuldades, mais fácil será a sua aplicabilidade clínica na Odontologia (OLIVEIRA, 2016), uma vez que baixas doses não têm impacto na formação óssea, enquanto que altas dosagens levam a uma alta citotoxicidade e estimulação do processo inflamatório, atrasando o reparo tecidual (THYLIN *et al.*, 2002; STEIN *et al.*, 2005; NYAN *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que, quando as dosagens administradas, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, são altas e os níveis de sinvastatina são tóxicos, são observados efeitos antiangiogênicos. Quando as dosagens são baixas, correspondendo aos níveis fisiológicos encontrados na prática clínica, observou-se um efeito pró-angiogênico (WEITZ-SCHMIDT, 2002).

As formas de administração da sinvastatina podem variar, geralmente são por via oral, injeções múltiplas em lesões e aplicação

local em materiais específicos. Quando administrada por via oral, a maior parte da sua degradação ocorre a nível hepático, ficando apenas uma pequena parte disponível para atuação no tecido ósseo. Service mostrou que quando a administração de uma estatina é feita por via oral, a sua concentração disponível nos tecidos é menor que 2,4% (SERVICE, 2000), sendo uma concentração insuficiente para estimular a formação óssea em defeitos periimplantares (JADHAV e JAIN, 2006; MA *et al.*, 2008). Uma opção é injetar sinvastatina diretamente no local de ação, em fraturas ou defeitos, porém, são ineficientes devido ao seu baixo peso molecular e consequentemente difusão acelerada, requerendo injeções repetidas para obter o efeito desejado, o que não é indicado visto que altas concentrações locais podem ser tóxicas devido à drástica redução na produção de colesterol, importante substância que mantém a integridade das membranas celulares (WHANG *et al.*, 2005). Além disso, a administração sistêmica do fármaco pode resultar em sérios efeitos colaterais ao organismo devido sua degradação hepática (KHEIRALLAH e ALMESHALY, 2016).

Tal como os fatores de crescimento, a sinvastatina requer um meio condutor adequado que controle a sua liberação local, de modo a permitir a neoformação óssea sem danos aos tecidos. A aplicação local incorporada a materiais específicos como um meio condutor para controlar a sua liberação, concentração local e efetividade, dependem do tipo de carreador utilizado (LIMA, CALIXTO e ANBINDER, 2011).

Diversos estudos têm sido testados com diferentes tipos de carreadores, como a como a gelatina (OZEC *et al.*, 2007), o PLGA (WU *et al.*, 2008), as nanopartículas adicionadas ao PLGA (HO *et al.*, 2011), sulfato de cálcio (NYAN *et al.*, 2007) e o beta tricálcio fosfato (NYAN

et al., 2009), os quais têm demonstrado potencial em aumentar a formação óssea (PARK, 2009). A grande disparidade de resultados observada entre estudos que utilizam doses idênticas de sinvastatina pode ser devido à grande diversidade de tipos de carreador utilizados (OLIVEIRA, 2016). Stein e colaboradores, em 2005, utilizaram 0,1 mg de sinvastatina incorporada num gel de metilcelulose em mandíbulas de ratos e não observaram qualquer estimulação de formação óssea (STEIN *et al.*, 2005). Já Nyan e colaboradores, em 2009, reportaram que a mesma dose de 0,1 mg de sinvastatina, quando em combinação com β -tricálcio fosfato (β -TCP), é a ideal para estimular a formação de tecido ósseo em defeitos de calvárias de ratos, sem induzir inflamação, podendo ser utilizada de forma eficaz como material de regeneração óssea. Quando foram utilizadas dosagens superiores a 2,2 mg houve uma exacerbação do processo inflamatório e inibição da formação óssea (NYAN *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que a administração local de 0,1, 0,9 e 1,7 mg de sinvastatina, incorporada em um enxerto de β -TCP, teve um efeito prejudicial no reparo ósseo de defeitos peri-implantares em ratos (MA *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Huang et al. (2014), a utilização de sinvastatina incorporada em arcabouços de sulfato de cálcio apresentou efeitos benéficos na regeneração óssea em ulnas de coelhos, semelhantes aos obtidos com rhBMP2, demonstrando, assim, um material com grande potencial para a engenharia tecidual óssea (HUANG, HUANG e LI, 2014).

Quando utilizada sob a forma de grânulos incorporados numa matriz de celulose polimérica, a sinvastatina promoveu uma maior neovascularização e demonstrou aumentar a osseointegração de

implantes imediatos, instalados em cães (MANSOUR, AL ASHWAH e KOURA, 2014).

O PLGA produzido sob o formato de microesferas tem sido amplamente utilizado como sistema carreador de fármacos e em aplicações médicas regenerativas, principalmente devido a sua biocompatibilidade, degradação e fácil fabricação. A sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA, quando adquiridas pelo método de simples emulsão/dupla emulsão e evaporação do solvente, apresenta alta eficácia de encapsulamento do fármaco e sua característica de biodegradação permite uma lenta liberação da droga por até um mês (BAO *et al.*, 2011; NAITO *et al.*, 2014; GENTILE *et al.*, 2016; MASAELI *et al.*, 2016). No estudo *in vitro* realizado por Bao et al. (2011), microesferas de PLGA com SIN não inibiram o metabolismo celular em relação ao grupo controle e ainda indicaram maior atividade das células, o que permite seu uso como carreador na regeneração do tecido ósseo. Naito *et al.* (2014), realizou um estudo *in vivo* e confirmou que as microesferas contendo sinvastatina aumentaram significativamente a formação óssea no defeito de tamanho crítico da calvária do coelho.

Muitos estudos a respeito de microesferas de sinvastatina encapsuladas por microesferas de PLGA e sua efetividade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, na regeneração óssea tecidual quando incorporadas a um arcabouço, de diferentes composições existem (NANDAGIRI *et al.*, 2012; NATH *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; GENTILE *et al.*, 2016), enquanto que praticamente não se tem estudos sobre a utilização das microesferas de PLGA com sinvastatina fora de arcabouços de substitutos ósseos.

Em 2013, Tai e colaboradores, encapsularam sinvastatina em microesferas de PLGA com hidroxiapatita e concluíram, através de estudo *in vivo*, que essa formulação pode ser usada como agente osteoindutor por terem estimulado a formação de calo ósseo e neovascularização. Ferreira et al. (2015) utilizaram esse material (na concentração de 2,5% de sinvastatina) para preencher defeitos ósseos criados na calvária de ratos e o recobriram com uma membrana de PLGA. Após 60 dias, os defeitos apresentaram cicatrização óssea quase completa com a presença de matriz óssea organizada e madura, além de mostrar a interação entre o biomaterial e o tecido circundante onde células estabeleceram íntimo contato com as microesferas. O reparo de defeitos ósseos em ratos foi melhor e mais rápido com o uso da sinvastatina encapsulada por microesferas de PLGA.

Terukina e colaboradores (2016) avaliaram a liberação da sinvastatina encapsulada por micro e nanoesferas de PLGA. No estudo *in vivo*, em defeitos criados na calvária de ratos, ambos os materiais promoveram formação óssea, porém o comportamento das microesferas foi superior ao das nanoesferas. O estudo demonstrou que a liberação do fármaco foi mais lenta nas microesferas (1 mês) do que nas nanoesferas (1 semana) e que somente as microesferas tiveram efeito na proliferação de células pré-osteoblásticas de linhagem de ratos.

A regeneração óssea é tema de grande interesse dentro da odontologia, já que grande parte dos indivíduos que buscam por tratamentos reabilitadores por meio de próteses dentárias sobre implantes tem espessura e altura óssea reduzida decorrente da perda dental prévia. Tendo em vista que ainda não existe um consenso sobre o uso das microesferas de PLGA contendo sinvastatina para a regeneração

óssea, buscou-se por meio deste trabalho dar continuidade aos estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, onde a sinvastatina e PLGA são objetos de estudo e, foram estes estudos realizados previamente, que nos levaram a trabalhar com microesferas de 0,03% de concentração. Espera-se avaliar o comportamento biológico *in vitro* das microesferas contendo SIN e PLGA, fabricadas pelo processo de simples emulsão e evaporação do solvente, bem como avaliação da sua citotoxicidade em linhagens de fibroblastos L929, osteoblastos MC3T3-E1 e em células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de bolas de Bichat (CTAB). Objetiva-se obter resultados que colaborem com a construção do conhecimento para, em longo prazo, viabilizar a aplicação desse biomaterial na odontologia, mais especificamente, como regenerador de tecido ósseo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o comportamento biológico de microesferas (MPS) de PLGA contendo sinvastatina, através do teste de citotoxicidade.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a citotoxicidade de MPS de PLGA+SIN em linhagem de fibroblastos L929, em 1, 3 e 7 dias.
- 2) Avaliar a citotoxicidade de MPS de PLGA+SIN em linhagem de osteoblastos MC3T3-E1, em 1, 3 e 7 dias.
- 3) Avaliar a citotoxicidade de MPS de PLGA+SIN em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de bolas de Bichat, em 1, 3 e 7 dias.

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais

PURASORB PDLG 5002 (DL – lactide/Glycolide copolymer) (50L:50G) foi adquirido da PURAC biochem bv Gorinchem. Sinvastatina (98% HPLC) foi obtida da AK Scientific, Califórnia, USA. Álcool polivinílico (PVA) foi adquirido da Sigma-Aldrich, Canadá. Tampão salina-fosfato (PBS – 9,88 g/L, ph 7,4) foi comprado da Kasvi, Brasil. Clorofórmio p.a. (99,9% HPLC) foi obtido da Vetec, Brasil.

3.2 Síntese das microesferas

As microesferas de PLGA com SIN foram produzidas no Núcleo de Pesquisa em Materiais Cerâmicos e Compósitos - CERMAT/UFSC pelo método de simples emulsão e evaporação do solvente (O/W). Inicialmente, 4,45 g de PLGA foram dissolvidos em 178 ml de clorofórmio CHCl_3 numa concentração de 5% m/m, sob agitação constante até sua total dissolução. Então 1,49 mg de SIN foram adicionadas à solução para obtenção da relação de 0,03% m/m entre fármaco e polímero (fase interna). A solução obtida foi gotejada lentamente em 1650 ml de água destilada contendo PVA dissolvido a 1% (fase contínua), sob agitação vigorosa de 800 rpm em agitador magnético em temperatura de 21 °C. Para completa evaporação do solvente, a mistura foi mantida sob agitação constante por uma noite. As amostras foram coletadas por decantação, lavadas três vezes com água, secas e armazenadas em temperatura de 21 °C por 24 horas. A síntese das microesferas de PLGA ocorreu de igual maneira, no entanto não foi adicionada a primeira solução SIN.

3.3 Caracterização das microesferas

A amostra foi montada em blocos de alumínio, recobertas com ouro e então, sua morfologia foi analisada por microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV, USA), a 10 kV. O tamanho das micropartículas foi determinado por difração a laser (Mastersizer 2000, Malvern Instrument Ltd., UK). A SIN, o PLGA e a SIN incorporada às microesferas foram caracterizadas por espectrometria de infravermelho transformada de Fourier (FTIR Spectrometer Cary 600 Series, Agilent Technologies, USA).

3.4 Esterilização das amostras para avaliação da citotoxicidade

As amostras de ambos os grupos, teste (PLGA + SIN) e controle (PLGA), foram esterilizadas por meio de óxido de etileno, conforme é sugerido na literatura para realização de testes de citotoxicidade (FRANÇA et al., 2013), pela empresa STERILAB (Curitiba, Brasil).

3.5 Linhagens celulares e meios de cultura

O meio de cultura é constituído de nutrientes (vitaminas, proteínas, fatores de crescimento, etc.) necessários para o crescimento celular e mantém o pH e a osmolaridade compatíveis com a viabilidade celular. A regulagem da temperatura e dos níveis de O₂ e CO₂ da incubadora deve ser realizada a 37 °C e 5% de CO₂, pois o CO₂ influencia também na proliferação celular através da participação na biossíntese das bases púricas e pirimídicas.

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas neste estudo:

3.5.1 Fibroblastos L929 (ATCC, Manassas, VA, USA, 2593™)

O meio de cultura celular utilizados foi DMEM com alta concentração de glicose (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), para permitir a manutenção e proliferação das células em cultura.



Figura 1. Fibroblastos da linhagem L929.

3.5.2 Osteoblastos MC3T3-E1 subclone 4 (ATCC, Manassas, VA, USA, 2593™)

O meio de cultura celular utilizado foi o α MEM modificado (*modified Eagle's medium*, Nutricell, SP, Brasil) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), para permitir a manutenção e proliferação das células em cultura.

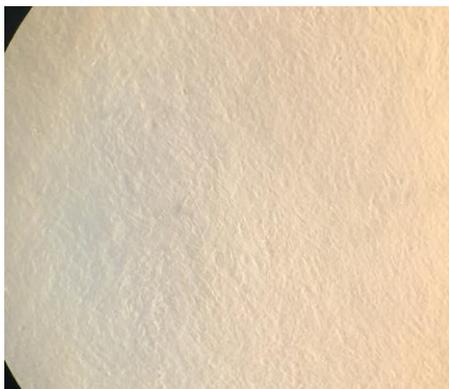


Figura 2. Osteoblastos da linhagem MC3T3-E1

3.5.3 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de bolas de Bichat (CTAB)

DMEM (Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) e 1% de solução de penicilina/estreptomicina (PS, Gibco™, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) foi utilizado.



Figura 3. Células tronco mesenquimais de tecido adiposo de bolas de Bichat (cultura primária).

3.6 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade das microesferas de PLGA e PLGA+SIN foi avaliada através do teste colorimétrico de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando placas de 96 cavidades, onde as linhagens celulares supracitadas foram cultivados a uma densidade de 2×10^4 por cavidade, a 37 °C e 5% de CO₂. Os tempos experimentais foram de 1, 3 e 7 dias.

Para a cultura celular, as células foram semeadas nas placas e incubadas por 24 h. Após as 24 h de crescimento, foram acrescentadas as microesferas de PLGA e PLGA+SIN, com exceção ao grupo de controle celular.

O teste utilizado parte do princípio de conversão do brometo de 3-(4,5-dimetiltazolin-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A essência do método é medir a redução (ou alteração) de um líquido amarelo para um sal formazano de cor roxa (na forma de cristais insolúveis). A reação prossegue graças à succinato desidrogenase mitocondrial em células vivas e metabolicamente ativas. Se as células são danificadas pelo fator testado, a reação é menos intensa ou pode não ocorrer, o que pode ser visto na mudança de cor e na determinação espectrofotométrica de absorbância (densidade óptica). A densidade óptica corresponde ao número de células sobreviventes incubadas no meio de teste.

Após os períodos experimentais, as microesferas foram removidas das placas e os grupos celulares foram observados através de microscópio de luz invertida para avaliar quantidade e formato celular. O meio foi gentilmente removido e as cavidades foram lavadas duas vezes com PBS. Após, 100 µl de meio acrescentados de 20 µl de solução de

MTS foram dispensados sobre as cavidades e incubados por 2 horas e 30 minutos. As absorbâncias foram medidas por espectrofotômetro (Infinite M200, TECAN, Áustria GmbH, Grödig, Áustria) a um comprimento de onda de 490 nm, e as porcentagens de células viáveis foram calculadas em relação aos controles.

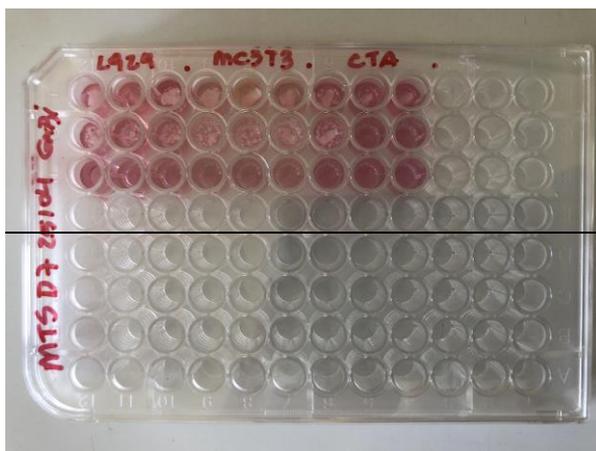


Figura 4. Placa de 96 cavidades, onde foram semeadas as células (L929, MC3T3-E1 e CTAB) e adicionadas as microesferas.

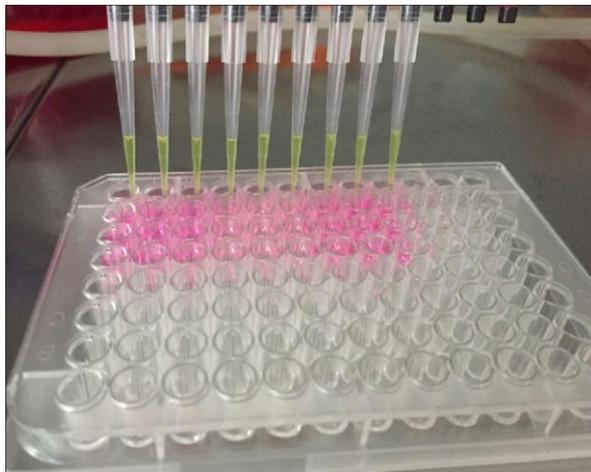


Figura 5. Após os períodos experimentais, foi adicionada a solução MTS para realização do teste colorimétrico. Observe a coloração amarelada do MTS antes da reação.

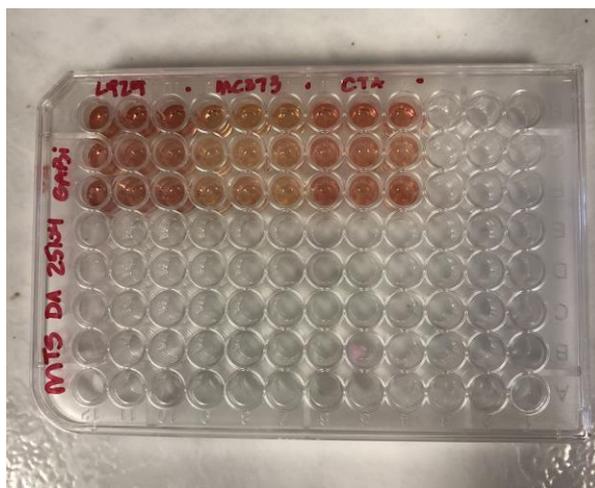


Figura 6. Placa após determinação espectrofotométrica de absorbância. Observe a coloração vermelho-arroxeadada do MTS após a reação.

4. RESULTADOS

A citotoxicidade das microesferas sem sinvastatina e com sinvastatina a 0,03% foi avaliada através do teste colorimétrico MTS, sendo que as porcentagens das células viáveis foram calculadas em relação ao controle positivo (meio de cultura e células, sem interferência amostral). Os resultados estão expostos em gráficos de porcentagens da média \pm desvio padrão (Figuras 7 a 9).

Analisando os valores obtidos através da leitura das absorbâncias, é possível verificar que o controle positivo do grupo de fibroblastos L929 se manteve, praticamente, constante durante os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias, resultado bastante semelhante ao obtido no grupo com as amostras de microesferas com SIN, enquanto que o grupo com as amostras contendo microesferas sem SIN aumentou consideravelmente no terceiro dia e teve uma pequena redução após sete dias. Entretanto, é importante ressaltar que o desvio padrão foi acentuado para o terceiro dia, onde pode-se antever uma maior discrepância entre as amostras testadas (triplicata). Ainda assim, manteve resultado levemente superior ao apresentado no primeiro dia de cultura celular (Figura 7).

Nas leituras referentes aos testes realizados com o grupo celular MC3T3-E1, foi possível verificar uma constância dos valores apresentados pelo grupo controle, sendo o valor do desvio padrão no sétimo dia levemente acentuado. Deste mesmo grupo celular, as microesferas com SIN, apresentaram comportamento semelhantes nos dias 1 e 3 de experimento e leve redução no dia 7, mas mantendo-se acima daquilo que é considerado biocompatível (70%). Os grupos que estavam acrescidos de microesferas sem SIN, tiveram uma pequena

redução da porcentagem no terceiro dia e se mantiveram assim até o dia 7. É importante ressaltar também, que o desvio padrão deste grupo foi mais acentuado no primeiro dia de leitura dos resultados.

Os testes com CTAB apresentaram pequena variação nos valores obtidos pelo grupo controle nos tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias. Os grupos com amostras de microesferas com SIN e sem SIN apresentaram aumento em relação a primeira leitura dos resultados, sendo no grupo sem SIN um crescimento levemente progressivo e com desvio padrão pouco maior no primeiro e sétimo dia. O grupo com SIN apresentou um desvio padrão muito pequeno durante os tempos experimentais.

Os testes realizados com todos os grupos celulares obtiveram resultados promissores, onde as amostras testadas não foram tóxicas às células.

Figura 7. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina sobre fibroblastos L929 após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).

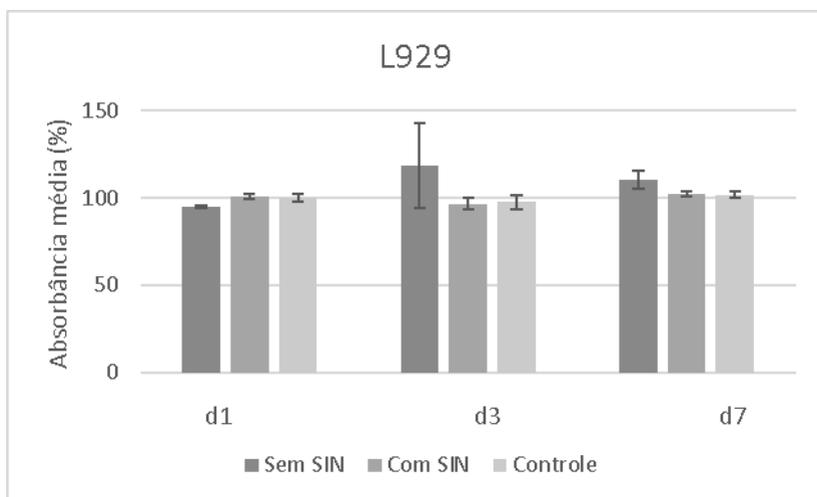


Figura 8. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina sobre osteoblastos MC3TE-E1 após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).

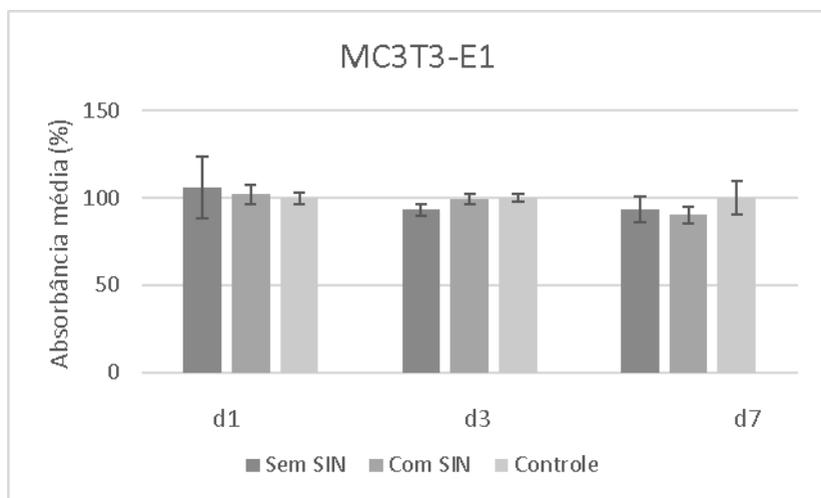
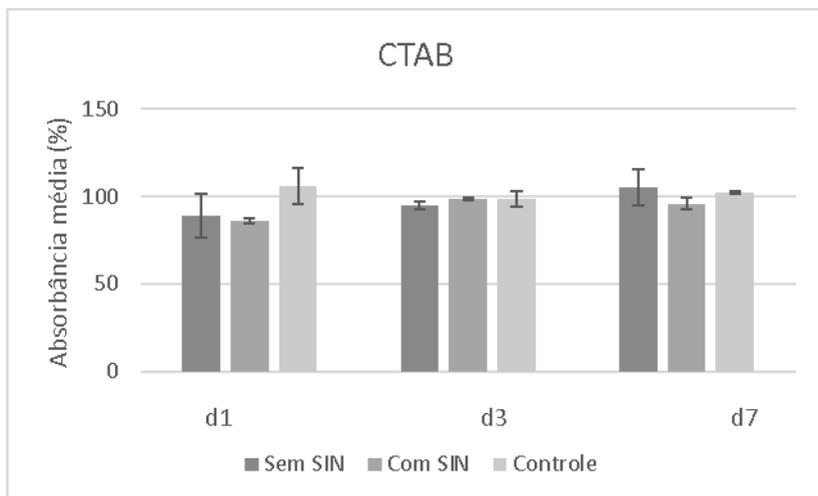


Figura 9. Valores expressos em porcentagem das médias \pm desvio padrão da absorbância (490nm) para a citotoxicidade apresentada pelas microesferas com e sem sinvastatina células tronco de tecido adiposo de bolas de Bichat (CTAB) após os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias (d1, d3 e d7).



5. DISCUSSÃO

Neste estudo, microesferas de PLGA+SIN foram sintetizadas e submetidas ao teste de avaliação da citotoxicidade em linhagens de fibroblastos L929, como recomendado pela ISO 10993-5, pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1 e CTAB, obtidos por cultura primária. A avaliação das amostras foi feita em diferentes tempos experimentais (1, 3 e 7 dias).

Para que um material seja reconhecido como biocompatível, é necessário que o mesmo não apresente citotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade e alergenicidade. Por outro lado, deve apresentar inércia física, química e biológica e ser estável em seu ambiente biológico. Dessa forma, para que se diminua o número de testes em modelos animais, é recomendado que a avaliação de biomateriais seja iniciada pelos testes de citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro* (KATZER *et al.*, 2002). O estudo, *in vitro*, com cultura de células é utilizado devido a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a pressão osmótica, a tensão de CO₂ e O₂ podem ser controlados de maneira precisa. A caracterização e homogeneidade da amostra com culturas celulares idênticas, além da economia no custo de reagentes que são utilizados em menor quantidade, são vantagens desse tipo de estudo. As desvantagens são a necessidade de um ambiente de trabalho asséptico e de treinamento do pesquisador (FRESHNEY, 1990).

As propriedades físico-químicas de microesferas carreadoras de fármacos feitas com polímero podem variar de acordo com muitos fatores envolvidos na escolha dos materiais e suas concentrações, do

método de produção, incluindo cada etapa do processo de fabricação da amostra (JAIN, 2000). Neste estudo, para obtenção de uma liberação lenta e controlada do fármaco, foi escolhido o método de simples emulsão e evaporação do solvente (O/W), por ser considerado uma das técnicas mais simples para o microencapsulamento de drogas hidrofóbicas, como é o caso da sinvastatina (LI, ROUAUD e PONCELET, 2008), que tem o efeito de melhorar a formação óssea e, ao mesmo tempo, ser reconhecida como um inibidor da síntese do colesterol (ALBERTS, 1990). A sinvastatina tem demonstrado resultados promissores na regeneração óssea (MUNDY *et al.*, 1999; FU *et al.*, 2015; GENTILE *et al.*, 2016). Com base nisso, as células de interesse deste estudo são as que apresentam potencial de diferenciação osteogênica, neste caso, as células-tronco de tecido adiposo de bolas de Bichat, e as células ósseas, tais com os osteoblastos da linhagem MC3TE-E1.

Altas doses (> 1 mg / ml) de sinvastatina promovem a morte celular e exacerbam as respostas inflamatórias em animais e humanos (KUPCSIK *et al.*, 2009; ENCARNAÇÃO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Neste estudo, testamos microesferas de sinvastatina encapsuladas por PLGA a uma concentração de 0,03% e esta concentração não demonstrou citotoxicidade. As amostras confeccionadas apresentaram resultados favoráveis no que se refere à citotoxicidade, tanto dos fibroblastos da linhagem L929, quanto dos osteoblastos MC3TE-E1 e das CTAB, células de interesse, uma vez que tem-se por objetivo resultados que colaborem com a construção do conhecimento para, em longo prazo, viabilizar a aplicação desse material na odontologia, mais especificamente, como regenerador ósseo.

Por citotoxicidade, entende-se o conjunto de alterações da homeostase celular, as quais propiciam uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa, na sobrevivência, na reprodução e na realização de funções metabólicas celulares (NARDONE, 1977 apud COURA, 2004). Quando presente em meio de cultura dos fibroblastos, as microesferas com sinvastatina incorporada revelaram-se compatíveis com a atividade celular desde o tempo experimental de 1 dia, chegando a 102% de viabilidade aos 3 dias de ensaio, o que significa que as amostras, chegaram a estimular, sutilmente, as células; assim como as microesferas sem sinvastatina, que apresentaram resultados positivos para os tempos experimentais de 1, 3 e 7 dias. Neste grupo celular as microesferas com SIN tiveram ótimos resultados nos 3 tempos experimentais, sendo nos dias 3 e 7 pouco inferior à absorvância apresentada pelos grupos com amostras de microesferas sem SIN.

Nos grupos com osteoblastos MC3T3-E1, os resultados apresentados também foram favoráveis. As amostras com SIN quando presentes no meio celular, após o tempo experimental, chegaram a resultados próximos a 90% de viabilidade no sétimo dia, com baixo valor de desvio padrão. Resultados obtidos em um estudo anterior que avaliou a citotoxicidade por contato direto através de análises de MTT mostraram também que amostras de PLGA não eram tóxicas para células osteoblásticas (MESSIAS; ARAGONES; DUEK, 2009), assim como os resultados deste estudo, onde microesferas sem SIN (apenas PLGA), demonstraram uma viabilidade celular superior a 93%. É importante ressaltar que neste trabalho, o ensaio de citotoxicidade também foi realizado por contato direto, uma vez que a hidrofobia das amostras faz com que estas flutuem no meio. A difusão de água no

polímero provoca a hidrólise das ligações de éster nas cadeias poliméricas, levando à geração de oligômeros solúveis em água (MOTTA; DUEK, 2006), o que justifica o fato de amostras puras, sem a adição da SIN, não ser tóxica às células uma vez que as amostras sem sinvastatina são mais hidrofóbicas que as com sinvastatina.

Os resultados obtidos nos testes realizados com as CTAB também não foram tóxicos às células e, assim como nas amostras com células de osteoblastos apresentaram médias superiores a 90% nos dias 3 e 7 de experimento, tanto nas amostras com SIN quanto nas amostras de microesferas sem SIN.

Similar aos nossos resultados, Fu e colaboradores, em 2015, avaliaram a sinvastatina incorporada ao PLGA como um substituto ósseo e também não observaram nenhum efeito citotóxico. Além disso, o material aplicado em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos exibiu efeitos de osteocondução e osteoindução (FU *et al.*, 2015). Resultado este que desejamos obter com as microesferas de SIN encapsuladas por PLGA, testadas neste presente estudo.

6. CONCLUSÃO

Ao serem submetidas ao teste de citotoxicidade, realizado *in vitro* sobre fibroblastos L929, osteoblastos MC3TE-E1 e CTAB, as microesferas mostraram-se não ser tóxicas às células na concentração de 0,03% de sinvastatina. Assim, este estudo sugere o potencial das microesferas testadas para serem empregadas como biomaterial na regeneração tecidual óssea.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, A. W. Lovastatin and simvastatin-inhibitors of HMG CoA reductase and cholesterol biosynthesis. **Cardiology**, v. 77, n. Suppl. 4, p. 14-21, 1990.
- ARAUJO, M. G. et al. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man. A randomized clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 407-12, Apr 2015.
- ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 212-8, Feb 2005.
- AYUKAWA, Y.; OKAMURA, A.; KOYANO, K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 3, p. 346-350, 2004.
- BAO, T.-Q. et al. Fabrication and characterization of porous poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) microspheres for use as a drug delivery system. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 8, p. 2510-2517, 2011.
- BODEN, S. D. Bioactive factors for bone tissue engineering. **Clin Orthop Relat Res**, n. 367 Suppl, p. S84-94, Oct 1999.
- BROGGINI, N. et al. Bone healing around nanocrystalline hydroxyapatite, deproteinized bovine bone mineral, biphasic calcium phosphate, and autogenous bone in mandibular bone defects. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 103, n. 7, p. 1478-87, Oct 2015.
- CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 809-18, Sep 2003.
- CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, n. 1, p. 1-7, Jan 2011.
- CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24 Suppl, p. 237-59, 2009.
- CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 962-9, Aug 2008.
- DRAGOO, J. L. et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. **Journal of orthopaedic research**, v. 21, n. 4, p. 622-629, 2003.

- DUBUC, G. et al. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 8, p. 1454-1459, 2004.
- ENCARNAÇÃO, I. C. et al. Analysis of bone repair and inflammatory process caused by simvastatin combined with PLGA+ HA+ β TCP Scaffold. **Implant dentistry**, v. 25, n. 1, p. 140-148, 2016.
- FASSBENDER, K. et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5856-5861, 2001.
- FRESHNEY, R. **Biology of the Cultured Cell. A Manual of Basic Technique**: New York: Wiley-Liss 1990.
- FU, Y.-C. et al. Combination of calcium sulfate and simvastatin-controlled release microspheres enhances bone repair in critical-sized rat calvarial bone defects. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 7231, 2015.
- GENTILE, P. et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 59, p. 249-257, 2016.
- GOMEZ, G. et al. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 5, p. 935-42, Sep 2006.
- GRUNDER, U.; GRACIS, S.; CAPELLI, M. Influence of the 3-D bone-to-implant relationship on esthetics. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 25, n. 2, p. 113-9, Apr 2005.
- HAMMERLE, C. H.; KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol 2000**, v. 17, p. 151-75, Jun 1998.
- HO, M. H. et al. Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. **J Orthop Res**, v. 29, n. 10, p. 1504-10, Oct 2011.
- HUANG, X.; HUANG, Z.; LI, W. Highly efficient release of simvastatin from simvastatin-loaded calcium sulphate scaffolds enhances segmental bone regeneration in rabbits. **Mol Med Rep**, v. 9, n. 6, p. 2152-8, Jun 2014.
- JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **J Pharm Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 3-18, Jan 2006.

JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475-2490, 2000.

JUNG, R. E. et al. Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 1, p. 90-8, Jan 2013.

JUNG, R. E.; THOMA, D. S.; HAMMERLE, C. H. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. **Journal of clinical periodontology**, v. 35, n. s8, p. 255-281, 2008.

KATZER, A. et al. Polyetheretherketone—cytotoxicity and mutagenicity in vitro. **Biomaterials**, v. 23, n. 8, p. 1749-1759, 2002.

KHEIRALLAH, M.; ALMESHALY, H. Simvastatin, dosage and delivery system for supporting bone regeneration, an update review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 28, n. 3, p. 205-209, 2016.

KOJRO, E. et al. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5815-5820, 2001.

KUPCSIK, L. et al. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 13, n. 11-12, p. 4465-4473, 2009.

KUREISHI, Y. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nature medicine**, v. 6, n. 9, p. 1004, 2000.

KWAK, B. et al. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nature medicine**, v. 6, n. 12, p. 1399, 2000.

LACOSTE, L. et al. Hyperlipidemia and coronary disease: correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. **Circulation**, v. 92, n. 11, p. 3172-3177, 1995.

LANSMAN, S. et al. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 6, p. 1121-8, Nov 2006.

LEKOVIC, V. et al. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction. Report of 10 cases. **J Periodontol**, v. 68, n. 6, p. 563-70, Jun 1997.

LEMONS, J. E. Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. **J Oral Implantol**, v. 30, n. 5, p. 318-24, 2004.

LI, M.; ROUAUD, O.; PONCELET, D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. **International Journal of pharmaceuticals**, v. 363, n. 1-2, p. 26-39, 2008.

LIMA, C. E. V. D. C.; CALIXTO, J. C.; ANBINDER, A. L. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. **Brazilian oral research**, v. 25, n. 1, p. 42-48, 2011.

MA, B. et al. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. **Acta Biomater**, v. 4, n. 1, p. 149-55, Jan 2008.

MACIEL-OLIVEIRA, N.; BRADASCHIA-CORREA, V.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 2, p. 170-9, Aug 2011.

MAEDA, T.; KAWANE, T.; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 681-92, Feb 2003.

MAEDA, T. et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 3, p. 874-7, Jan 26 2001.

MAEDA, T. et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem**, v. 92, n. 3, p. 458-71, Jun 01 2004.

MANSOUR, G.; AL ASHWAH, A.; KOURA, A. Evaluation of simvastatin grafting around immediate dental implants in dogs. **Implant Dent**, v. 23, n. 2, p. 195-9, Apr 2014.

MASAEI, R. et al. Preparation, characterization and evaluation of drug release properties of simvastatin-loaded PLGA microspheres. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 15, n. Suppl, p. 205, 2016.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol**, v. 78, n. 3, p. 377-96, Mar 2007.

MOON, H. J. et al. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. **Exp Mol Med**, v. 43, n. 11, p. 605-12, Nov 30 2011.

MORIYAMA, Y. et al. Topical application of statin affects bone healing around implants. **Clinical oral implants research**, v. 19, n. 6, p. 600-605, 2008.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do Poli (L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 1, 2006.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946-9, Dec 03 1999.

NAITO, Y. et al. The effect of simvastatin-loaded polymeric microspheres in a critical size bone defect in the rabbit calvaria. **International journal of pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 157-162, 2014.

NAKA, T. et al. Mechanical Stretch Induced Interleukin-18 (IL-18) Expression through Angiotensin Subtype 1 Receptor (AT1R) and Endothelin-1 in Cardiomyocytes. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 201-212, 2008.

NANDAGIRI, V. K. et al. Preparation and Characterization of Simvastatin Loaded PLGA Microparticles for Tissue Engineering Applications. 2012.

NATH, S. D. et al. Encapsulation of simvastatin in PLGA microspheres loaded into hydrogel loaded BCP porous spongy scaffold as a controlled drug delivery system for bone tissue regeneration. **J Biomater Appl**, v. 28, n. 8, p. 1151-63, Apr 2014.

NYAN, M. et al. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, n. 3, p. 280-7, Mar 2009.

NYAN, M. et al. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. **J Pharmacol Sci**, v. 104, n. 4, p. 384-6, Aug 2007.

OHNAKA, K. et al. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 287, n. 2, p. 337-42, Sep 21 2001.

OLIVEIRA, M. A. P. P. N. Preservação de cristas ósseas pós-extração de terceiros molares superiores com arcabouços de PLGA/B-TCP, com e sem simvastatina. 2016.

OLIVEIRA, M. N. et al. Ridge Preservation After Maxillary Third Molar Extraction Using 30% Porosity Plga/ha/ β -tcp Scaffolds With and Without Simvastatin: A Pilot Randomized Controlled Clinical Trial. **Implant dentistry**, v. 26, n. 6, p. 832-840, 2017.

OXLUND, H.; ANDREASSEN, T. T. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. **Bone**, v. 34, n. 4, p. 609-18, Apr 2004.

- OZEC, I. et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **J Craniofac Surg**, v. 18, n. 3, p. 546-50, May 2007.
- PARK, J.-B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 14, n. 9, p. e485-8, 2009.
- PIETROKOVSKI, J.; MASSLER, M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. **J Prosthet Dent**, v. 17, n. 1, p. 21-7, Jan 1967.
- RIOS, H. F. et al. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. **J Periodontol**, v. 82, n. 9, p. 1223-37, Sep 2011.
- RUIZ-GASPA, S. et al. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. **J Cell Biochem**, v. 101, n. 6, p. 1430-8, Aug 15 2007.
- SAKAI, V. T. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v. 89, n. 8, p. 791-6, Aug 2010.
- SAKODA, K. et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **Journal of dental research**, v. 85, n. 6, p. 520-523, 2006.
- SCHALDACH, M. Cardiologia Cirúrgica Perspectivas Para o Ano 2000. **Biomateriais-C3.[Links]**, 2000.
- SCHROPP, L. et al. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 23, n. 4, p. 313-23, Aug 2003.
- SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1498-500, Sep 01 2000.
- STAAL, A. et al. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **J Bone Miner Res**, v. 18, n. 1, p. 88-96, Jan 2003.
- STEIN, D. et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. **J Periodontol**, v. 76, n. 11, p. 1861-70, Nov 2005.
- SUGIYAMA, O. et al. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. **Mol Ther**, v. 11, n. 3, p. 390-8, Mar 2005.
- THYLIN, M. R. et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. **J Periodontol**, v. 73, n. 10, p. 1141-8, Oct 2002.

VALENTINI, P. et al. Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. **Clin Oral Implants Res**, v. 9, n. 1, p. 59-64, Feb 1998.

VAN DER WEIJDEN, F.; DELL'ACQUA, F.; SLOT, D. E. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. **J Clin Periodontol**, v. 36, n. 12, p. 1048-58, Dec 2009.

VIGNOLETTI, F. et al. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 23 Suppl 5, p. 22-38, Feb 2012.

WANG, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2133-51, Jun 2003.

WEITZ-SCHMIDT, G. Statins as anti-inflammatory agents. **Trends in pharmacological sciences**, v. 23, n. 10, p. 482-487, 2002.

WHANG, K. et al. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: Synthesis and in vitro release. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 74, n. 2, p. 237-246, 2005.

WU, Z. et al. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 37, n. 2, p. 170-6, Feb 2008.

ZHANG, H. X. et al. Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, n. 10, p. 3250-8, Oct 2015.

ZHANG, J.; DRICU, A.; SJOVALL, J. Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1344, n. 3, p. 241-9, Feb 18 1997.

Anexo 1.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 5 dias do mês de junho de 2018, às 16:30 horas,
em sessão pública no (a) CEPID desta Universidade, na presença da
Banca Examinadora presidida pelo Professor

Ricardo de Souza Magini
e pelos examinadores:

1- Suzeli Dias

2- Agueda Aragoes

o aluno Gabriela Aleixo Furman

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado:

Avaliação da citotoxicidade de microssferas de PLGA com
simvastatino encapsulado

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela aprovação do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

[Assinatura]
Presidente da Banca Examinadora

[Assinatura]

Examinador 1

[Assinatura]
Examinador 2

[Assinatura]
Aluno