

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Doutorado em Odontologia

Myllene Bossolani Galloro

**EFEITO OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS COM HIDROXIAPATITA
DOPADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS
MAGNÉSIO E ESTRÔNCIO.**

São Paulo

2025

Myllene Bossolani Galloro

**EFEITO OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS COM HIDROXIAPATITA
DOPADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS
MAGNÉSIO E ESTRÔNCIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Flávia Gonçalves

São Paulo

2025

Galloro, Myllene Bossolani

Efeito osteogênico de membranas com hidroxiapatita dopada com diferentes concentrações de íons magnésio e estrôncio / Myllene Bossolani Galloro. - São Paulo, 2025.

77 p.: il; color.

Tese (Doutorado em Odontologia.) – Universidade Santo Amaro, 2025.

Orientadora: Prof.^a Dra. Flávia Gonçalves.

Bibliografia incluída

1. Osteodiferenciação. 2. Poli-lactídeo. 3. Hidroxiapatita 4. Dopagem com magnésio e estrôncio. 5. Engenharia de tecidos ósseos. I. Gonçalves, Flávia. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD

Elaborado pela Bibliotecária Andréia Alessandra Alves CRB8/7588

Myllene Bossolani Galloro

**EFEITO OSTEOGÊNICO DE MEMBRANAS COM HIDROXIAPATITA
DOPADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÍONS MAGNÉSIO E
ESTRÔNCIO**

Tese Apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Flávia Gonçalves

São Paulo, 17 de novembro de 2025.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Márcia Tanaka

Prof. Dr. Heloisa Fonseca Marão

Prof.^a Dr.^a Denisse Esther Mallaupoma Camarena

Prof. Dr. Marco Antonio Rigo Rodrigues

Conceito Final: _____

Dedico esta tese aos meus queridos filhos, minha maior inspiração, minha razão de lutar e sonhar. Vocês são as estrelas que iluminam meu caminho, o motivo pelo qual não desisto diante dos desafios. Cada esforço, cada conquista, é para construir um futuro melhor para vocês, cheio de esperança, amor e possibilidades. Que vocês cresçam sabendo que sonhos se realizam com dedicação e coragem. Esta vitória também é de vocês, meus tesouros, meus maiores presentes nesta jornada. Amo vocês infinitamente.

AGRADECIMENTOS

Encerrar esta tese de doutorado representa, para mim, muito mais do que um marco acadêmico. É o reflexo de uma trajetória construída com esforço, perseverança e, sobretudo, com o apoio incondicional de pessoas que estiveram ao meu lado em todos os momentos. A todas elas, minha mais sincera gratidão.

À minha orientadora, Profa. Dra. Flávia Gonçalves, agradeço profundamente pela orientação rigorosa e atenta, pelas valiosas contribuições ao meu trabalho e pela confiança em minha autonomia. Sua generosidade intelectual e humana foi essencial para que este percurso fosse possível e significativo.

Aos colegas do programa de Doutorado em odontologia, às amizades construídas no percurso e a todos que contribuíram com ideias, colaborações e apoio prático durante a realização desta pesquisa, meu reconhecimento e estima.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pelo conhecimento compartilhado e pelas discussões que ampliaram meu olhar científico, especialmente ao sempre sensacional Prof. Dr. Sendyk, pela majestosa condução desta jornada.

Aos colegas do Unisa Research Center (URC) pelas risadas, desabafos, parcerias e troca de conhecimentos. Aos técnicos, bibliotecários e funcionários da Universidade Santo Amaro, que desempenham um papel fundamental na sustentação da vida acadêmica, deixo também meus agradecimentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro essencial para a realização desta pesquisa, por meio da concessão de auxílio à pesquisa FAPESP M-ERA-NET 2021/0604046-9.

Aos meus pais, Alexandre e Suzi, que foram os primeiros a me ensinar o valor do conhecimento, do esforço honesto e da ética. Obrigada por acreditarem em mim antes mesmo que eu sonhasse com tudo isso. O exemplo de vocês – de integridade, coragem e dedicação – foi a luz que guiou cada um dos meus passos. E a minha irmã Bianca, que segue sempre do meu lado, compartilhando meus melhores momentos.

Ao meu marido Victor, por me lembrar, nos momentos difíceis, do motivo pelo qual comecei e por me incentivar a continuar, mesmo quando eu mesma duvidava.

Aos meus filhos, Bruno e Gabriela, razão maior do meu esforço diário. Cada abraço de vocês me deu coragem. Cada sorriso, um alívio. Esta conquista é também para que vocês saibam, no futuro, que é possível sonhar alto e lutar com dignidade pelos próprios caminhos.

À Universidade Santo Amaro que contribui ativamente para meu crescimento e amadurecimento profissional, da qual eu me orgulho em fazer parte.

Por fim, agradeço a mim mesma, pela persistência, pela capacidade de recomeçar em meio ao cansaço e por nunca perder de vista o sentido deste percurso.

A todas e todos que fizeram parte desta jornada, meu mais sincero muito obrigada.

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original."*

— Albert Einstein

RESUMO

A associação de compostos inorgânicos a polímeros sintéticos na síntese de matrizes de suporte celular é uma alternativa bastante vantajosa para se aliar as propriedades dos dois tipos de materiais. Os objetivos deste estudo foram: (1) sintetizar hidroxiapatita (HA) convencional e HA modificada com magnésio (Mg^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}) em duas proporções diferentes; (2) sintetizar membranas eletrofiadas de poli-L-lactídeo (PLLA) puro ou enriquecido com essas três HA sintetizadas; (3) avaliar a proliferação, osteocondutividade, e osteodiferenciação de células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLSCs) cultivadas nessas estruturas; (4) avaliar a matriz extracelular (MEC) formada por cultura de hPDLSC sobre estas malhas. Para isso, HA foi sintetizada convencionalmente ou substituindo 15 mol% cálcio por Mg^{2+} ou estrôncio Sr^{2+} , 7,5 mol% cada (PLLA_HA_M1) ou 10 mol% Mg^{2+} e 5 mol% Sr^{2+} (PLLA_HA_M2). Os cristais foram caracterizados por difração de raios-X (DRX) e espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Membranas de PLLA foram eletrofiadas com 10% de HA convencionais ou modificadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). hPDLSCs foram isolados e cultivados para análise da proliferação celular em 1 e 7 dias em meio clonogênico, e da osteodiferenciação celular, pelo ensaio de fosfatase alcalina aos 7 dias, e ensaio de vermelho de alizarina aos 21 dias de cultivo, ambos em meio clonogênico e osteogênico. A quantificação de colágeno e glicosaminoglicanos (GAG) da MEC foi realizada por ensaios colorimétricos em 7 e 21 dias em meio clonogênico. Dados foram analisados por meio de ANOVA de fator único e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). A análise de DRX confirmou a síntese de hidroxiapatita. ICP-OES indicou que a adição de 7,5 mol% de cada íon durante a síntese resultou na incorporação de 5% em peso de Mg^{2+} e 15% em peso de Sr^{2+} , enquanto a adição de 10 mol% de Mg^{2+} e 5 mol% de Sr^{2+} resultou em 5% em peso de Mg^{2+} e 10% em peso de Sr^{2+} . A MEV mostrou membranas tridimensionais porosa em todos os materiais. A proliferação celular foi semelhante entre todos materiais no dia 1, e maior no material com PLLA_HA_M2 no dia 7. Em meio osteogênico, a atividade da fosfatase alcalina e vermelho de alizarina não diferiram entre os grupos. Em meio clonogênico, PLLA_HA_M2 apresentou maior mineralização da matriz extracelular e maior atividade de fosfatase. A produção de colágeno foi menor nos grupos dopados após 7 dias de cultura. PLLA_HA_M2 produziu maior quantidade de sulfato de condroitina A e C, enquanto PLLA produziu maior quantidade de dermatan sulfato. Conclui-se que a síntese de HA e a eletrofição das membranas foi adequada. A incorporação de níveis mais baixos de Sr^{2+} na HA promoveu membranas com maior capacidade de osteodiferenciação e proliferação celular que os materiais com HA convencional. Os materiais dopados promoveram alterações síntese de MEC, promovendo maior diferenciação osteogênica de hPDLSC.

Palavras-chave: Osteodiferenciação, poli-lactídeo, hidroxiapatita, Dopagem com magnésio e estrôncio, Engenharia de tecidos ósseos

ABSTRACT

Combination of inorganic compounds with synthetic polymers in the synthesis of cellular support matrices is a highly advantageous strategy to merge the properties of both types of materials. The objectives of this study were: (1) synthesize conventional hydroxyapatite (HA) and HA modified with magnesium (Mg^{2+}) and strontium (Sr^{2+}) in two different proportions; (2) fabricate electrospun membranes of pure poly-L-lactide (PLLA) or PLLA enriched with the three synthesized types of HA; (3) evaluate the proliferation, osteoconductivity, and osteodifferentiation of human periodontal ligament stem cells (hPDLSCs) cultured on these structures; (4) assess the extracellular matrix (ECM) formed by hPDLSC cultures on these meshes. Therefore, HA was synthesized either conventionally or by replacing 15 mol% of calcium with 7.5 mol% Mg^{2+} and 7.5 mol% Sr^{2+} (PLLA_HA_M1), or with 10 mol% Mg^{2+} and 5 mol% Sr^{2+} (PLLA_HA_M2). Crystals were characterized by X-ray diffraction (XRD) and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). PLLA membranes were electrospun with 10% of either conventional or modified HA and characterized by scanning electron microscopy (SEM). hPDLSCs were isolated and cultured to assess cell proliferation at days 1 and 7 in clonogenic medium, and cellular osteodifferentiation by alkaline phosphatase (ALP) assay at day 7, and alizarin red staining at day 21, both in clonogenic and osteogenic media. ECM collagen and glycosaminoglycan (GAG) quantification was performed through colorimetric assays at days 7 and 21 in clonogenic medium. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). XRD analysis confirmed the successful synthesis of hydroxyapatite. ICP-OES indicated that adding 7.5 mol% of each ion during synthesis resulted in the incorporation of 5 wt% Mg^{2+} and 15 wt% Sr^{2+} , while the addition of 10 mol% Mg^{2+} and 5 mol% Sr^{2+} resulted in 5 wt% Mg^{2+} and 10 wt% Sr^{2+} . SEM revealed porous three-dimensional membranes in all materials. Cell proliferation was similar across all materials on day 1 but was higher in the HA_M2 group on day 7. In osteogenic medium, ALP activity and alizarin red staining did not differ between groups. However, in clonogenic medium, PLLA_HA_M2 showed greater extracellular matrix mineralization and higher ALP activity. Collagen production was lower in the doped groups after 7 days of culture. PLLA_HA_M2 produced a higher amount of chondroitin sulfate A and C, while PLLA alone produced more dermatan sulfate. In conclusion, both HA synthesis and membrane electrospinning were successful. The incorporation of lower levels of Sr^{2+} into HA promoted membranes with greater osteodifferentiation and cell proliferation potential compared to conventional HA materials. The doped materials altered ECM synthesis, promoting enhanced osteogenic differentiation of hPDLSCs.

Keywords: Osteogenic differentiation, polylactide, hydroxyapatite, magnesium and strontium doping, bone tissue engineering.

Lista de Quadros

Quadro 1 - Concentrações molares utilizadas nas diferentes sínteses das hidroxiapatitas convencional e modificada.....	31
Quadro 2 – Composição das Membranas Sintetizadas por Eletrofiação de Soluções de PLLA com Diferentes Modificações de Hidroxiapatita.....	39
Quadro 3- Concentrações de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}) adicionadas e efetivamente incorporadas durante a síntese de hidroxiapatitas.....	53

Lista de Figuras

Figura 1 - Diratômetro Miniflex (Rigaku Corporation, Japão).....	36
Figura 2 – Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL-JSM- 7401F (Jeol, Tóquio, Japão).....	36
Figura 3 – Diagrama Típico de um Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente.....	37
Figura 4 – Diagrama Típico do Procedimento de Eletrofiação de Membranas Poliméricas.....	38
Figura 5 – Esquema da Metodologia Utilizada para a Avaliação da Liberação de Íons pelas Membranas Eletrofiadas	40
Figura 6 – Esquema da Metodologia Utilizada para o Isolamento das Células Tronco de Ligamento Periodontal Humano.....	41
Figura 7 – Esquema da Metodologia Utilizada para o Isolamento das Células Tronco de Ligamento Periodontal Humano.....	43
Figura 8 – Esquema do Ensaio para Viabilidade, Adesão e Proliferação Celular	44
Figura 9 – Esquema do Teste de Fosfatase Alcalina.....	46
Figura 10 – Esquema do Ensaio de Vermelho de Alizarina	47
Figura 11 – Ensaio de Quantificação de Colágeno	48
Figura 12 – Ensaio para Quantificação de Glicosaminoglicanos	49
Figura 13 – Ensaio para a Diferenciação dos Glicosaminoglicanos Sintetizados	50
Figura 14 - Análise de Difração de Raio X (DRX) das Hidroxiapatitas Sintetizadas	53
Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura com aumento de	54

x50.000 dos materiais sintetizados	
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura com aumento de x500 de membranas eletrofiadas	55
Figura 17 - Média e desvio-padrão da liberação cumulativa iônica para (A) íons cálcio; (B) íons fósforo; (C) íons magnésio: e (D) íons estrôncio em pH 7,0.....	56
Figura 18 - Média e desvio-padrão da liberação cumulativa iônica para (A) íons cálcio; (B) íons fósforo; (C) íons magnésio: e (D) íons estrôncio em pH 5,5.....	57
Figura 19 - Média e desvio-padrão da absorbância em 450 nm do ensaio de proliferação celular CCK-8 em 1 e 7 dias de cultivo.....	58
Figura 20 - Média e desvio-padrão da absorbância (405nm) relativa a atividade de fosfatase alcalina em células-tronco do ligamento periodontal cultivadas sobre as diferentes membranas em (A) meio de diferenciação osteogênica; e (B) meio clonogênico.....	59
Figura 21 - Média e desvio-padrão da absorbância (560 nm) relativa ao ensaio de vermelho de alizarina de células-tronco do ligamento periodontal cultivadas sobre as diferentes membranas em (A) meio de diferenciação osteogênica; e (B) meio clonogênico	60
Figura 22 - Curva padrão de colágeno com leitura da absorbância em 490 nm	61
Figura 23 - Média e Desvio-padrão da concentração de colágeno nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias.....	62
Figura 24 - Curva padrão de condroitina com leitura da absorbância em 540nm.....	62
Figura 25 - Média e Desvio-padrão da concentração de GAG totais nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias.....	63
Figura 26 - Média e Desvio-padrão da fração de (A) glicosaminoglicanos digeridos com enzima condroitinase AC; (B) glicosaminoglicanos digeridos com enzima condroitinase ABC; (C) glicosaminoglicanos digeridos com enzima queratanase; nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias após incubação.....	64

Lista de Abreviaturas

BTE	Bioengenharia Tecidual Óssea
PLLA	Poli-(l-ácido láctico)
HA	Hidroxiapatita
Sr ²⁺	Estrôncio
Mg ²⁺	Magnésio
HSC	Células-tronco hematopoiéticas
MSC	Células-tronco Mesenquimatosas
MEC	Matriz Extracelular
NCP	Proteínas não colágenas
DTC	Defeito de tamanho crítico
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
PLA	Ácido polilático
PCL	Policoprolactona
PGA	Ácido Poliglicílico
PU	Poliuretano
GBR	Regeneração Óssea Guiada
PLGA	Ácido Glicólico
CaP	Fosfato de Cálcio
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
nHAP	Nano-hidroxiapatita
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória

ALP	Fosfatase Alcalina
hPDLSC	Células-tronco do Ligamento Periodontal Humano
DRX	Difração de RaioX
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
PBS	Solução Tampão Fosfato
SFB	Soro Fetal Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
ODM	Meio de Osteodiferenciação
CCK-8	Cell Counting Kit
GAG	Glicosaminoglicano
DMMB	Azul de 1,9-dimetilmetileno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Tecido ósseo e Regeneração Óssea	18
2.2	Requisitos ideais para a matriz de suporte celular	20
2.3	Composição das matrizes de suporte celular	22
2.4	Alterações iônicas em matrizes de suporte celular - Dopagem iônica da hidroxiapatita com magnésio e estrôncio.....	26
2.5	Métodos de fabricação de matrizes de suporte celular: eletrofição	29
3	HIPÓTESE.....	31
4	OBJETIVOS	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
6	RESULTADOS	50
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual (BTE) é uma área da ciência bastante promissora para a regeneração dos tecidos ósseos.^{1,2} A combinação de três fatores chaves é fundamental para o sucesso desta terapia: um biomaterial capaz de formar uma matriz de suporte celular, células-tronco para regeneração dos tecidos e moléculas bioativas que direcionam a diferenciação celular para o tecido alvo.^{3, 4} Estudos mostram que a associação de compostos inorgânicos a polímeros sintéticos na síntese de matrizes de suporte celular é uma alternativa bastante vantajosa para se aliar as propriedades dos dois tipos de materiais,⁵ como a taxa de degradação e propriedades mecânicas ajustáveis dos poliésteres com a capacidade de formar núcleos de cristalização, e aumentar a mineralização da matriz extracelular dos fosfatos de cálcio.⁵⁻⁷ O poli (L-ácido láctico) (PLLA) é um polímero sintético biodegradável amplamente utilizado como matriz em engenharia tecidual devido à sua biocompatibilidade, processabilidade e capacidade de degradação em produtos não tóxicos.⁵

Dentre os compostos inorgânicos, como o fosfato de cálcio, destaca-se a hidroxiapatita (HA) por ser o mineral mais presente nos tecidos mineralizados do organismo,⁸ como ossos e dentes. Estudos tem relatado que tal composto apresenta não apenas propriedade de osteocondução, como os outros fosfatos de cálcio, mas também alta capacidade osteoindutora.^{9, 10} Porém, no organismo, nem sempre a hidroxiapatita está em sua forma pura. Parte dos íons cálcio são substituídos por outros íons como Zinco, Estrôncio (Sr^{2+}) e Magnésio (Mg^{2+}), cujas substituições têm mostrado aumento da bioatividade do material in vitro.¹¹⁻¹³ O Magnésio apresenta conhecido efeito direto e indireto no metabolismo ósseo e na síntese de vitamina D, aumenta a viabilidade celular, a produção de fosfatase alcalina e osteocalcina.¹⁴ Já a influência do estrôncio tem sido associada a uma correta formação óssea, quando em pequenas concentrações, sendo sua presença mais acentuada em ossos neoformados.^{15, 16}

A dopagem da HA com diferentes concentrações desses íons pode, portanto, gerar uma matriz de suporte celular com propriedades otimizadas, favorecendo o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea e, conseqüentemente, uma regeneração mais eficiente.

Diante disso, investigar o efeito osteogênico de matrizes de suporte celular

contendo HA dopada com magnésio e estrôncio é de grande relevância científica e clínica, podendo contribuir para o desenvolvimento de biomateriais avançados e oferecer alternativas mais eficazes em procedimentos reconstrutivos na área da saúde.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Tecido ósseo e Regeneração Óssea*

O tecido ósseo é uma estrutura multifuncional que, além de fornecer suporte mecânico ao corpo, desempenha funções biológicas essenciais à manutenção da vida.^{17,18}

A composição do osso inclui elementos orgânicos e inorgânicos, sendo aproximadamente 20% de sua massa constituída por água.¹⁹ O osso seco é formado por cerca de 65–70% de fosfato de cálcio inorgânico e 30–35% de matriz orgânica composta por proteínas fibrosas e colágeno. O osteóide, matriz orgânica não mineralizada secretada pelos osteoblastos, é constituído majoritariamente por colágeno tipo I (90%) e substância fundamental (10%), além de proteínas não colagenosas, glicoproteínas, proteoglicanos, peptídeos, carboidratos e lipídios. A mineralização do osteóide ocorre pela deposição de sais minerais inorgânicos, conferindo ao osso resistência e rigidez.¹⁸ O osso cortical e o osso esponjoso oferecem um espaço de suporte e proteção para o crescimento das células do tecido ósseo, compostas principalmente por nichos osteoblásticos e vasculares, incluindo células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células-tronco mesenquimatosas (MSCs) e estão localizadas na medula óssea.^{17,18}

As MSCs são importantes na construção da matriz extracelular óssea (MEC) composta principalmente por fibras de colágeno (85-90%).^{20,21} Cristais de HA, com propriedades mecânicas anisotrópicas superiores, são mineralizados nos interstícios dessas fibras de colágeno em um processo controlado de biomineralização. Além das fibras de colágeno, a MEC contém uma quantidade considerável de proteínas não colágenas (NCPs), como osteocalcina, osteonectina, osteopontina, proteínas de adesão (por exemplo, fibronectina e vitronectina) e proteoglicanos (como versicana, decorina e hialuronano).²² Essas proteínas não são apenas envolvidas na construção da MEC, como no processo de mineralização do colágeno, mas também participam da regulação do destino das células no tecido ósseo.²³ Além da interação direta com as células, a MEC também pode atuar como uma plataforma para a entrega de biomoléculas solúveis secretadas por diversas células, incluindo citocinas (como fatores de crescimento e fatores imunomoduladores) e hormônios, regulando assim o

comportamento biológico das células no microambiente. Essas biomoléculas solúveis são um meio importante de comunicação entre as células e desempenham um papel fundamental na homeostase do microambiente celular.²⁴

Em contraste com outros tecidos e órgãos, o tecido ósseo geralmente apresenta uma capacidade de auto recuperação superior, uma vez que a área danificada consegue recuperar sua estrutura original e resistência mecânica sem deixar cicatrizes fibrosas.^{2,5} No entanto, quando a extensão dos defeitos ósseos ultrapassa o limite do defeito de tamanho crítico (DTC), esses defeitos não conseguem se curar por si mesmos, sendo necessária uma intervenção clínica apropriada, com a estimulação do processo de regeneração óssea.^{17,18}

A regeneração de defeitos ósseos críticos representa um dos maiores desafios da odontologia e ortopedia regenerativa. Atualmente, a abordagem clínica para o tratamento de defeitos ósseos de grande dimensão inclui principalmente o uso de enxertos ósseos autólogos e alogênicos. Os enxertos ósseos autólogos são considerados o padrão-ouro para a reparação e regeneração do tecido ósseo, pois o osso autógeno apresenta boas propriedades de osteoindução, osteocondutividade e osseointegração, capazes de formar uma estrutura coordenada e garantir a resistência mecânica no local do defeito ósseo. Contudo, o transplante de osso autógeno ainda apresenta desvantagens inevitáveis, como lesões neurovasculares no local doador, inflamação, infecção, limitações no fornecimento de osso doado e custos elevados.^{17,18,25} Para contornar essas limitações, os enxertos ósseos alogênicos têm sido amplamente utilizados devido à sua acessibilidade. No entanto, o transplante de osso alogênico enfrenta problemas como baixa osseointegração, rejeição imune e possibilidade de transmissão de doenças sanguíneas.^{20,25}

Diante dessa situação, os pesquisadores começaram a investigar alternativas artificiais aos enxertos derivados do osso natural. Avanços recentes em BTE permitiram a utilização de múltiplos métodos para combinar células, biomateriais e fatores biológicos com o objetivo de criar tecidos artificiais para a reparação de defeitos ósseos.^{17,18,25} Esses métodos apresentam vantagens como alta propriedades mecânicas, baixo risco de infecciosidade, excelente biocompatibilidade e reduzidas complicações.²⁵

Nesse contexto, as matrizes de suporte celular tridimensionais vêm sendo amplamente investigadas como alternativas aos enxertos autólogos e alógenos, oferecendo suporte estrutural temporário e estimulando a neoformação óssea.²⁶ No entanto, para que esses processos ocorram de forma eficaz, é necessário que os materiais utilizados nas matrizes de suporte celular sejam capazes de adsorver proteínas específicas, interagir com MEC por meio da troca iônica e atrair biomoléculas ou fatores de crescimento.^{1,4} A interação com a MEC ocorre predominantemente após a adsorção de proteínas na superfície do material, sendo que a natureza dessas proteínas determina a resposta fisiológica desencadeada pelo organismo. Quando a interação é positiva, a cascata de regeneração óssea é favorecida, incluindo a liberação de fatores de crescimento como VEGF e BMPs. Por outro lado, materiais inadequados podem induzir uma resposta imune exacerbada, caracterizada pela adsorção preferencial de fibrina na área do defeito ósseo. Essa especificidade na adsorção está relacionada a propriedades como carga superficial, molhabilidade, composição química e estrutura das proteínas.^{1,4,7}

2.2 Requisitos ideais para a matriz de suporte celular

Matrizes de suporte celular sintéticas utilizados na BTE atuam como moldes para a formação tecidual e estimulam a regeneração óssea por meio da interação com a MEC. A matrizes de suporte celular ideal deve reunir propriedades biológicas, como biocompatibilidade e bioatividade, além de promover osteocondução e, preferencialmente, osteoindução. Mecanicamente, deve apresentar resistência suficiente para suportar cargas temporárias e degradar-se em sincronia com a regeneração tecidual. Arquiteturalmente, estruturas com porosidade interconectada $\geq 300 \mu\text{m}$ favorecem a vascularização e a formação óssea, enquanto microporos aumentam a área de interação celular.^{27,28}

Um dos principais objetivos dessas matrizes de suporte celular é mimetizar o nicho biológico local do tecido a ser regenerado. Para isso, é essencial que a estrutura da matriz favoreça a angiogênese, permitindo o transporte eficiente de nutrientes, biomoléculas e resíduos metabólicos.^{1,2,5} Sendo uma plataforma estrutural para as células envolvidas na regeneração óssea, essa matriz deve favorecer a invasão de

vasos sanguíneos, bem como a migração, proliferação, diferenciação e comunicação celular.¹⁰

De forma geral, uma matriz de suporte celular ideal deve apresentar características intrínsecas fundamentais, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas compatíveis com o tecido ósseo. Além disso, o sucesso na formação de um tecido funcional depende da colonização completa da matriz pelas células semeadas. Para isso, a estrutura deve favorecer a adesão, proliferação, diferenciação celular e deposição de MEC, permitindo sua substituição gradual pelo tecido nativo.^{2,4,10}

Os principais parâmetros relacionados à estrutura biomimética das matrizes de suporte celular incluem porosidade, área de superfície, tamanho dos poros e conectividade.²⁹ A estrutura óssea natural apresenta uma hierarquia complexa de porosidades, que variam conforme o tipo, a localização e a função do osso. Por isso, matrizes eficazes para engenharia de tecidos ósseos devem reproduzir essa diversidade, apresentando poros de diferentes tamanhos, formas e distribuições.^{4,13}

O tamanho dos poros, em particular, exerce forte influência sobre a reparação óssea. Poros de grandes dimensões tendem a reduzir a razão entre a área superficial e o volume da matriz, limitando o espaço disponível para a proliferação celular; por outro lado, poros muito pequenos dificultam a migração e a comunicação entre as células. Estudos indicam que um intervalo de tamanho de poros entre 100 e 1000 μm é geralmente adequado para favorecer o crescimento celular, a perfusão sanguínea e a resistência mecânica da matriz.³⁰ Xue et al³¹. demonstraram que poros com diâmetro superior a 200 μm favorecem o alinhamento celular ao longo da superfície do poro, enquanto poros menores que 100 μm não sustentam o crescimento celular. Assim, poros dentro dessa faixa intermediária tendem a promover melhor regeneração óssea. No entanto, outros estudos indicam que poros ainda maiores (>300 μm) podem resultar em formação óssea mais eficiente.^{2, 30, 31} Ainda não há um consenso sobre o tamanho de poro ideal, uma vez que variáveis experimentais, como o tipo de material utilizado e a localização do defeito ósseo, podem afetar significativamente os resultados. Há, contudo, uma tendência observada na literatura: poros menores (cerca de 100 μm) favorecem a adesão celular inicial *in vitro*, enquanto poros maiores (400–600 μm) parecem ser mais eficazes na indução da vascularização e da osteogênese

in vivo.³²⁻³⁵

Quanto à porosidade, para mimtizar o osso trabecular, as matrizes de suporte celular devem apresentar porosidade entre 50% e 90%. Já para simular o osso cortical, a porosidade ideal situa-se entre 10% e 30%. Além disso, as matrizes devem ser projetadas para se adaptar à morfologia do defeito e às características específicas do tecido do paciente. Isso inclui a reprodução da arquitetura e composição bioquímica do osso saudável, o que pode favorecer a resposta celular e a síntese de matriz, mesmo na ausência de suplementos externos, como demonstrado por Yedekçi et al.³⁶ em tecidos osteocondrais e meniscais.^{2,30,32} Ainda que a alta porosidade e conectividade favoreçam a vascularização, a osteogênese e a degradação homogênea da matriz, essas características geralmente comprometem suas propriedades mecânicas. Portanto, o reforço da resistência mecânica deve ser considerado como um aspecto adicional e essencial no desenvolvimento de matrizes de suporte celular para aplicações em BTE.^{1,2,5,33}

O primeiro passo para o fortalecimento mecânico de uma membrana é a escolha adequada do material de matriz. Em comparação com hidrogéis, os polímeros sintéticos apresentam, em geral, melhores características mecânicas e maior plasticidade. Além disso, a incorporação de agentes de reforço — como a hidroxiapatita ou partículas metálicas — tem se mostrado eficaz para aumentar a resistência estrutural das matrizes de suporte celular.^{2, 5}

2.3 Composição das matrizes de suporte celular

Atualmente são usados na construção de matrizes de suporte celular, biomateriais naturais ou sintéticos, conforme sua origem. Polímeros naturais como alginato, quitosana e colágeno são amplamente empregados em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade e semelhança estrutural com os tecidos do organismo.¹ Por outro lado, polímeros sintéticos como o ácido polilático (PLA), policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA) e poliuretano (PU) apresentam maior controle sobre propriedades físico-químicas e podem superar algumas limitações dos

polímeros naturais. Contudo, sua natureza hidrofóbica dificulta a adsorção de proteínas, exigindo modificações para promover a interação com a MEC. Para isso, é comum a funcionalização das superfícies poliméricas com peptídeos bioativos, como RGD, YIGSR e IKVAV, que favorecem a adesão e proliferação celular.^{1,30}

O PLLA é um polímero semicristalino, biodegradável e biocompatível, derivado de fontes renováveis, amplamente investigado como biomaterial em matrizes de suporte celular para regeneração óssea.³⁷ Desde sua descoberta em 1932, o PLLA tem sido amplamente estudado quanto à sua estrutura cristalina, comportamento de fusão e propriedades mecânicas. Sua degradação ocorre por hidrólise das ligações éster, liberando ácido lático, um metabólito naturalmente integrado ao ciclo de Krebs, o que garante biodegradação não tóxica.^{37,38} O PLLA pode ser sintetizado a partir do ácido lático obtido por fermentação de matérias-primas de biomassa. Por ser renovável, apresentar alta resistência mecânica, elevado módulo de elasticidade, comportamento termoplástico e facilidade de processamento, o PLLA tornou-se um dos poliésteres termoplásticos mais estudados e aplicados na área biomédica.³

O PLLA apresenta boas propriedades mecânicas, além de ser solúvel em solventes comuns e degradar-se em um período considerado adequado para diversas aplicações em saúde.³⁷ Na odontologia, o PLLA tem sido explorado em barreiras de regeneração óssea, membranas para regeneração de tecidos periodontais, e em sistemas de fixação para cirurgia maxilofacial. Em procedimentos de regeneração óssea guiada (GBR) combinados com implantes na região estética maxilar, membranas de PLA (incluindo PLLA ou compósitos de PLA) têm sido usadas para manter o espaço ósseo enquanto o novo osso se forma. Por exemplo, estudo clínico relatou que uma membrana PLA manteve integridade funcional por 4- 6 meses, sendo absorvida completamente em 9- 12 meses, tempo compatível com o processo de osteogênese e remodelação óssea nessa aplicação.³⁹ Membrana composta de PLLA para regeneração de tecido periodontal ou ósseo, que em modelo in vitro apresentou estabilidade mecânica por mais de 100 dias, com degradação observável depois, mantendo-se manejável por até 6 meses.⁴⁰ Na reconstrução de fraturas, osteotomias ou defeitos ósseos em regiões como mandíbula, maxila e órbita, o PLLA puro apresenta uma restrição importante devido a seu tempo de degradação bastante prolongado. Estudos mostram que dispositivos de PLLA de peso molecular elevado

podem persistir no organismo entre 2 a 5,5 anos para degradação completa, dependendo de fatores como cristalinidade, peso molecular, formato, localização anatômica e carga mecânica. Essa longa permanência pode ocasionar resposta inflamatória tardia ou reação de corpo estranho em alguns casos.^{41,42} Para aplicações odontológicas que requerem reabsorção mais rápida, como sistemas de liberação de fármacos ou membranas temporárias para BTE, estratégias como a copolimerização com ácido glicólico (PLGA) são empregadas para acelerar a degradação, reduzindo o tempo funcional do material para poucos meses.⁴³ A composição, forma física e o ambiente de implantação também influenciam significativamente o tempo de degradação do PLLA.⁴⁴

Entre os pontos positivos das matrizes de PLLA, destaca-se a estabilidade estrutural inicial, que fornece suporte mecânico temporário para células osteogênicas e para a deposição de MEC. O PLLA também apresenta versatilidade de processamento, permitindo fabricação por técnicas como eletrofiação, impressão 3D e moldagem por solvente, o que viabiliza matrizes com diferentes graus de porosidade e interconectividade.⁴⁵

Contudo, o PLLA também apresenta limitações. Sua degradação é relativamente lenta, podendo não coincidir com a velocidade da regeneração óssea, o que em alguns casos leva à presença de fragmentos residuais que interferem na remodelação do tecido. Outro desafio é a hidrofobicidade da superfície, que reduz a adesão celular espontânea. Estratégias como modificação superficial por plasma, tratamentos alcalinos ou funcionalização com peptídeos bioativos (ex.: RGD, BMP-2, VEGF) têm sido propostas para superar essa barreira.⁴⁶

A utilização de materiais compósitos, ou seja, a combinação de diferentes componentes em uma única matrizes de suporte celular é essencial para atender simultaneamente às exigências físico-químicas necessárias para um desempenho eficaz. Essa abordagem multimaterial permite otimizar propriedades como resistência mecânica, bioatividade e funcionalidade biológica, promovendo uma regeneração óssea mais eficiente e integrada.¹ As propriedades mecânicas do poli(ácido L-lático) (PLLA) têm sido amplamente aprimoradas por meio de estratégias como reticulação química, plastificação e, principalmente, por meio da técnica de blends poliméricas.

A hidroxiapatita, principal componente inorgânico do osso natural, representa a forma mais estável de fosfato de cálcio (CaP) em condições fisiológicas, como temperatura, pH e composição dos fluidos corporais. Devido a essas características, a HA tornou-se um dos materiais mais amplamente utilizados na BTE pela sua bioatividade.⁴⁷ Estudos conduzidos por Selim et al.⁴⁸ demonstraram que os fosfatos liberados por matrizes biodegradáveis de CaP podem ser absorvidos por células-tronco, promovendo a conversão intracelular de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP). O aumento da concentração de ATP, por sua vez, ativa vias de sinalização intracelular mediadas por adenosina, tanto por mecanismos parácrinos quanto autócrinos. Essa ativação leva à expressão de fatores de transcrição osteogênicos, como osteocalcina e osteopontina, estimulando assim a diferenciação osteoblástica.⁴⁹ A taxa de liberação de fosfatos está diretamente relacionada à composição química do fosfato de cálcio, sendo a razão molar Ca/P um parâmetro crítico na avaliação da solubilidade e acidez do material. Quanto maior a razão Ca/P, menor a acidez e a solubilidade do composto. No caso da HA, a razão Ca/P é de 1,67, o que corresponde a uma baixa acidez e solubilidade, refletindo sua lenta taxa de degradação quando aplicada como biomaterial em BTE. Essa baixa biodegradabilidade é uma das razões pelas quais a HA, isoladamente, não é considerada ideal para a fabricação de matrizes com desempenho ótimo na regeneração óssea.⁵⁰ Para superar essas limitações, têm sido propostas combinações com polímeros biodegradáveis, como PLLA e PCL, resultando em matrizes híbridas que conciliam resistência mecânica e bioatividade.²⁴ Um exemplo relevante é o trabalho de Shuai et al.⁵¹ que desenvolveram uma matriz para BTE composta por PGA, PLLA e HA, utilizando tecnologia de impressão a laser 3D.⁵² A presença da HA no compósito contribuiu para melhorar significativamente a bioatividade e a osteocondutividade da matriz. Ensaio *in vitro* demonstraram excelente cito compatibilidade, enquanto estudos *in vivo* confirmaram sua eficácia na regeneração óssea, evidenciando seu potencial como plataforma funcional para aplicações em BTE.⁵²

Compósitos de PLLA com nano-hidroxiapatita (nHAP) têm mostrado grande potencial na regeneração de defeitos ósseos extensos. Em estudo realizado por Gay et al.⁵³ foram produzidos compósitos densos de PLLA/nHAP por prensagem a quente, com o objetivo de avaliar a relação entre as propriedades mecânicas e a concentração

de nHAP, utilizando amostras densas em vez de matrizes porosas.⁴ As partículas de nHAP foram previamente desaglomeradas e dispersas em clorofórmio, mantendo sua distribuição e tamanho durante todo o processamento do compósito. Ensaio mecânicos revelaram que o aumento da concentração de nHAP resultou em elevação do módulo de Young e da resistência mecânica, embora tenha sido observada uma maior fragilidade do composto. Os compósitos contendo 50% em massa de nHAP apresentaram módulo de Young superior a 6 GPa e resistência à compressão uniaxial acima de 100 MPa, valores comparáveis ao osso cortical.⁴ Esses resultados indicam que os compósitos de PLLA/nHAP representam uma alternativa promissora para o desenvolvimento de substitutos ósseos bioabsorvíveis com desempenho mecânico superior.^{4,36}

Do ponto de vista osteogênico, estudos pré-clínicos indicam que matrizes híbridas de PLLA com nHAP promovem maior expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, como Runx2, osteocalcina e fosfatase alcalina, em comparação ao PLLA puro.⁵⁴ Ensaio in vivo também demonstram que a associação do PLLA à liberação controlada de fatores angiogênicos acelera a regeneração em defeitos críticos.⁵⁵

2.4 Alterações iônicas em matrizes de suporte celular - Dopagem iônica da hidroxiapatita com magnésio e estrôncio.

O uso de íons para alteração nas propriedades mecânicas e biológicas das matrizes de suporte celular de polímeros também é alvo atual de diversos estudos científicos. O estudo conduzido por Maia et al.⁵⁶ concentra-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis e bioabsorvíveis para implantes de osteossíntese, por meio da formulação de compósitos de polímero/magnésio. Os resultados demonstraram que a adição de 30% em massa de partículas de magnésio ao PLLA promoveu melhorias significativas nas propriedades mecânicas do compósito, incluindo aumento da dureza (atingindo até 340 MPa) e da resistência ao escoamento (até 100 MPa). Ensaio de ultra microindentação revelaram um aumento no módulo de Young, alcançando valores de até 8 GPa, atribuídos exclusivamente ao reforço proporcionado

pelas partículas metálicas. Essa conclusão foi corroborada por análises de calorimetria diferencial exploratória (DSC), que indicaram níveis de cristalinidade semelhantes entre o polímero puro e o compósito, descartando a influência da cristalinidade na melhoria mecânica observada.^{4,36,56}

A dopagem iônica da HA consiste na substituição parcial de Ca^{2+} por íons bioativos, como Mg^{2+} e Sr^{2+} , promovendo modificações estruturais capazes de otimizar sua bioatividade. O Mg^{2+} , presente naturalmente no osso, desempenha papel fundamental na mineralização e no metabolismo ósseo. É o quarto cátion mais abundante no corpo humano e cerca de 60% do total corporal encontra-se armazenado no tecido ósseo, onde exerce funções estruturais e regulatórias. No osso, o Mg^{2+} se associa à fase mineral e à matriz orgânica, contribuindo para a estabilidade cristalina da HA e influenciando diretamente o processo de mineralização.⁵⁷ Do ponto de vista metabólico, o magnésio é cofator em mais de 300 reações enzimáticas, incluindo aquelas relacionadas ao metabolismo energético e ao controle da fosforilação oxidativa. No tecido ósseo, atua regulando a atividade da fosfatase alcalina (ALP), enzima essencial para a deposição de fosfato na matriz mineralizada, e modulando a diferenciação osteoblástica por meio de vias de sinalização intracelular como Wnt/ β -catenina e MAPK/ERK.⁵⁸

Diversos estudos demonstram que a deficiência de magnésio está associada à redução da massa óssea, aumento da reabsorção osteoclástica e maior risco de osteoporose. Isso ocorre porque baixos níveis de Mg^{2+} favorecem inflamação sistêmica e estresse oxidativo, fatores que comprometem a homeostase óssea.⁵⁹ Na engenharia tecidual, o Mg^{2+} tem sido utilizado na dopagem de matrizes de suporte celular de hidroxiapatita, o que resulta em aumento da solubilidade, aceleração da degradação do biomaterial e maior liberação iônica. Essa liberação controlada de Mg^{2+} promove adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, além de estimular a neoformação óssea em defeitos críticos.⁵⁷ Ensaios *in vivo* também demonstram que a presença de Mg^{2+} melhora a vascularização local, aspecto essencial para a regeneração de grandes defeitos ósseos.^{57,60}

O estrôncio (Sr^{2+}) é um cátion divalente quimicamente semelhante ao cálcio, capaz de se incorporar à fase mineral óssea, substituindo parcialmente o Ca^{2+} na hidroxiapatita. Essa característica confere ao Sr^{2+} um papel relevante na homeostase

do tecido ósseo, tanto no metabolismo fisiológico quanto em aplicações terapêuticas. Desde a introdução clínica do ranelato de estrôncio no tratamento da osteoporose, consolidou-se a evidência de que o íon exerce dupla ação: estimula a atividade osteoblástica e inibe a osteoclástica, resultando em maior formação e menor reabsorção óssea.⁶¹ Essa ação combinada confere potencial osteoindutor superior, especialmente em situações de osteoporose e defeitos críticos. Do ponto de vista celular, estudos demonstraram que o Sr^{2+} promove a diferenciação osteoblástica, aumentando a expressão de marcadores como Runx2, osteocalcina e fosfatase alcalina. Simultaneamente, o Sr^{2+} reduz a diferenciação de osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea, modulando o equilíbrio da remodelação óssea em direção à neoformação.^{62,63}

Na engenharia tecidual óssea, a dopagem de matrizes de suporte celular com Sr^{2+} tem recebido atenção crescente. A substituição parcial do Ca^{2+} por Sr^{2+} na hidroxiapatita aumenta a solubilidade e a bioatividade do biomaterial, favorecendo a liberação local controlada do íon. Essa liberação atua como sinalizador osteoindutor, estimulando células progenitoras e promovendo tanto osteogênese quanto angiogênese, fatores fundamentais para a regeneração de defeitos críticos. Revisões recentes reforçam que o Sr^{2+} melhora significativamente a angiogênese, promovendo a expressão de VEGF e estimulando a formação de novos vasos, o que potencializa a viabilidade do tecido ósseo em regeneração.⁶³ Além disso, estudos indicam que o Sr^{2+} altera a nanoestrutura e a cristalinidade da hidroxiapatita, o que pode contribuir para maior resistência mecânica do osso regenerado.¹⁶

Essas modificações aproximam a HA dopada de um perfil funcional mais semelhante ao osso natural, ampliando sua aplicabilidade em contextos clínicos. Além disso, a presença de íons bioativos pode modular a resposta imune, induzindo um fenótipo de macrófagos pró-regenerativo (M2), o que cria um microambiente mais favorável à regeneração óssea.⁶⁵ Estudos pré-clínicos em modelos animais demonstram que matrizes de HA dopada com Sr^{2+} e Mg^{2+} apresentam maior taxa de neoformação óssea, melhor integração vascular e resistência mecânica superior ao osso regenerado, em comparação à HA pura.⁴⁶

Na odontologia, esses biomateriais têm potencial para serem aplicados em preservação alveolar, elevação de seio maxilar e tratamento de defeitos peri-

implantares. Ensaios clínicos iniciais indicam que a combinação de matrizes de HA dopada, associada a fatores de crescimento ou células-tronco pode representar alternativa viável aos enxertos autólogos, reduzindo morbidade cirúrgica.²⁴

2.5 Métodos de fabricação de matrizes de suporte celular: eletrofição

Além da escolha adequada do biomaterial, outro fator crítico na produção de matrizes de suporte celular para BTE é a estratégia de fabricação adotada. O método de fabricação influencia diretamente propriedades fundamentais como porosidade, resistência mecânica e gradientes de composição — todos essenciais para mimetizar com precisão o tecido ósseo. Para selecionar a técnica mais apropriada, é necessário considerar a arquitetura desejada da matriz e como o processamento afetará o desempenho do biomaterial escolhido.^{2,3}

Diversas técnicas têm sido exploradas para a produção de matrizes de suporte celular porosas, incluindo moldagem por solvente (solvent casting) e liofilização (freeze-drying). No entanto, a maioria dessas abordagens tradicionais apresenta limitações quanto ao controle preciso da arquitetura da matriz, como o tamanho, geometria, distribuição e interconectividade dos poros, o que dificulta sua aplicação em larga escala.^{2,3} Nesse contexto, as estratégias de manufatura aditiva, como a impressão tridimensional (3D printing), estereolitografia, modelagem por deposição fundida e sinterização seletiva a laser, têm se destacado por superar essas limitações. Essas tecnologias permitem a fabricação de matrizes com geometrias complexas e altamente controladas, possibilitando a personalização da estrutura para atender às necessidades específicas de cada paciente e aplicação clínica.²

Nos últimos anos, a tecnologia de eletrofição (electrospinning) tem sido amplamente explorada por pesquisadores na fabricação de matrizes poliméricas nano-fibrosas, capazes de mimetizar características estruturais do osso natural.⁶⁶ A eletrofição consiste na injeção de uma solução polimérica, a qual é aplicada alta voltagem, que supera a tensão superficial do fluido, permitindo a formação de um jato contínuo que se estende até o coletor, onde as fibras poliméricas são depositadas.

Apresenta elevada razão entre área de superfície e volume, composição ajustável e boa preservação da topografia superficial. A organização dessas fibras no coletor influencia diretamente o volume poroso e a arquitetura superficial da matriz.^{1,2,66} O sistema básico de eletrofiação é composto por uma fonte de alta tensão, uma seringa com agulha acoplada contendo a solução polimérica e um coletor aterrado. Essa solução é alimentada com vazão controlada por uma bomba de precisão. A aplicação de alta voltagem na ponta da agulha metálica induz repulsão de cargas, o que leva à formação de um jato de fluido a partir da gota localizada na extremidade da agulha.¹⁰⁻¹³ Esse jato inicial segue um trajeto linear, mas logo desenvolve instabilidades, incluindo deformações com trajetórias circulares e helicoidais, até que as nanofibras sejam depositadas no coletor. Além da força eletrostática, outras forças influenciam o processo de formação das fibras, como a tensão superficial, força viscoelástica, resistência do ar e a gravidade. A interação dinâmica dessas forças determina a morfologia final das nanofibras geradas.^{10-13,52} Apesar das vantagens da eletrofiação, uma de suas principais limitações está relacionada à produção de fibras em escala submicrométrica. Essa característica resulta na formação de poros em escala nanométrica, o que dificulta a infiltração da matriz extracelular (MEC) e a migração celular — processos essenciais para a regeneração tecidual eficaz.¹

Avanços contínuos têm expandido as possibilidades da eletrofiação, incluindo a produção de fibras bicomponentes, o uso de múltiplos jatos (multijet electrospinning), eletrofiação sem agulhas para escalonamento industrial, eletrofiação em emulsão, eletrofiação livre de energia superficial, além de técnicas multifuídicas como a eletrofiação coaxial, triaxial e lado-a-lado (side-by-side). Dessa forma, a eletrofiação se consolida como uma tecnologia versátil, com aplicações promissoras em diversas frentes da engenharia biomédica avançada.⁵

3. HIPÓTESE

A dopagem da hidroxiapatita (HA) com íons magnésio (Mg^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}), incorporada em membranas de poli-L-lactídeo (PLLA), aumenta a capacidade de osteodiferenciação e proliferação de células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLSCs), além de modular positivamente a produção da matriz extracelular, em comparação às membranas contendo HA convencional.

4. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- ✓ Sintetizar hidróxiapatitas convencional (sem modificações iônicas) e dopadas com íons Magnésio (Mg^{+2}) e Estrôncio (Sr^{+2}) em duas diferentes concentrações;
- ✓ Produzir membranas eletrofiadas de poli-L-lactídeo (PLLA) puro ou enriquecido com essas três hidroxiapatitas sintetizadas;
- ✓ Avaliar a proliferação, osteocondutividade, e osteodiferenciação de células-tronco do ligamento periodontal humano (hPDLSCs) cultivadas nessas estruturas;
- ✓ avaliar a matriz extracelular formada por cultura de hPDLSC sobre estas malhas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Síntese das Hidroxiapatitas com Substitutos Iônicos

A síntese de hidroxiapatitas modificadas, onde íons cálcio foram substituídos por íons estrôncio ou magnésio, foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura.^{17,18} Inicialmente, foram preparadas as soluções de 0,03M hidrogênio fosfato de diamônio em água destilada e 0,05M nitrato de cálcio tetra hidratado. Ambas as soluções tiveram seu pH ajustado para pH 10 usando solução de hidróxido de amônia. Foram sintetizadas três hidroxiapatitas diferentes. A **HA_Ca** foi produzida usando-se apenas 0,03M de Hidrogênio Fosfato Diamônio e 0,050M de Nitrato de Cálcio. Nas hidroxiapatitas modificadas (**HA_M**) foram adicionados à solução de nitrato de cálcio, o nitrato de estrôncio e o nitrato de magnésio, em duas concentrações, conforme apresentado na tabela 1, de modo a formar duas diferentes hidroxiapatitas denominadas **HA_M1** contendo 85% de Nitrato de Cálcio, 7,5% de Nitrato de Magnésio e 7,5% de Nitrato de Estrôncio e **HA_M2** com 85% de Nitrato de Cálcio, 10% Nitrato de Magnésio e 5% de Nitrato de Estrôncio. As soluções foram mantidas sob agitação por 5h em atmosfera de nitrogênio, centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min, lavadas com água deionizada e secas em estufa a 60°C por 48 h.

Quadro 1 - Concentrações molares utilizadas nas diferentes sínteses das hidroxiapatitas convencional e modificada.

Material	Concentração Molar (M)						Hidrogênio Fosfato Diamônio
	Nitrato de Cálcio	%	Nitrato de Magnésio	%	Nitrato de Estrôncio	%	
HA_Ca	0,050	100	-	0	-	0	0,03
HA_M1	0,0425	85	0,00375	7,5	0,00375	7,5	0,03
HA_M2	0,0425	85	0,0050	10	0,0025	5	0,03

5.2 Caracterização das Hidroxiapatitas com Substitutos Iônicos

A caracterização das HA sintetizadas (HA_Ca, HA_M1 e HA_M2; n = 3 para cada

grupo) foi realizada utilizando as metodologias de Difração de Raio X e Microscopia Eletrônica de Varredura, e a análise da incorporação iônica foi determinada por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), conforme descrito a seguir.

5.2.1 Avaliação da Formação das Hidroxiapatitas

Para confirmar se a síntese proposta resultou na formação de hidroxiapatita, as amostras ($n = 1$ para cada HA sintetizada) foram avaliadas por difração de raio-X (DRX) de pó, utilizando-se um difratômetro Rigaku modelo Miniflex com radiação de $\text{CuK}\alpha$, $\lambda=1,54183\text{\AA}$ e filtro Ni (Figura 1). A técnica de DRX se baseia na interação dos raios X com os átomos organizados em uma estrutura cristalina. Quando um feixe de raios X incide sobre um cristal, ele é disperso pelos planos atômicos internos do material. Em certos ângulos, essas ondas dispersas se reforçam mutuamente (interferência construtiva), gerando um padrão de difração chamado de difratograma, que pode ser detectado e analisado. Todas as HA sintetizadas foram analisadas por essa metodologia e comparadas com o padrão de HA comercial.

Nesta caracterização, os difratogramas foram obtidos com varredura 2θ de 0° a 90° em incrementos de $0,01^\circ$ e velocidade de varredura de $0,1 \text{ deg/min}$. Os dados de difração de raios X foram analisados por comparação a padrões de hidroxiapatita comercial para a identificação das fases presentes e plotados no programa OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

Figura 1 - Difratorômetro Miniflex (Rigaku Corporation, Japão)



Fonte: <https://rigaku.com/products/x-ray-diffraction-and-scattering/xrd/miniflex>

5.2.2 Avaliação da Morfologia das Hidroxiapatitas

As morfologias das diversas hidroxiapatitas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL - JSM 7401F, Jeol, Tóquio, Japão - Figura 2). Para isso, as amostras ($n = 1$ por grupo) foram secas em dessecador a vácuo, recobertas com 6 nm de ouro e analisadas para obtenção das imagens.

Figura 2 - Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL - JSM-7401F (Jeol, Tóquio, Japão).



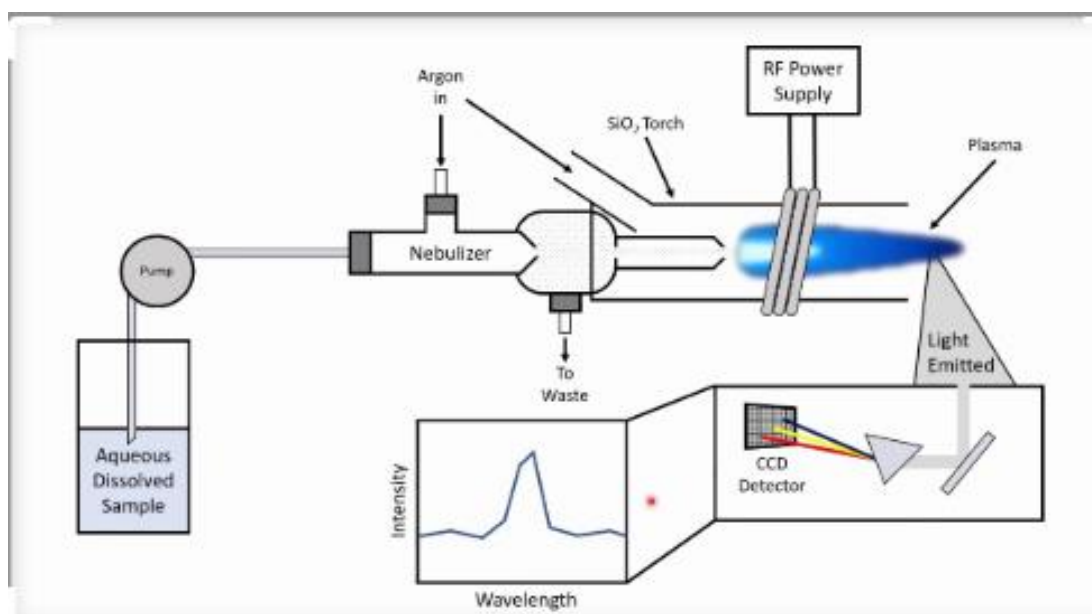
Fonte: <https://www.jeol.co.jp/products/scientific/sem/JSM-7401F.html>

5.2.3 Determinação da Incorporação Iônica às Hidroxiapatitas

A concentração de íons magnésio e estrôncio efetivamente incorporados nas amostras de hidroxiapatita foram mensurados por meio da análise ICP-OES (Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente). Esta é uma técnica que faz uso de uma fonte de excitação de plasma de argônio à alta temperatura (7.000 - 10.000 K) para produzir, em uma amostra induzida sob a forma de neblina no centro do plasma, átomos excitados que emitem radiação na faixa entre 125 e 950 nm, característica dos elementos nela presentes. As radiações emitidas após seleção dos seus comprimentos de onda por sistemas ópticos, têm suas intensidades medidas por meio de detectores de radiação específicos (Figura 3).

As intensidades observadas são correlacionadas às concentrações correspondentes de dado elemento químico através de curvas de calibração obtidas pela medição prévia de padrões certificados de referência.

Figura 3 – Diagrama Típico de um Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente.

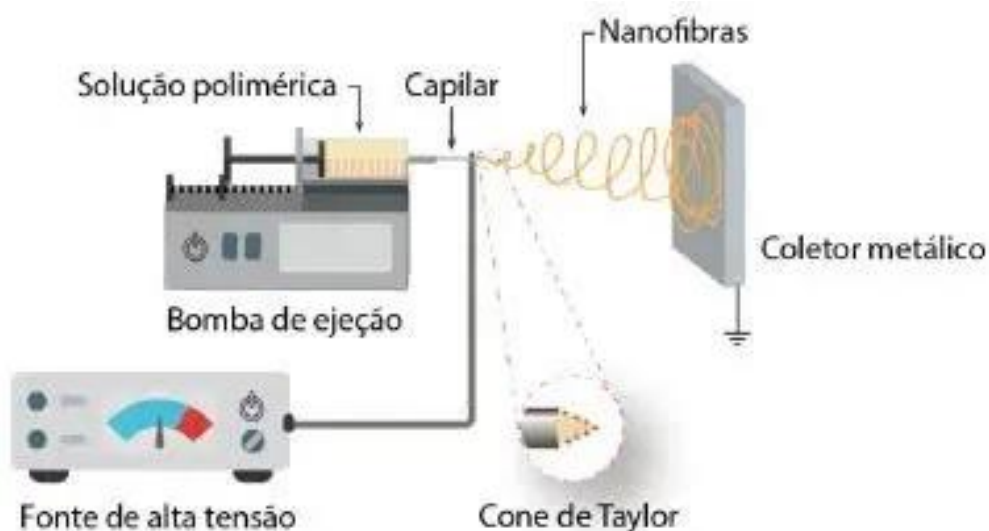


Fonte: <https://materean.com/icp-analysis/>

5.3 Síntese das Membranas Poliméricas Associadas às Hidroxiapatitas

A síntese de membranas poliméricas associadas às diferentes hidroxiapatitas se deu pelo processo de eletrofição (Figura 4). Para isso, em uma solução de PLLA (5% em peso) em clorofórmio, foi disperso 10% de hidroxiapatita (percentual relativo a massa do polímero). Após agitação foi adicionado o solvente dimetilformamida na proporção 1:9 em relação ao clorofórmio e a solução foi eletrofiada conforme os seguintes parâmetros: taxa de injeção de 3 mL/h, distância da agulha ao coletor de 18 cm e voltagem de 20kV.

Figura 4 – Diagrama Típico do Procedimento de Eletrofição de Membranas Poliméricas



Fonte: <https://www.scielo.br/j/qn/a/pyPdBqm8bxhT5dzqhCv6HVMformat=html&lang=>

Foram confeccionadas 4 tipos de membrana, a saber (tabela 2): membrana de PLLA puro (**PLLA**), caracterizando o grupo controle; membrana de PLLA associada a 10% hidroxiapatita convencional HA_100 (**PLLA_HA_Ca**); membrana de PLLA associada a 10% de HA_M1 (**PLLA_HA_M1**) e membrana de PLLA associada a 10% de HA_M2 (**PLLA_HA_M2**).

A morfologia das malhas sintetizadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (FEG 7401F, Jeol, Tóquio, Japão). As amostras foram secas em dessecador a vácuo, recobertas com 6nm de ouro e analisadas para obtenção das imagens. As malhas foram fotografadas com aumento de x1000.

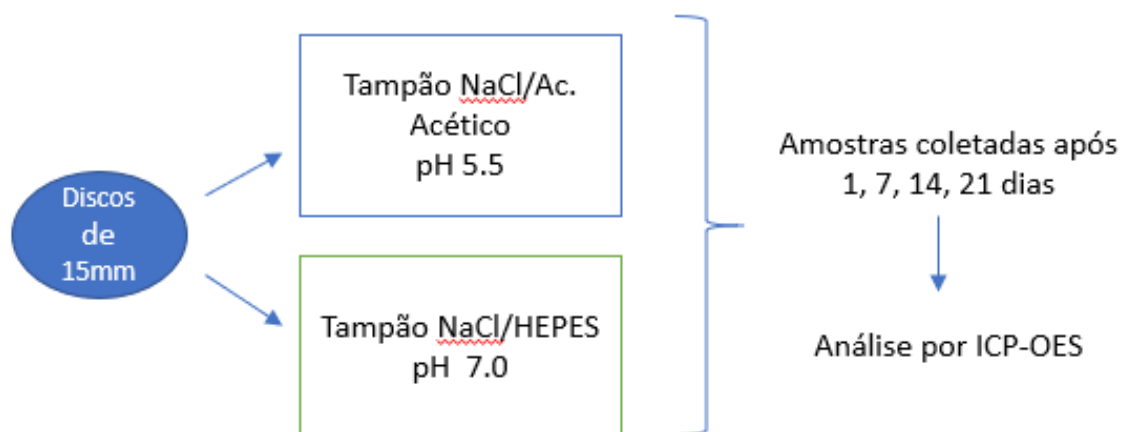
Quadro 2 - Composição das Membranas Sintetizadas por Eletrofiação de Soluções de PLLA e Diferentes Modificações de Hidroxiapatita.

GRUPO	COMPOSIÇÃO	
	PLLA	HA
PLLA	100%	0
PLLA_HA_Ca	90%	10% HA_Ca
PLLA_HA_M1	90%	10% HA_M1
PLLA_HA_M2	90%	10% HA_M2

5.4 Avaliação da Liberação Iônica nas Membranas Eletrofiadas

Para avaliação da liberação de íons cálcio (Ca^{2+}), fósforo (P), Magnésio (Mg^{2+}) e Estrôncio (Sr^{2+}), discos com 15mm de diâmetro de todas as membranas eletrofiadas foram cortados e pesados. Cada disco foi armazenado em 5 mL de solução tampão composta de: cloreto de sódio (133 mmol/L) e ácido acético (50 mmol/L), com pH 5,5; ou cloreto de sódio (133 mmol/L) e HEPES (50 mmol/L), com pH 7,0. Alíquotas de cada amostra foram coletadas aos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento e a concentração de íons cumulativa foi determinada por técnica de ICP-OES (Figura 5).

Figura 5 – Esquema da Metodologia Utilizada para a Avaliação da Liberação de íons pelas Membranas Eletrofiadas.



5.5 Isolamento de Células Tronco de Ligamento Periodontal Humano

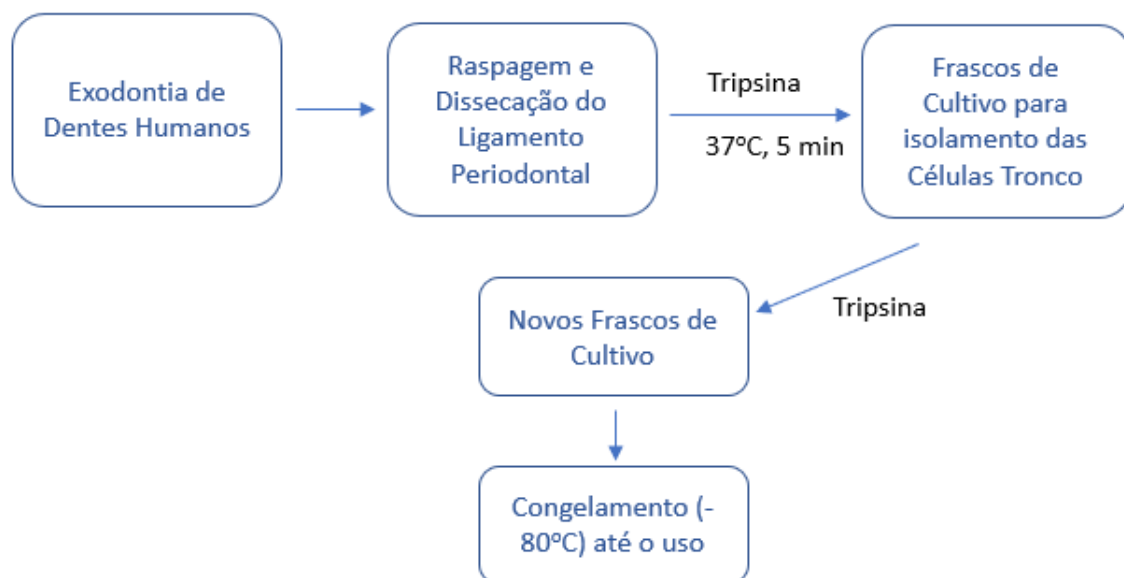
Culturas primárias de células de ligamento periodontal foram obtidas a partir de fragmentos de ligamento periodontal de dentes permanentes humanos, através da técnica de explante¹⁹ (Figura 6) após submissão e aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro, e com obtenção de consentimento livre e esclarecido dos pacientes (CAAE 75397823.5.0000.0081).

Dentes permanentes humanos hígidos com indicação para exodontia, por questões ortodônticas ou protéticas, foram extraídos sob anestesia local, e imediatamente transportados ao laboratório em meio de cultivo celular DMEM, suplementado com 10% soro fetal bovino e 2% de antibiótico e antimicótico. O ligamento periodontal foi removido por raspagem com curetas periodontais, o tecido foi lavado 2 vezes em solução estéril de PBS (solução tampão fosfato- salina sem cálcio e sem magnésio, pH 7,2), suplementado com 4% de antibiótica penicilina/estreptomicina (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, EUA) e foram dissecados em vários fragmentos.

Após remoção do PBS, os fragmentos permaneceram em solução de tripsina em estufa a 37°C, durante 5 minutos. Após inativação da tripsina com meio contendo

soro fetal bovino (SFB), os explantes foram colocados em frascos de cultivo contendo meio DMEM/HAM's 12, (1:1, Invitrogen) suplementado com 15% de SFB (Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100 U/mL de penicilina (Invitrogen), 100µg/mL de estreptomicina (Invitrogen), e mantidos em cultura para isolamento das células-tronco. As células provenientes dos fragmentos foram tripsinizadas e plaqueadas em novas placas de cultivo. As culturas foram mantidas em semi-confluência até sua utilização ou seu congelamento, para evitar diferenciação. Para o congelamento, as células foram suspensas em meio de cultura contendo 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA). As células foram congeladas em freezer a - 80°C por 24h e armazenadas em nitrogênio líquido até o uso.

Figura 6 – Esquema da Metodologia Utilizada para o Isolamento das Células Tronco de Ligamento Periodontal Humano

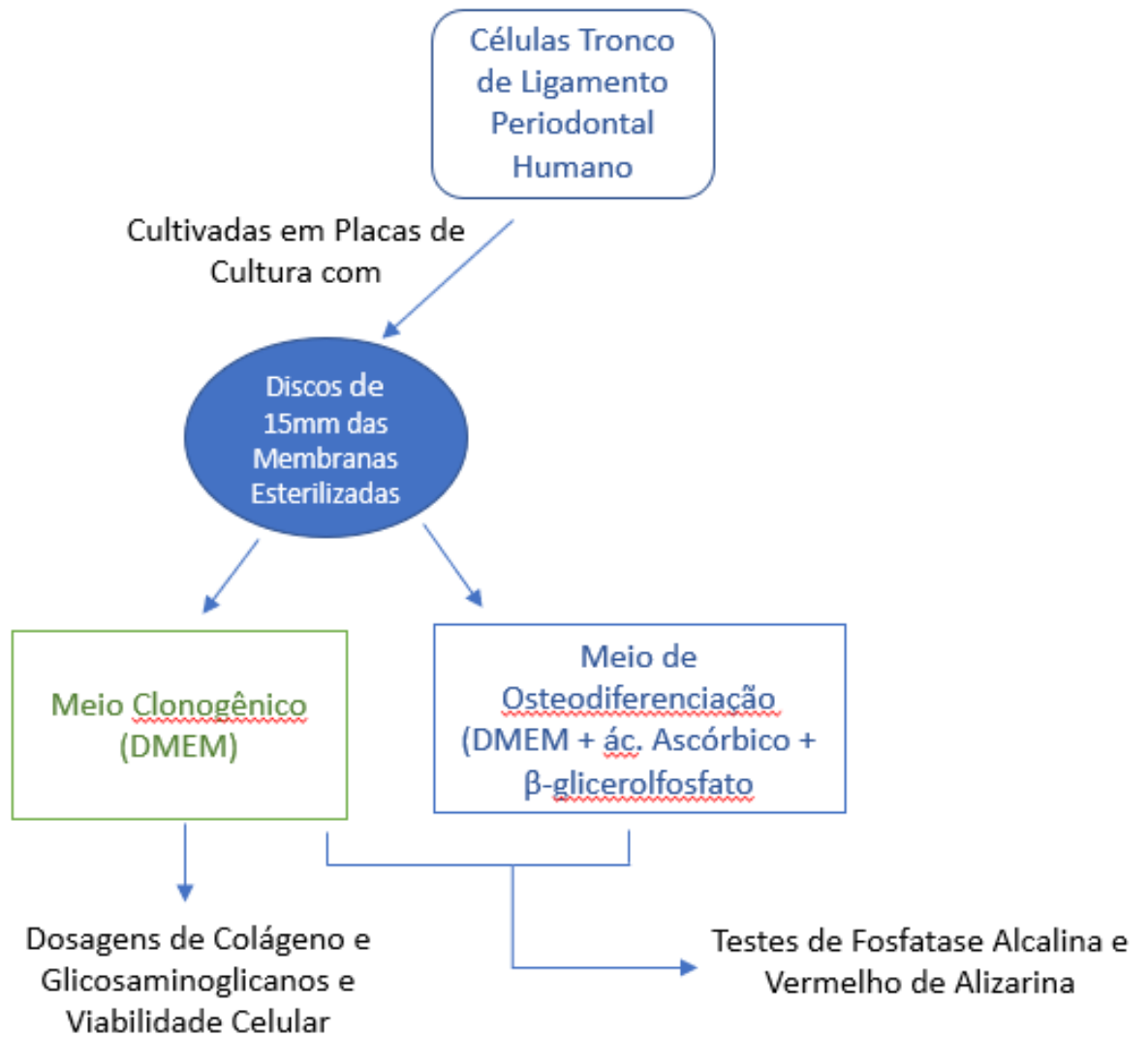


5.6 Cultura Celular

As membranas foram cortadas em círculos com 15 mm de diâmetro e esterilizadas em luz ultra-violeta irradiada por 15 minutos de cada lado do material. As células foram cultivadas sobre as matrizes com Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) também denominado meio clonogênico, ou meio de osteodiferenciação (ODM) na dependência do teste a ser realizado. O ODM consiste no DMEM acrescido de 50ug/mL de ácido ascórbico e 10mM β -glicerolfosfato. Ambos os meios, foram suplementados com 10% de soro bovino e 1% de penicilina/eritromicina (10000U mLmL⁻¹/10000 μ g mLmL⁻¹).

Os ensaios para mensurar diferenciação celular (vermelho de alizarina e análise da fosfatase alcalina) foram realizados nos dois tipos de meio de cultura, pois no meio de ODM, tanto o biomaterial como o meio são capazes de diferenciar as células-tronco, permitindo assim uma análise apenas da osteocondução do material. Já no meio clonogênico, toda a diferenciação celular que for observada, deve-se a ação do biomaterial, indicando assim o que tem maior potencial para osteoindução das hPDLSCs. Já as metodologias para a avaliação da formação da MEC (dosagem da síntese de colesterol e de glicosaminoglicanos) foram realizados apenas em meio clonogênico (Figura 7).

Figura 7 – Esquema da Metodologia Utilizada para o Isolamento das Células Tronco de Ligamento Periodontal Humano

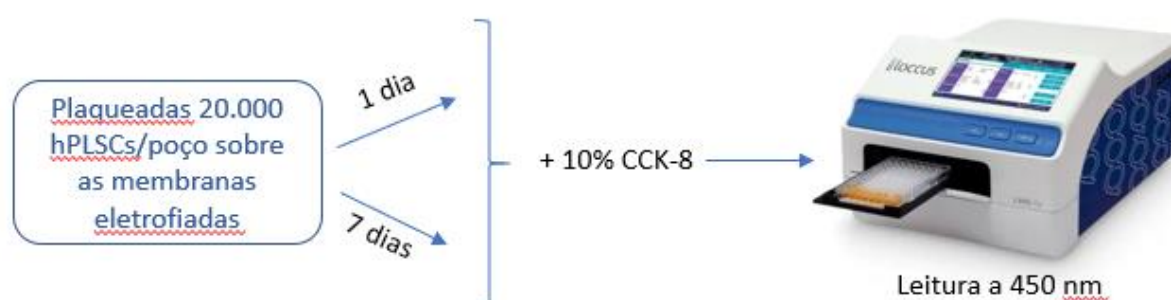


5.7 Análise da Viabilidade, Adesão e Proliferação Celular

A análise da viabilidade, adesão e proliferação celular foi realizada com o método CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Merk). O princípio da técnica envolve a utilização do sal tetrazólio hidrossolúvel WST-8, o qual é reduzido por enzimas desidrogenases presentes em mitocôndrias de células metabolicamente ativas, formando um produto formazano solúvel de coloração alaranjada, proporcional à atividade metabólica mitocondrial. O produto da reação é altamente solúvel em meio aquoso, permitindo a detecção direta da absorbância na faixa de 450 nm.

Para isso, foram plaqueadas, em placa de 24 poços, 20.000 células/poço sobre as diferentes membranas eletrofiadas (n=3 por grupo). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e após 1 e 7 dias a viabilidade celular das hPLSCs aderidas às membranas foi avaliada usando o Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma-Aldrich). Inicialmente, as membranas foram removidas suavemente dos poços em que foram cultivadas e levadas para uma nova placa, evitando que células não aderentes interfiram no ensaio. Solução de 10% CCK-8 em meio de cultura sem soro foi adicionada aos poços e incubação foi realizada durante 3 horas. O sobrenadante coletado teve a absorbância lida em 450 nm utilizando um leitor de microplacas (LMR-96, Loccus) (Figura 8).

Figura 8 – Esquema do Ensaio para Viabilidade, Adesão e Proliferação Celular.



5.8 Avaliação do Efeito das Membranas Eletrofiadas na Osteogênese em Culturas de Célula Tronco de Ligamento Periodontal Humano.

A avaliação da diferenciação osteogênica foi realizada por meio de dois métodos complementares: a dosagem da atividade enzimática da fosfatase alcalina, marcador precoce da diferenciação osteoblástica, e a análise da mineralização da matriz extracelular utilizando a coloração com vermelho de Alizarina, que indica a deposição de cálcio e mineralização em estágios mais avançados da osteogênese.

5.8.1 Análise da Fosfatase Alcalina

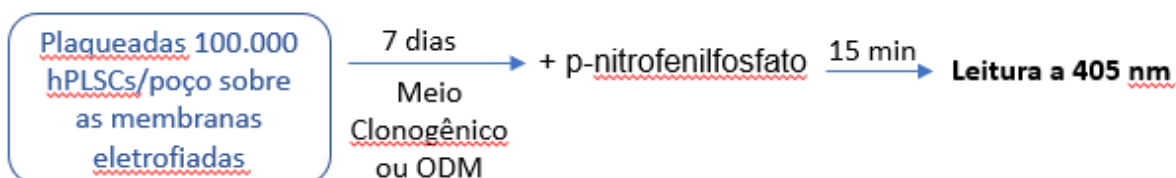
A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima hidrolase amplamente utilizada como marcador precoce da diferenciação osteoblástica. Essa enzima atua hidrolisando ésteres de fosfato em meio alcalino, liberando íons fosfato inorgânico (Pi), os quais participam da formação de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), principal componente mineral do osso. A quantificação da atividade da ALP *in vitro* é comumente realizada por meio de ensaios colorimétricos baseados na conversão de substratos cromogênicos, como o p-nitrofenilfosfato (pNPP). Nesse método, a ALP catalisa a hidrólise do pNPP, liberando p-nitrofenol (pNP), um composto de coloração amarela em pH alcalino. A concentração de pNP formado é diretamente proporcional à atividade enzimática presente na amostra e pode ser quantificada por espectrofotometria, com leitura da absorbância geralmente realizada a 405 nm.

Para o ensaio de fosfatas alcalina, 100.000 células/poço foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas sobre as membranas por 7 dias em ODM e em meio clonogênico (n=5 por grupo). Para o ensaio colorimétrico, foi preparada uma solução de 1mg/mL p- nitrofenol fosfato em tampão composto por 0,05M glicina e 2,2mM MgCl₂ em água, pH 10.5.

Os materiais com a células cultivadas foram lavados duas vezes com PBS e imersos em 0,3mL da solução de p-nitrofenil fosfato por 15 min. A reação foi inibida, transferindo a solução para um tubo com 0,3mL de NaOH e a absorbância foi

mensurada em 405 nm (Figura 9).

Figura 9 – Teste de Fosfatase Alcalina.



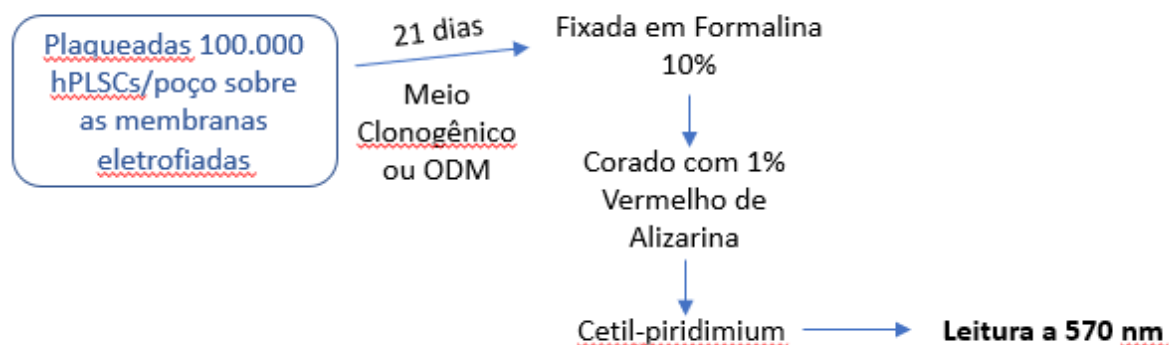
5.8.2 Ensaio de Vermelho de Alizarina

O corante vermelho de Alizarina S (Alizarin Red S, ARS) é amplamente utilizado como marcador histoquímico para a detecção qualitativa e quantitativa da mineralização da matriz extracelular durante o processo de osteogênese *in vitro*. A técnica baseia-se na capacidade do corante em se ligar especificamente a depósitos de cálcio presentes na matriz mineralizada, formando complexos insolúveis visíveis sob microscopia ótica e passíveis de extração por agentes como cetilpiridinium seguido de quantificação por leitura espectrofotométrica. A intensidade da absorvância correlaciona-se diretamente com o grau de mineralização da matriz extracelular, sendo um indicativo do estágio avançado da diferenciação osteoblástica.

Desta forma, em placa de 24 poços, foram plaqueadas sobre as membranas 100.000 células/poço (n= 5 por grupo) e as células foram cultivadas por 21 dias em ODM ou meio clonogênico. Após 21 dias, as membranas foram lavadas com PBS, fixadas em 10% formalina por 10 minutos e imersas em solução de 1% vermelho de alizarina e 2% etanol absoluto por 3 minutos. As membranas foram então lavadas abundantemente e desorvidas em solução 10% cloreto cetil-piridinium por 1 h. Para os materiais contendo hidroxiapatita, a absorvância em 570 nm foi mensurada tanto para material onde houve crescimento celular como em material mantido em cultivo, mas sem células, de forma a descontar o conteúdo inorgânico inicial presente na

membrana, permitindo uma análise quantitativa mais precisa dos dados (Figura 10).

Figura 10 – Esquema do Ensaio de Vermelho de Alizarina.



Ligamento Periodontal Humano.

A caracterização da matriz extracelular (MEC) produzida durante a diferenciação celular foi realizada por meio da quantificação do conteúdo total de colágeno e dos glicosaminoglicanos (GAGs), incluindo a análise de diferentes tipos de GAGs presentes na matriz. Estes componentes são essenciais para a integridade estrutural e funcional do tecido, desempenhando papel fundamental em processos regenerativos e de maturação tecidual.

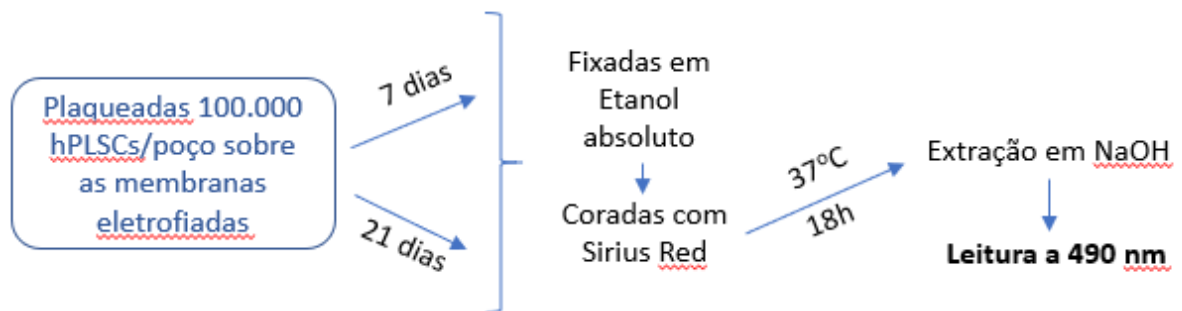
5.9.1 Quantificação de Colágeno na Matriz Extracelular

Para a determinação do colágeno total foi utilizado o método do corante Sirius Red, que se liga especificamente às fibras de colágeno. Em placa de 24 poços, foram plaqueadas sobre as malhas 100.000 células/poço e as células foram cultivadas por 7 ou 21 dias em meio clonogênico (n=5 por grupo). As membranas foram transferidas para tubos cônicos de 1,8 mL, fixadas em 500µl de etanol absoluto por 3 minutos e lavadas 3 vezes com 500µl de água destilada. Em seguida, foram coradas com a adição de 500µl de solução de Sirius Red (0,1% de Sirius Red em ácido acético 0,5M Sigma-Aldrich) incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a incubação, o excesso de corante foi removido por 3 lavagens sucessivas com 1mL de água destilada. Para extrair o corante ligado às membranas, foi adicionada a cada tubo 500µl uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M em metanol absoluto. A leitura da absorbância da

solução final foi feita em leitor de placas a 490nm em duplicata e a concentração de colágeno determinada em comparação a curva de padrão.

A curva padrão de colágeno foi realizada utilizando Colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Para isso, foi preparada solução de 100 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno em ácido acético e realizada a diluição seriada para a preparação das demais concentrações, sempre em duplicata, em tubos cônicos de 1,8mL. Os tubos foram centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e os pellets foram corados com 500 μl de solução de Sirius Red (0,1% de Sirius Red em ácido acético 0,5M) incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet lavado 3 vezes com 1 mL de água destilada. Para extrair o corante ligado, foi adicionada a cada tubo 500 μl uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M em metanol absoluto. A leitura da absorbância da solução final foi feita em leitor de placas a 490nM em triplicatas (Figura 11).

Figura 11 – Ensaio para Quantificação de Colágeno .

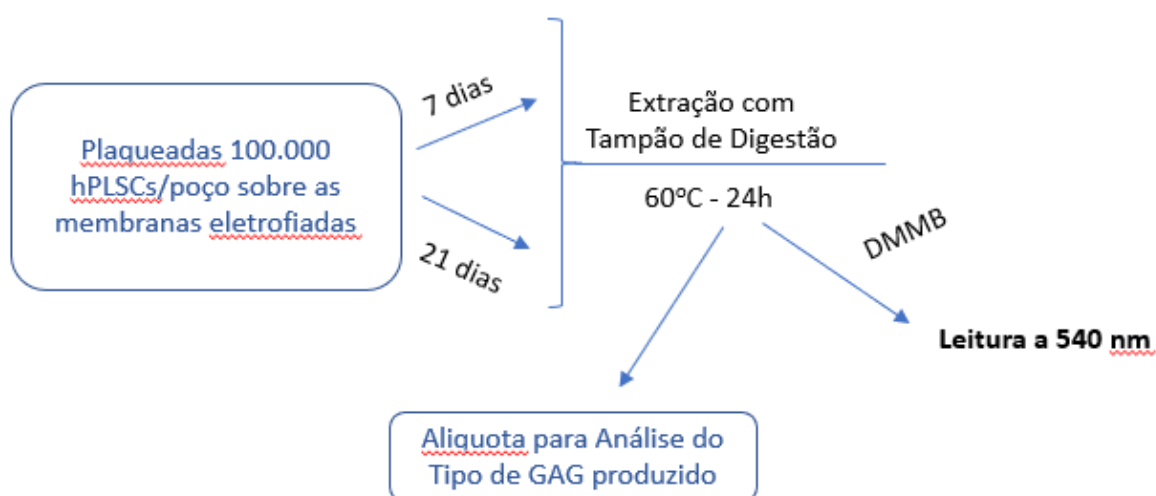


5.9.2 Quantificação de Glicosaminoglicanos na Matriz Extracelular

A quantificação dos GAGs totais foi realizada utilizando o método de dimetilmethylene blue (DMMB), que se baseia na interação do corante com os grupos sulfato dos GAGs, produzindo um complexo colorido cuja intensidade é proporcional à concentração dos polissacarídeos presentes na amostra.

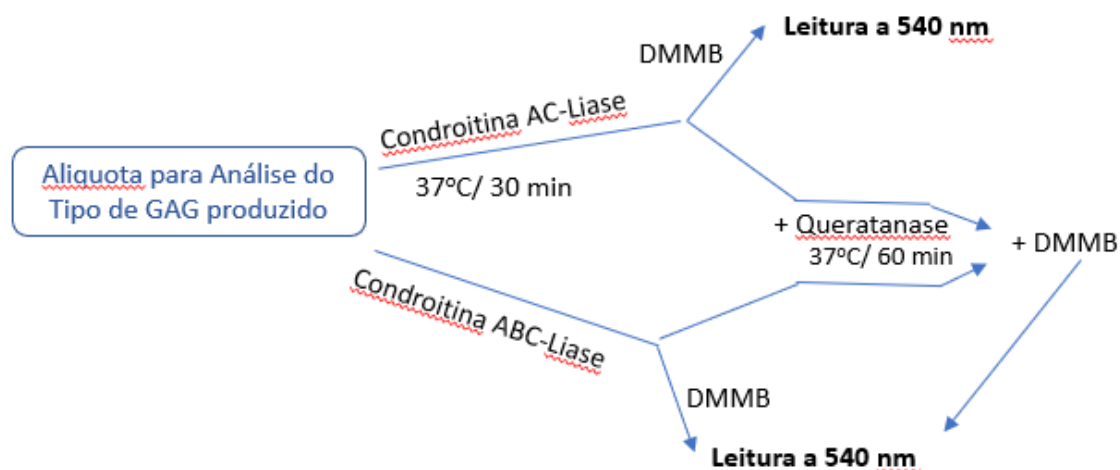
Em placa de 24 poços, foram plaqueadas sobre as malhas 100.000 células/poço e as células foram cultivadas por 7 ou 21 dias em meio clonogênico (n=5). As membranas foram transferidas para tubos cônicos de 1,8mL e os glicosaminoglicanos (GAGs) foram extraídos das membranas pela adição de 500µL de tampão de digestão com papaína (20 mM de tampão fosfato de sódio, 1 mM de EDTA, 2 mM de ditioneitol e 2,0 mg/mL de papaína) em cada tubo, seguida de incubação a 60°C por 24h. Uma alíquota de 100 µl de tampão com papaína contendo os GAG foi transferido para placa de elisa de 96 poços e adicionado 100 µl de solução de azul de 1,9-dimetil-metileno (DMMB), composta por 1 mL de água, 95 mL de HCl, 3,04 g glicina, 2,37 g NaCl e 16 mg DMMB (pH 8,0). O conteúdo total de GAGs foi quantificado por leitura da densidade óptica em leitor de placas a 540 nm em comparação a uma curva de calibração de condroitina (Sigma-Aldrich) (Figura 12).

Figura 12 – Ensaio para Quantificação de Glicosaminoglicanos.



O restante da solução contendo os GAG previamente digeridos com papaína foi aliquotada em 2 microtubos (200 µl por tubo). Ao primeiro tubo foi adicionada a enzima condroitina ABC liase (Sigma-Aldrich) para uma concentração final de 0.05 unidades/mL; ao segundo tubo foi adicionado condroitina AC liase (Sigma-Aldrich) na mesma concentração. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. Após esse período foi retirada uma amostra de 100 µl de cada tubo e avaliada a perda de reatividade com 100 µl DMMB por leitura de absorbância em placa de elisa a 540 nM. Foi adicionado então 0,1 unidade/mL de queratanase (Sigma-Aldrich) nas amostras restantes em cada um dos tubos e a digestão prosseguiu a 37°C por mais 60 minutos, com nova leitura da perda de reatividade após esse período. Os valores obtidos nas leituras de absorbância foram então interpolados em curva padrão de condroitina e a concentração de GAGs digeridos por cada enzima específica foi calculada pela diferença entre a concentração de GAGs iniciais menos a concentração após a digestão enzimática (Figura 13).

Figura 13 – Ensaio para Diferenciação dos Glicosaminoglicanos Sintetizados



A curva padrão de condroitina foi realizada utilizando o composto nas concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL. Para isso, foi preparada solução de 50 µg/mL de condroitina em tampão de digestão sem papaína e realizada a diluição seriada para a preparação das demais concentrações, sempre em duplicata, em tubos cônicos de 1,8mL. Após a adição de solução de azul de 1,9-dimetil-metileno (DMMB), previamente descrita, a absorbância foi mensurada em leitor de placas a 540 nm, em triplicata.

Análise Estatística

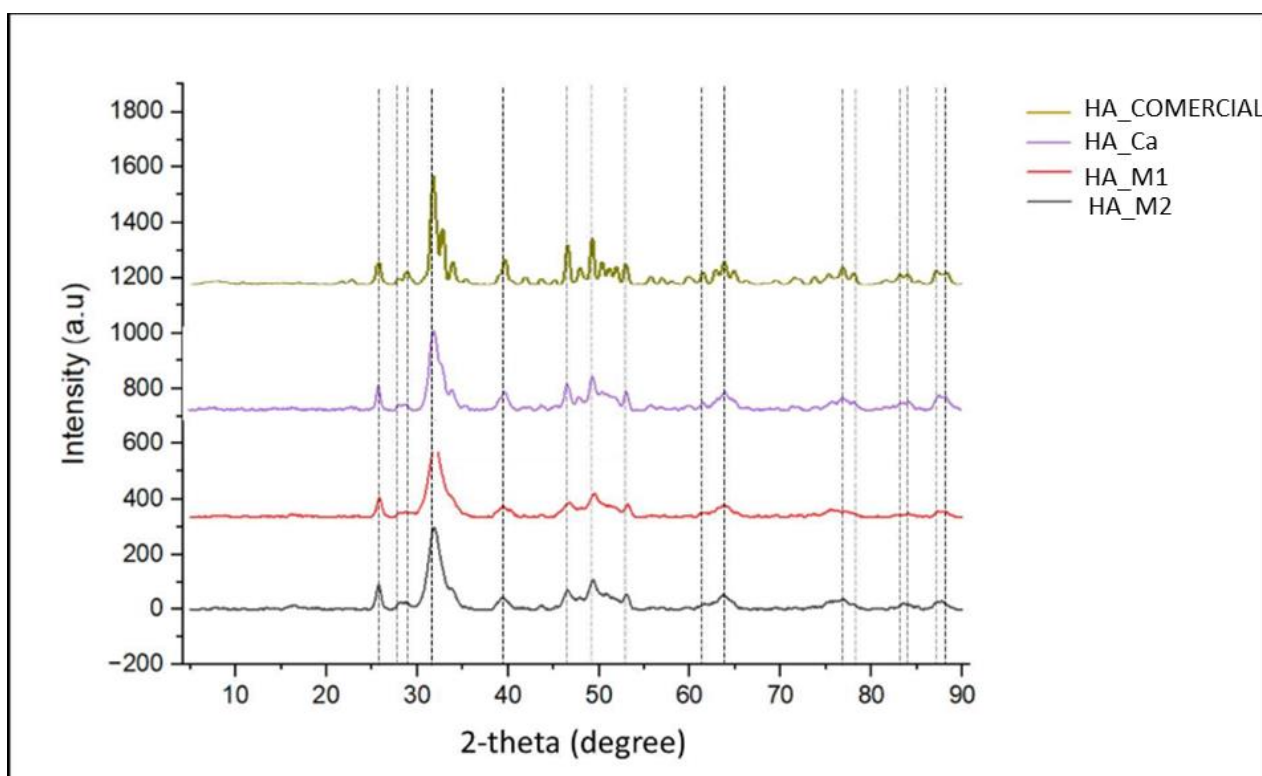
Respeitando-se os requisitos de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos a análise de variância de fator único e Teste de Tukey para cada um dos experimentos. O teste t-student foi realizado para comparação da liberação de magnésio e estrôncio pelas duas membranas em meio neutro e ácido; comparação da quantificação de colágeno e GAGs entre 7 e 21 dias para um mesmo material; e comparação da proliferação celular entre 7 e 21 dias para um mesmo material.

6.RESULTADOS

6.1 Síntese e Caracterização das Hidroxiapatitas

De acordo com a análise de DRX (Figura 14) todas as sínteses foram capazes de formar hidroxiapatita. Pequenos deslocamentos dos picos devem-se a substituição de íons cálcio por íons de estrôncio ou magnésio que causam alterações na grade cristalina do material.

Figura 14 - Análise de Difração de Raio X (DRX) das Hidroxiapatitas Sintetizadas em Comparação com a Hidroxiapatita Comercial.



HA: hidroxiapatita

HA_Comercial: hidroxiapatita sintética (Sigma)

HA_Ca: hidroxiapatita com 100% de cálcio

HA_M1: hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 7,5% MgNO_3 + 7,5% SrNO_3

HA_M2: hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 10% MgNO_3 + 10% SrNO_3

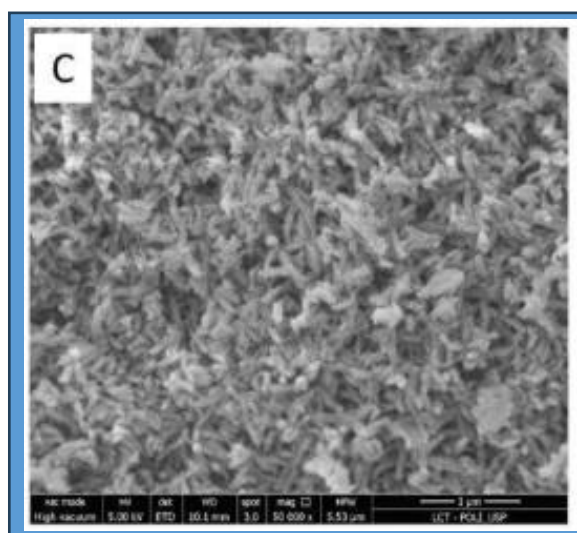
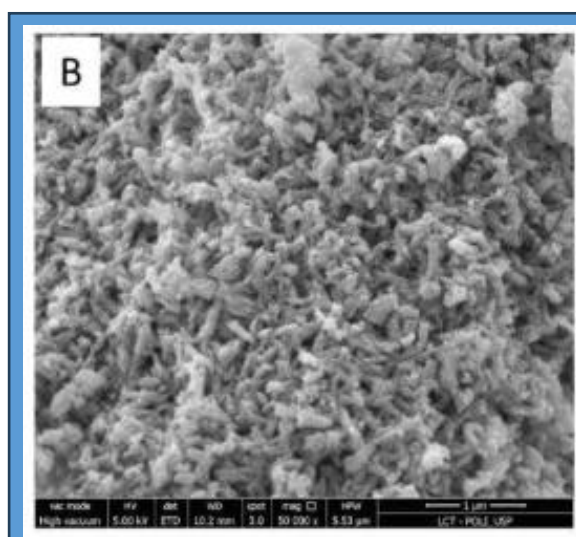
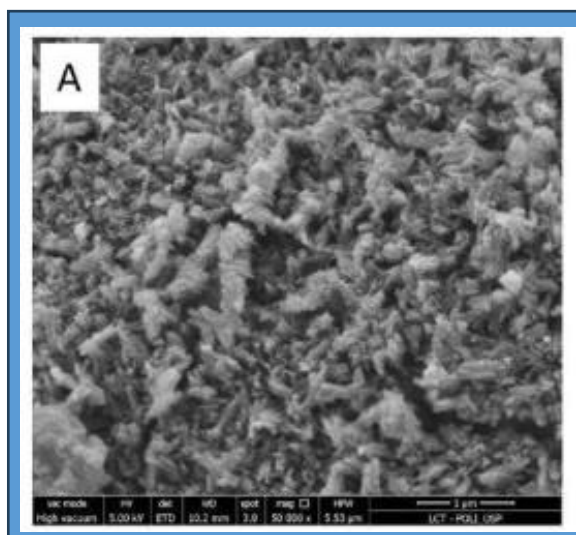
A quantidade real de íons incorporados durante a síntese foi analisada por ICP-OES (Tabela 3). A maior disponibilidade de íons magnésio durante a síntese não resultou em uma maior incorporação deste íons a grade da hidroxiapatita, sendo o máximo incorporado nas duas sínteses de 5% em peso. Já o aumento na disponibilidade de íons estrôncio durante a síntese resultou em um aumento de sua incorporação às moléculas de hidroxiapatita de 10 para 15 wt%.]

Q u a d r o 3- Concentrações de cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e estrôncio (Sr^{2+}) adicionadas e efetivamente incorporadas durante a síntese de hidroxiapatitas.

Material Original	Íons adicionados (mol%)			Íons incorporados (mol%)		
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Sr^{2+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Sr^{2+}
HA_Ca	100	0	0	100	0	0
HA_M1	85	7.5	7,5	80	5	15
HA_M2	85	10	5	85	5	10

As amostras de hidroxiapatita foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura e os cristais apresentam tamanho nanométrico, e formato de agulha, e se apresentam na forma de aglomerados (Figura 15).

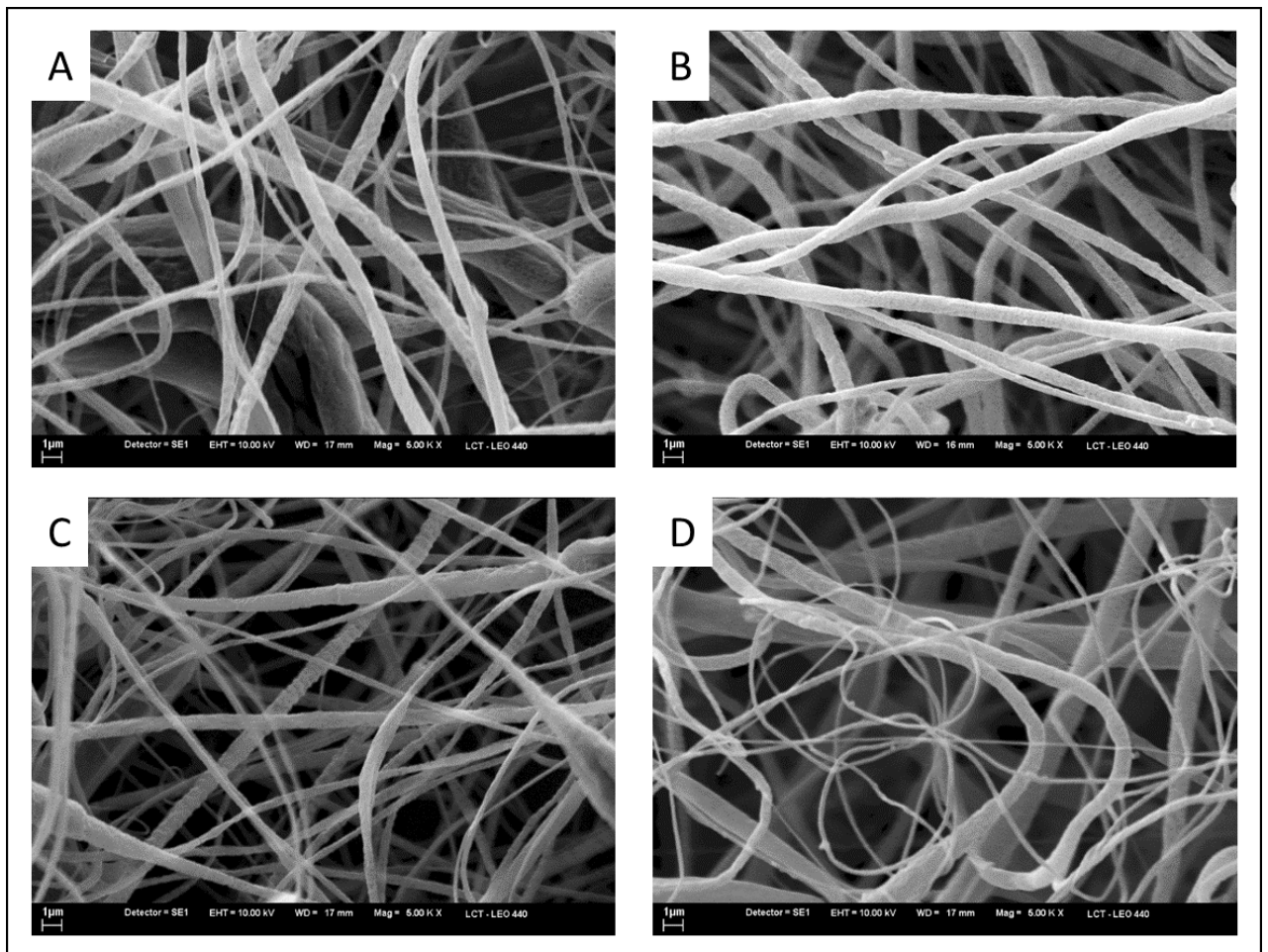
Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura com aumento de x50.000 dos materiais sintetizados. (A) Hidroxiapatita convencional (HA_Ca); (B) hidroxiapatita com 7.5% íons magnésio e 7.5% íons estrôncio adicionados (HA_M1); (C) hidroxiapatita com 10% íons magnésio e 5% íons estrôncio adicionados (HA_M2).



6.2 Caracterização das membranas eletrofiadas

As membranas eletrofiadas apresentaram fibras depositadas aleatoriamente formando uma matriz tridimensional porosa e sem gotas (Figura 16).

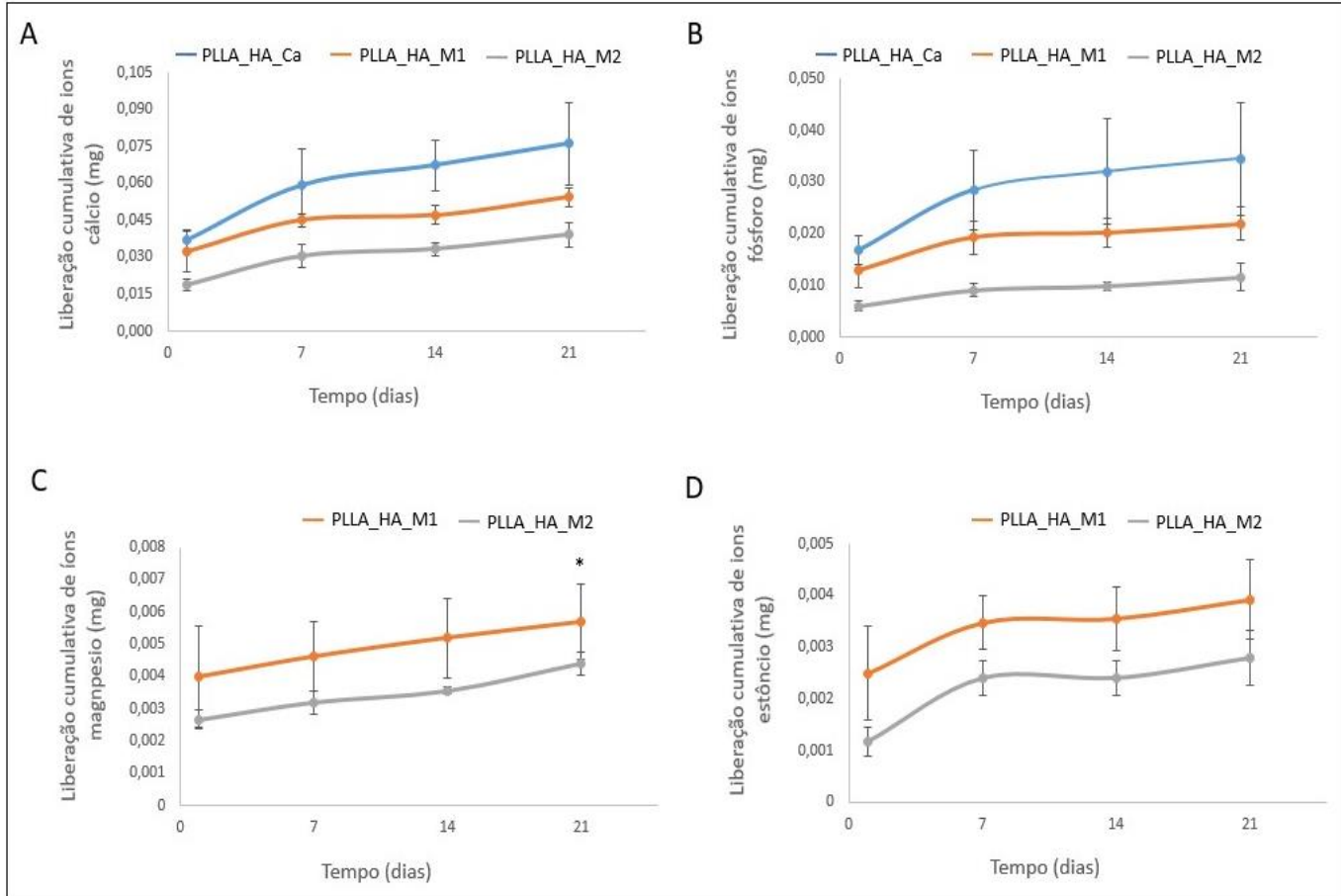
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura com aumento de x500 de membranas eletrofiadas de (A) PLLA; (B) PLLA_HA_Ca; (C) PLLA_HA_M1; D) PLLA_HA_M2.



6.3 Avaliação da Liberação iônica

O ensaio de ICP-OES mostrou que tanto em pH neutro (Figura 17) quanto em pH ácido (Figura 18), a quantidade de íons cálcio e fósforo liberado cumulativamente em 21 dias no grupo PLLA_HA_Ca foi maior do que nos grupos PLLA_HA_M1 e PLLA_HA_M2 em ambos pH. A quantidade de Mg^{2+} liberada em PLLA_HA_M1 (5% de Mg^{2+} e 15% de Sr^{2+}) foi maior do que em PLLA_HA_M2 (5% de Mg^{2+} e 10% de Sr^{2+}), em meio neutro, e similar em meio ácido, enquanto a quantidade de estrôncio liberada foi semelhante em ambos materiais e pH.

Figura 17: Média e desvio-padrão da liberação cumulativa iônica para (A) íons cálcio; (B) íons fósforo; (C) íons magnésio; e (D) íons estrôncio em pH 7,0 ($p < 0,05$).

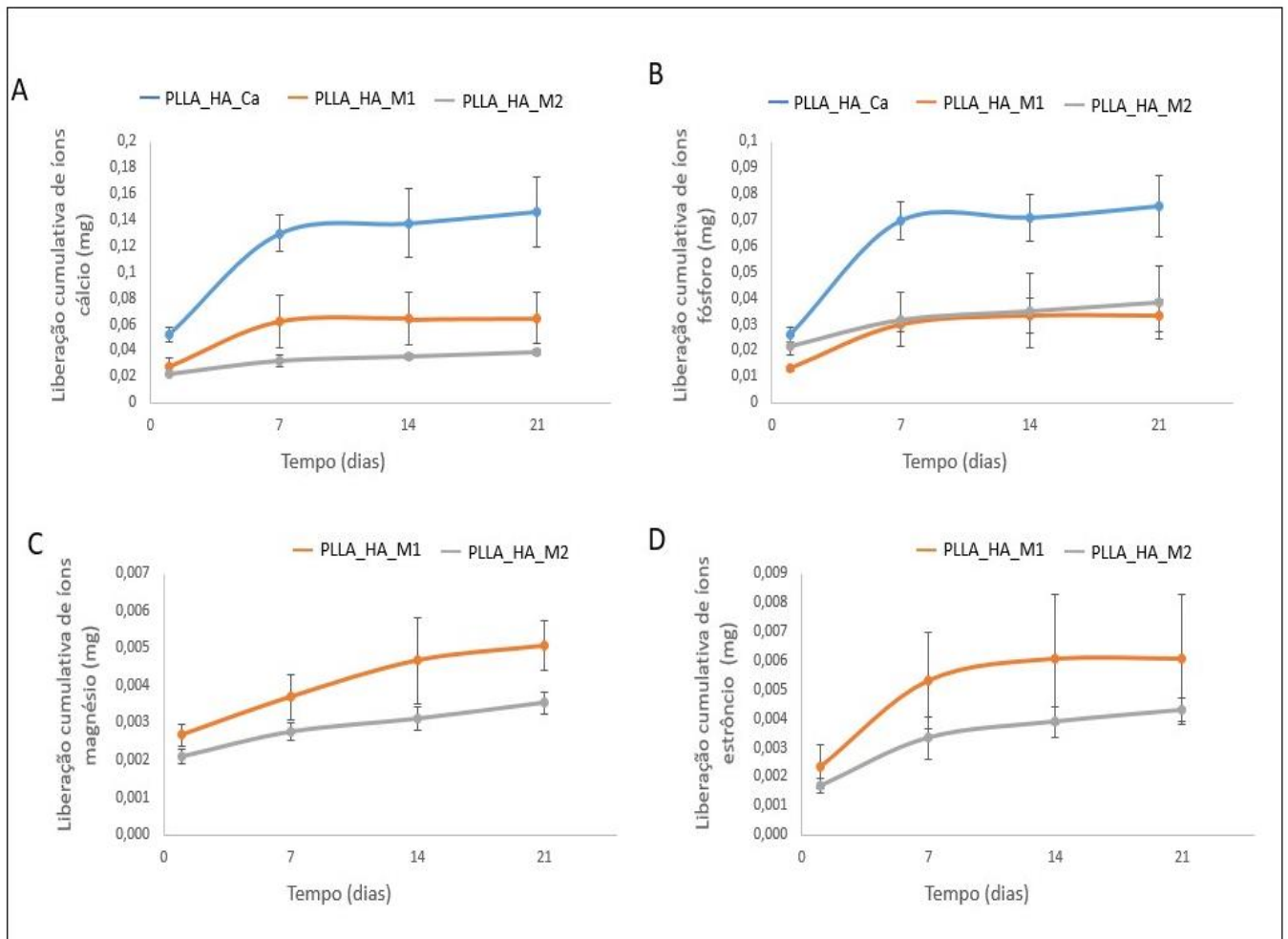


PLLA_HA_Ca: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 100% de cálcio

PLLA_HA_M1: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 7,5% MgNO_3 + 7,5% SrNO_3

PLLA_HA_M2: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 10% MgNO_3 + 10% SrNO_3

Figura 18: Média e desvio-padrão da liberação cumulativa iônica para (A) íons cálcio; (B) íons fósforo; (C) íons magnésio; e (D) íons estrôncio em pH 5,5.



PLLA_HA_Ca: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 100% de cálcio

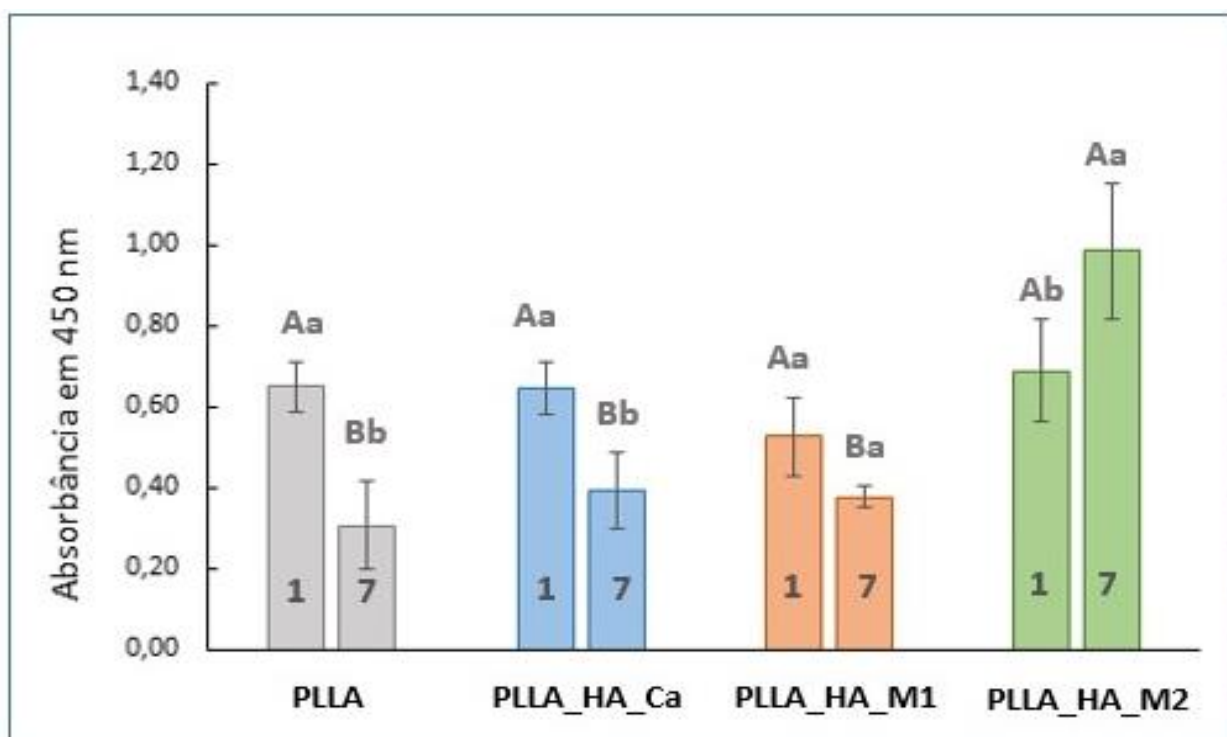
PLLA_HA_M1: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 7,5% MgNO_3 + 7,5% SrNO_3

PLLA_HA_M2: PLLA + 10% de hidroxiapatita com 85% de CaNO_3 + 10% MgNO_3 + 10% SrNO_3

6.4 Ensaio de adesão e proliferação celular

O ensaio CCK-8 em um dia de cultivo das hPDLSC sobre as malhas, indica semelhança estatística das membranas quanto a adesão celular. Porém em 7 dias de cultivo, a membrana de PLLA_HA_M2 apresentou maior proliferação celular. Em todos os materiais observou-se uma redução na viabilidade celular de 1 para 7 dias, exceto em PLLA_HA_M2 em que houve um aumento na proliferação celular (Figura 19).

Figura 19: Média e desvio-padrão da absorbância em 450 nm do ensaio de proliferação celular CCK-8 em 1 e 7 dias de cultivo. Letras maiúsculas indicam comparações entre os materiais em um mesmo dia, e letras minúsculas indicam comparações de um mesmo material em função do tempo ($p < 0,05$).



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

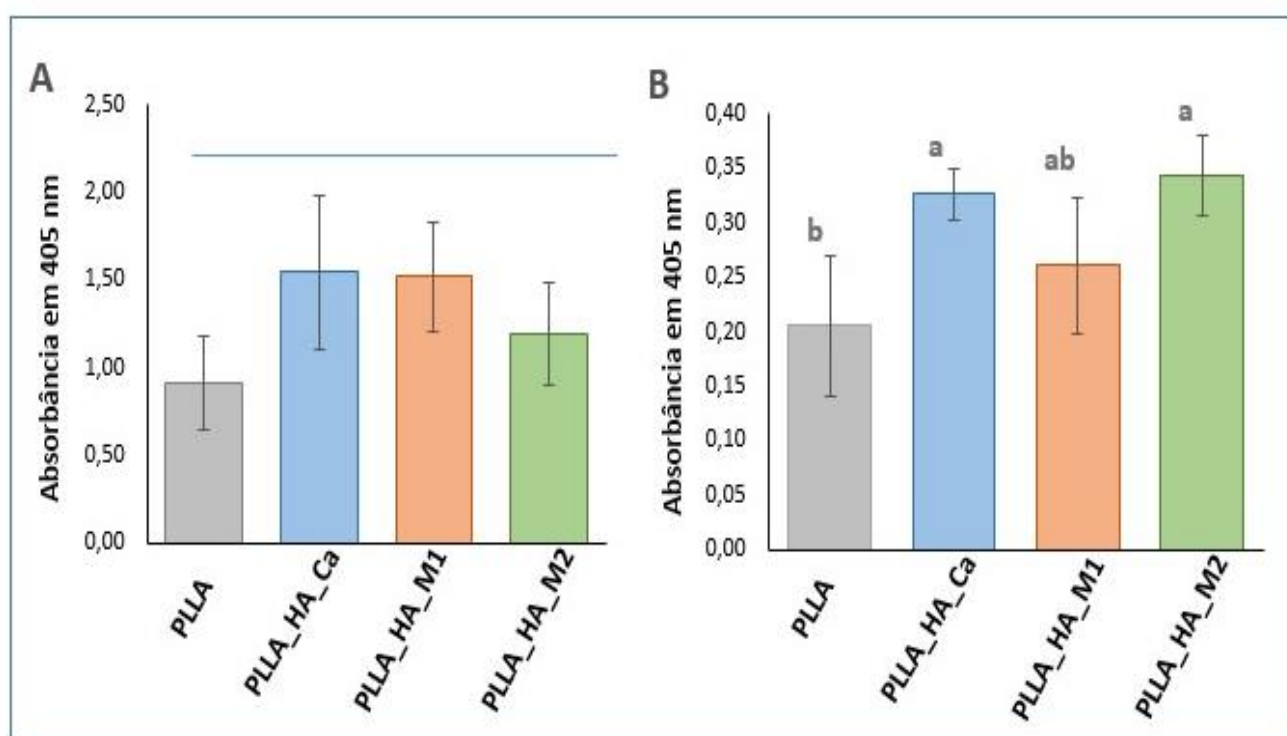
PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

6.5 Ensaio de fosfatase alcalina

Quando as hPDLSC foram cultivadas sobre as membranas em meio de diferenciação osteogênica, a atividade de fosfatase alcalina apresentada pelos materiais em 7 dias de cultivo foram estatisticamente semelhantes entre si, porém quando cultivadas em meio clonogênico, apresentaram maior atividade nos materiais contendo hidroxiapatita pura (PLLA_HA_Ca) e nas membranas de PLLA_HA_M2 em relação ao controle PLLA (Figura 20).

Figura 20: Média e desvio-padrão da absorbância (405nm) relativa a atividade de fosfatase alcalina em células-tronco do ligamento periodontal cultivadas sobre as diferentes membranas em (A) meio de diferenciação osteogênica; e (B) meio clonogênico ($p < 0,05$).



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

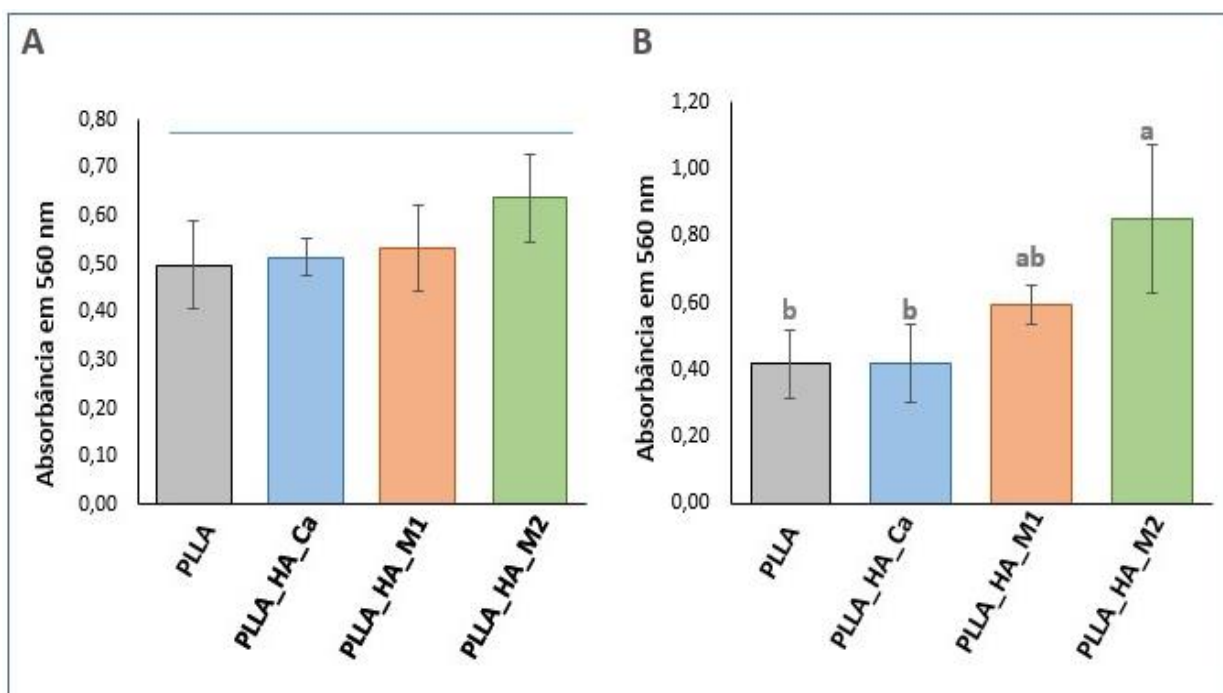
PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

6.6 Ensaio de Vermelho de Alizarina

A análise da mineralização extracelular através do ensaio de vermelho de alizarina, indica que quando cultivadas sobre as membranas, em meio osteogênico, as hPDLSC não apresentaram diferenças estatísticas devido ao material. Entretanto, quando cultivadas em meio clonogênico, o material contendo PLLA_HA_M2 apresentou maior mineralização da matriz extracelular em relação ao controle PLLA e ao material contendo hidroxiapatita sem modificação iônica PLLA_HA_Ca (Figura 21), indicando uma maior osteodiferenciação.

Figura 21: Média e desvio-padrão da absorbância (560 nm) relativa ao ensaio de vermelho de alizarina de células-tronco do ligamento periodontal cultivadas sobre as diferentes membranas em (A) meio de diferenciação osteogênica; e (B) meio clonogênico.



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

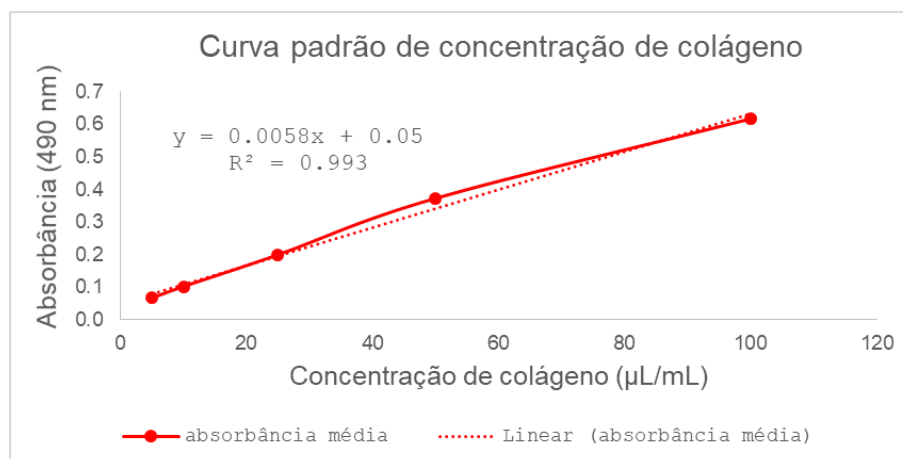
PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

6.7 Quantificação de colágeno da matriz extracelular

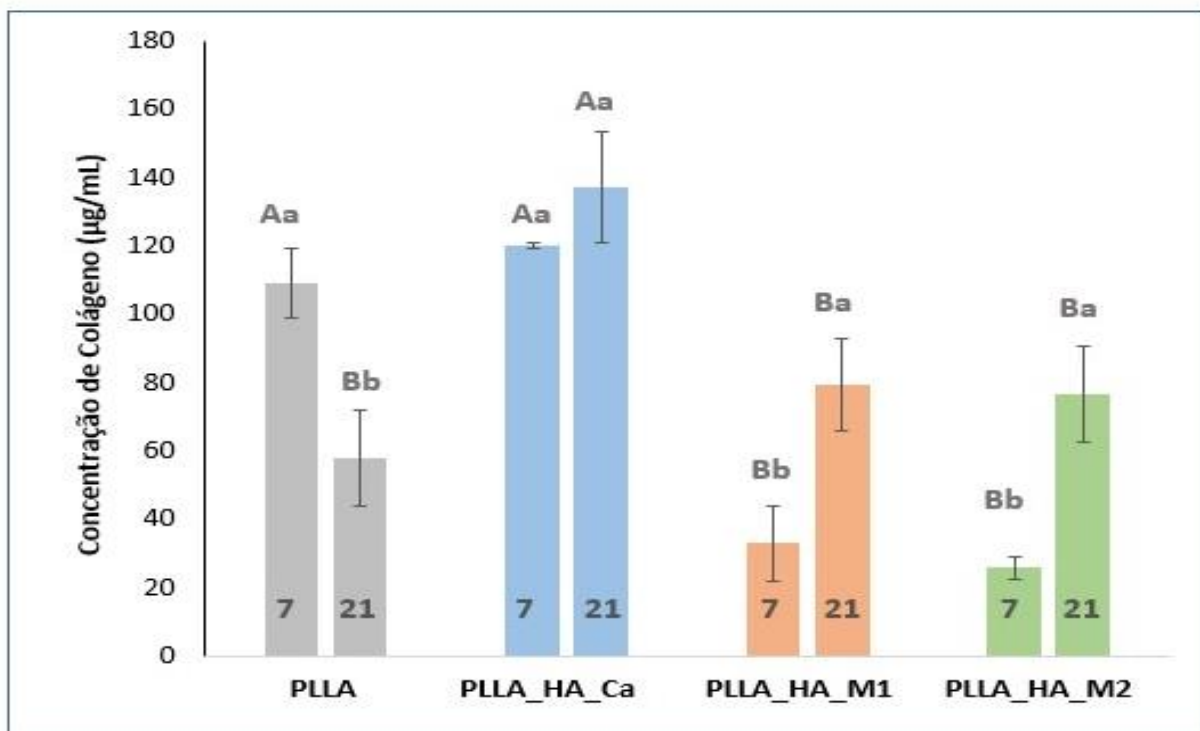
Para a determinação da produção de colágeno nos diferentes grupos, foi usada a curva padrão de colágeno (Figura 22).

Figura 22: Curva padrão de colágeno com leitura da absorbância em 490 nM.



A análise da produção de colágeno em diferentes tempos em cada grupo experimental mostrou redução da produção de colágeno aos 21 dias de cultura no grupo PLLA e aumento significativo da produção deste composto nos grupos PLLA_HA_M1 e PLLA_HA_M2. Não houve diferença significativa da produção de colágeno nos diferentes tempos de cultura no grupo PLLA_HA_Ca. Na comparação entre os diferentes materiais, no mesmo tempo de cultura, a produção de colágeno foi significativamente menor nos grupos PLLA_HA_M1 e PLLA_HA_M2 quando comparado aos grupos PLLA e PLLA_HA_Ca após 7 dias de cultura. Após 21 dias, houve apenas o aumento significativo de colágeno no grupo PLLA_HA_Ca, sem alterações significativas nos demais grupos em comparação ao PLLA. (Figura 23).

Figura 23: Média e Desvio-padrão da concentração de colágeno nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias. Letras maiúsculas comparam diferentes materiais no mesmo tempo de cultura e letras minúsculas comparam o mesmo material em tempos diferentes ($p < 0.05$)



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

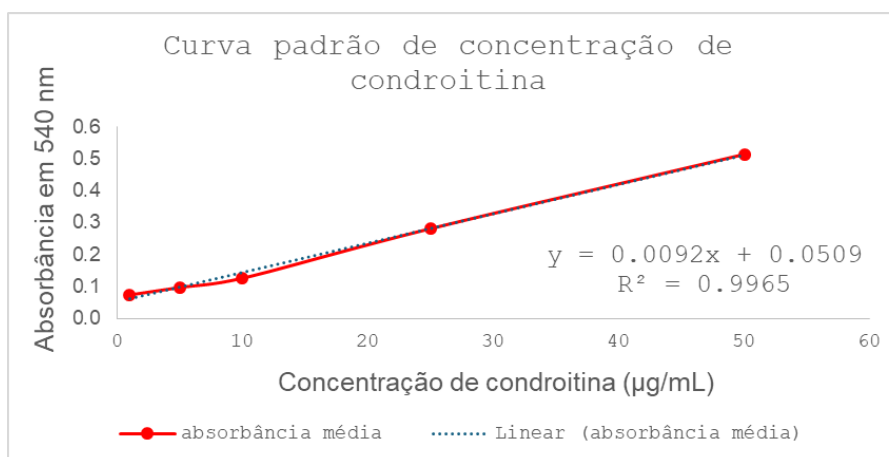
PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

5.8 Quantificação de glicoesaminoglicanos da matriz extracelular

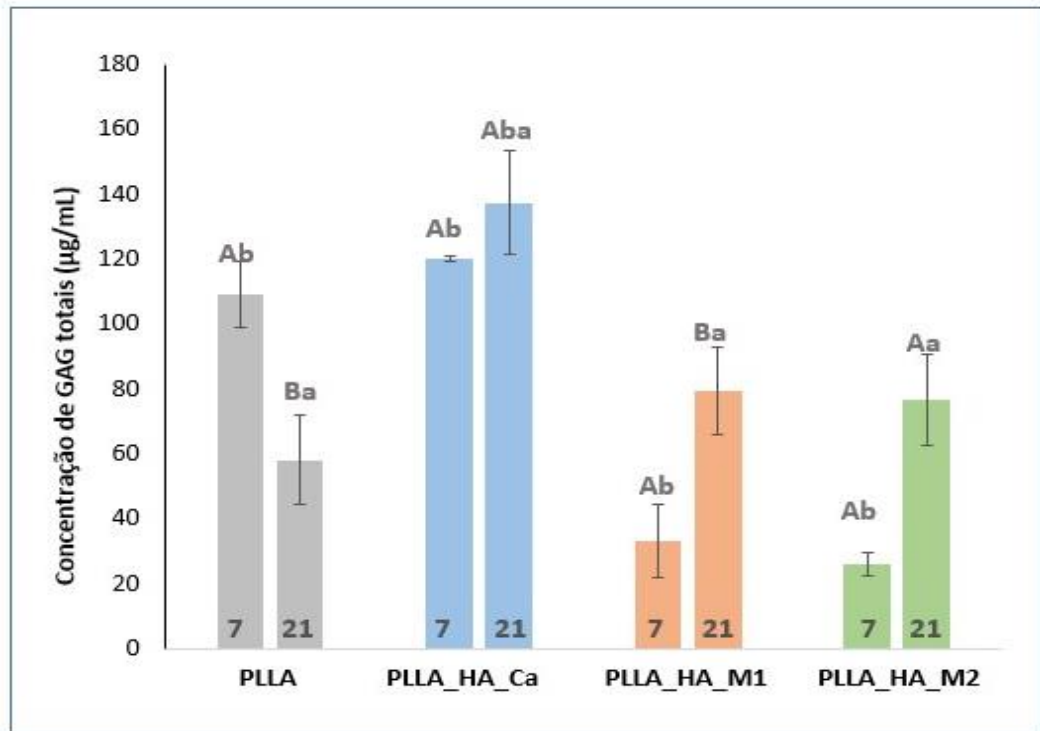
Para a determinação da produção de glicosaminoglicanos nos diferentes grupos, foi usada a curva padrão de condroitina (Figura 24) .

Figura 24: Curva padrão de condroitina com leitura da absorbância em 540nm.



Não houve diferenças significativas na produção total de glicosaminoglicanos entre os grupos estudados em 7 dias de cultura. Entretanto, em 21 dias, o grupo PLLA_HA_M2 apresentou maior expressão que o grupo controle PLLA e o grupo PLLA_HA_M1. Quando um mesmo material foi comparado em função do tempo, todos apresentaram maior expressão de GAGs em 21 dias (Figura 25).

Figura 25: Média e Desvio-padrão da concentração de GAG totais nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias. Letras maiúsculas comparam diferentes materiais no mesmo tempo de cultura e letras minúsculas comparam o mesmo material em tempos diferentes.



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

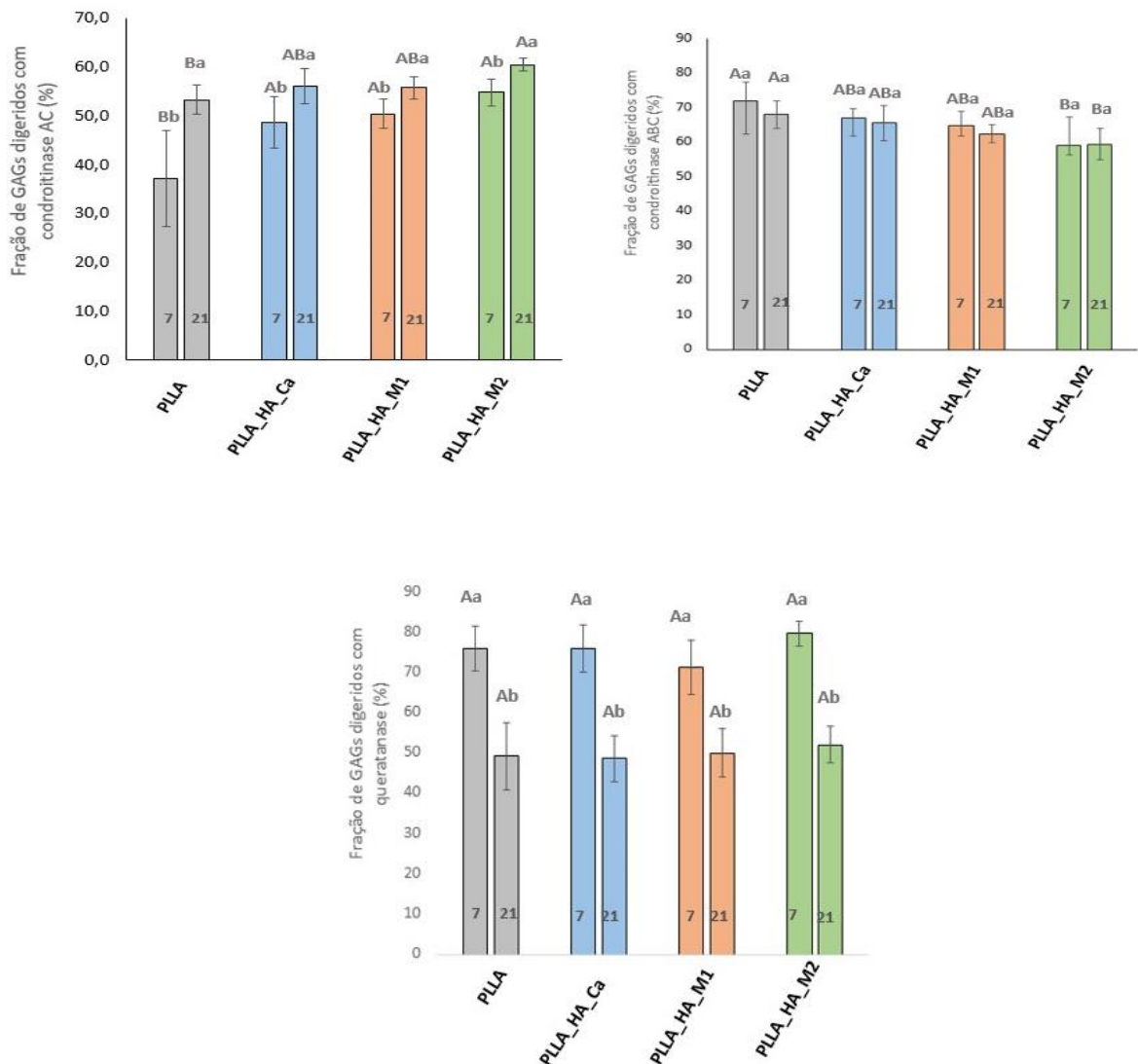
PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

A digestão enzimática dos glicosaminoglicanos (GAGs), previamente extraídos das membranas e mantidos em solução, permitiu avaliar a fração desses componentes susceptível à ação de diferentes enzimas. Considerando a digestão pela enzima condroitinase AC, o grupo PLLA apresentou a menor fração de GAGs digeríveis (~35%) nas amostras de 7 dias de cultura, quando comparado aos demais grupos contendo HA. Após 21 dias, observou-se um aumento significativo na digestibilidade dos GAGs em todos os grupos, com destaque para os compósitos PLLA_HA_M2, que atingiram valores superiores a 60%, sendo estatisticamente diferentes do PLLA (Figura 26A). Após a digestão pela enzima condroitinase ABC, o material controle PLLA apresentou maior fração digerida em relação ao grupo PLLA_HA_M2, tanto aos 7 quanto aos 21 dias de cultura (Figura 26B). Por fim, a digestão por enzima queratanase apresentou-se similar entre todos os materiais em 7 ou 21 dias de cultivo, e a proporção digerida por queratanase foi menor em 21 dias para todos materiais avaliados (Figura 26C).

Figura 26: Média e Desvio-padrão da fração de (A) glicosaminoglicanos digeridos com enzima condroitinase AC; (B) glicosaminoglicanos digeridos com enzima condroitinase ABC; (C) glicosaminoglicanos digeridos com enzima queratanase; nas culturas de hPDLSC nos diferentes grupos experimentais por 7 e 21 dias após incubação. Letras maiúsculas comparam diferentes materiais no mesmo tempo de cultura e letras minúsculas comparam o mesmo material em tempos diferentes ($p < 0.05$).



PLLA: polímero de PLLA eletrofiado

PLLA_HA_Ca: PLLA eletrofiado carregado com hidroxiapatita sintetizada

PLLA_HA_M1: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

PLLA_HA_M2: PLLA eletrofiado carregado com 5% Mg e 15% de Sr

7. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a síntese de membranas bioativas, obtidas pela associação de PLLA a hidroxiapatitas dopadas com magnésio (5 wt%) e estrôncio (10 wt%), propiciou não só o aumento da osteoindução de hPDLSC como também maior proliferação celular em comparação ao controle PLLA e ao PLLA associado à hidroxiapatita convencional, menor produção de colágeno e diferença no perfil de GAGs apresentados na matriz extracelular. Esses achados confirmam o potencial da modificação iônica como estratégia para incrementar a bioatividade de matrizes de suporte celular poliméricas, rejeitando a hipótese nula do estudo de ausência de diferença entre os materiais. Resultados semelhantes têm sido reportados em trabalhos que demonstram que a dopagem de hidroxiapatitas com íons bioativos pode modular de forma significativa a resposta celular e a formação de matriz extracelular.^{12,67}

A composição das hidroxiapatitas sintetizadas foi confirmada por DRX, e os difratogramas obtidos mostraram-se consistentes com a literatura. Pequenas variações nos planos do difratograma podem ser atribuídas à substituição iônica, responsável por alterações na rede cristalina e, em especial, pela redução da cristalinidade, efeito já descrito para o magnésio devido ao seu caráter inibitório na nucleação da hidroxiapatita.^{11,68} Apesar do aumento da disponibilidade de magnésio na solução de síntese, sua incorporação limitou-se a 5 wt%, o que é explicado pela diferença de raio iônico entre Mg^{2+} (0,69 Å) e Ca^{2+} (0,99 Å), tornando sua substituição estérica limitada.¹⁴ Por outro lado, o estrôncio apresentou maior incorporação, com até 15 wt%, resultado consistente com seu maior raio atômico, e a literatura que demonstra sua capacidade de substituir o cálcio quase totalmente sem comprometer a estrutura cristalina da hidroxiapatita.^{15,30} Essas características tornam o Sr^{2+} particularmente interessante para engenharia tecidual, dada sua boa compatibilidade cristalográfica.

A eletrofiação das membranas contendo PLLA e 10% das diferentes hidroxiapatitas resultou em fibras com deposição aleatória, matriz tridimensional e ausência de defeitos de superfície, confirmando a viabilidade da técnica e a manutenção da morfologia típica de matrizes de suporte celular eletrofiadas. Estudos recentes corroboram que a adição de nanopartículas de hidroxiapatita, mesmo

dopadas, não prejudica significativamente a formação das fibras poliméricas, mas altera de forma relevante as propriedades biológicas do material.^{2,10} O fato de as malhas apresentarem morfologias semelhantes sugere que as diferenças observadas nos ensaios biológicos derivam principalmente da composição química e não da estrutura física, reforçando a relevância da modificação iônica.

A análise de liberação iônica revelou que a substituição por magnésio e estrôncio reduziu a quantidade de cálcio e fósforo liberados, em comparação à hidroxiapatita convencional. Isso pode estar relacionado à maior estabilidade química e cristalográfica conferida pela substituição iônica, fenômeno descrito em diversos estudos.^{32,69} Apesar de a incorporação efetiva de Mg^{2+} ter sido semelhante entre os grupos, a liberação variou de acordo com a composição, sugerindo que a posição cristalográfica ocupada pelos íons pode influenciar sua solubilidade. Interessantemente, a liberação de Sr^{2+} foi consistente entre os grupos, o que sugere um perfil de dissolução controlado, potencialmente benéfico para manter estímulos osteogênicos em longo prazo.¹⁶ Essa diferença de comportamento entre os íons destaca a importância do balanceamento entre concentração incorporada e taxa de liberação, uma vez que tanto a deficiência quanto o excesso podem comprometer a resposta celular.

Nos ensaios de adesão celular (1 dia de cultivo), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, possivelmente devido à baixa concentração de HA incorporada (10%) e ao fato de parte das nanopartículas encontrarem-se no interior das fibras. Além disso, como demonstrado em estudos prévios, a adesão celular é mais influenciada pela molhabilidade e pela adsorção de proteínas séricas que recobrem a superfície do material do que pela presença direta dos íons.^{4,70} Essa hipótese é consistente com nossos achados e com dados recentes de matrizes de suporte celular poliméricos híbridos.³⁵

Entretanto, após 7 dias de cultivo, a membrana PLLA_HA_M2 apresentou maior proliferação celular. A literatura sugere que o efeito proliferativo do Sr^{2+} segue uma curva dose-dependente, com efeito positivo até um limite (~0,1 mM), a partir do qual a proliferação pode ser reduzida.^{33,34} Nesse contexto, a maior concentração de Sr^{2+} incorporada no material PLLA_HA_M1, e não a quantidade de estrôncio liberada, visto esta ter sido semelhante entre os dois materiais, pode ter ultrapassado o limiar

ideal, prejudicando a proliferação, enquanto a formulação PLLA_HA_M2, com menor teor de Sr^{2+} , manteve-se dentro da faixa benéfica. Assim, os resultados reforçam a ideia de que a dopagem com Sr^{2+} deve ser cuidadosamente controlada para não comprometer o equilíbrio celular. Além disso, a menor liberação de Mg^{2+} em pH neutro do grupo PLLA_HA_M2 pode ter contribuído para maior estabilidade da matriz extracelular e estímulo proliferativo adicional, já que concentrações excessivas de Mg^{2+} podem afetar negativamente a mineralização.⁶⁷

No que diz respeito à osteoindução, os ensaios de fosfatase alcalina (7 dias) mostraram resultados semelhantes entre os grupos em meio osteogênico, indicando que os estímulos químicos do meio suplementado se sobrepuseram aos efeitos das membranas. Porém, em meio clonogênico, a presença de HA (PLLA_HA_Ca) convencional e PLLA_HA_M2 resultou em maior atividade enzimática que o PLLA puro, reforçando o papel da hidroxiapatita como indutora inicial de diferenciação osteoblástica.^{9,10} Esse efeito foi ainda mais evidente no ensaio de mineralização (vermelho de alizarina, 21 dias), em que o grupo PLLA_HA_M2 apresentou maior deposição de matriz mineralizada em meio clonogênico, confirmando a relevância da modificação iônica na fase tardia da diferenciação osteogênica. Estudos recentes têm demonstrado que a combinação de Mg^{2+} e Sr^{2+} na hidroxiapatita pode sinergicamente estimular osteoblastos e inibir osteoclastos, favorecendo a remodelação óssea.^{71,72}

A matriz extracelular óssea é composta por 50 a 70% hidroxiapatita e 20 a 40% matriz orgânica. O constituinte principal da matriz orgânica é o colágeno, e ela é complementada por proteoglicanos e glicosaminoglicanos.⁷³ Neste estudo, quantificação de colágeno mostrou um aumento significativo nos grupos PLLA_HA_M1 e PLLA_HA_M2 entre os dias 7 e 21 dias, enquanto o PLLA puro apresentou redução da quantidade de colágeno no mesmo período de tempo. Estudo quantificando o colágeno presente na matriz extracelular de culturas de MSC observou que culturas jovens apresentam maiores níveis de colágeno incorporados na matriz extracelular, ao passo que o aumento da expansão celular leva a redução na quantidade de colágeno incorporado.⁷⁴ De fato, tal achado vai de acordo ao presente estudo, em que a proliferação celular no material PLLA foi maior em 7 dias e este material também apresentou menor concentração de colágeno em 21 dias.

Já estudos de cultura de osteoblastos mostraram que a quantidade de colágeno expresso tem um pico em 7 dias, porém o colágeno incorporado na matriz extracelular aumenta com a maturação da diferenciação óssea, sendo maior na fase de mineralização da matriz (16 a 21 dias) e menor na fase proliferativa (4 a 10 dias) e na fase de formação da matriz óssea (11 a 15 dias).^{75,76} Tal perfil de aumento na incorporação do colágeno dos 7 para 21 dias, coincidem com os dos materiais PLLA_HA_M1 e PLLA_HA_M2, sugerindo uma maior diferenciação osteogênica das MSC nestes materiais, como comprovado pelo ensaio de vermelho de alizarina. Esse achado também é consistente com estudos que demonstram que Sr^{2+} e Mg^{2+} podem modular a expressão de colágeno tipo I e proteínas de matriz como osteocalcina e osteopontina.^{77,78}

Os glicosaminoglicanos, componentes importantes da MEC, apresentam diversas funções, contribuem para propriedades mecânicas do tecido ósseo, auxiliam no aumento da tenacidade da matriz extra fibrilar, mediam a interação com citocinas, fatores de crescimento e diversas proteínas em geral, e influenciam a vias de sinalização celular.^{73,79}

Estudo que quantificou a formação de GAGs sulfatados na MEC de hidrogéis de alginato enriquecidos com cálcio ou estrôncio, observou que, apesar da semelhança entre os materiais na produção de GAGs sulfatados em 7 dias, em 28 dias, houve maior produção de GAGs sulfatados na matriz extracelular dos materiais com íons estrôncio tanto em culturas de condrócitos como de células do disco intervertebral.⁸⁰ Tais resultados vão de acordo com o presente trabalho onde o biomaterial PLLA_HA_M2, foi o único que apresentou concentração de GAGs superior em 21 dias ao grupo controle. Entretanto, o outro material com estrôncio incorporado em maior concentração (PLLA_HA_M1), não apresentou tal efeito, indicando que o efeito é limitado a uma dada concentração iônica.

O uso das enzimas de restrição permite identificar quais os principais tipos de glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular de hPDLSC cultivadas sobre os diferentes materiais. A digestão por condroitinase AC degrada principalmente sulfatos de condroitina A e C, enquanto a digestão por condroitinase ABC além dos sulfatos de condroitinases A e C, degrada o também o dermatam sulfato. Portanto, a diferença da fração digerida entre condroitinase ABC e condroitinase AC deve-se a presença de

dermatan sulfato. Estudos que avaliaram a distribuição de sulfatos de condroitina e dermatan sulfato na formação óssea, identificaram que os GAGs ligados a fase mineral contém principalmente condroitina 4-sulfato, condroitina 6-sulfato e estão associadas a fase de mineralização da matriz extracelular, enquanto os GAGS associados à matriz colágena mostraram uma predominância de dermatan sulfato e estão associados a uma fase inicial de deposição da matriz óssea.^{81,82} Outros autores associam a presença de sulfato de condroitina numa fase de mineralização da matriz extracelular e o dermatan sulfato em uma fase de proliferação desta matriz.⁸³ Tais achados corroboram com nosso estudo onde o material PLLA_HA_M2, com maior quantidade de sulfato de condroitina A e C, apresentou maior mineralização da matriz extracelular que o material controle PLLA, que apresentou maior quantidade de dermatan sulfato e maior quantidade de matriz colágena.

Por fim, a enzima queratanase digere sulfato de queratana. Este GAG não apresentou diferença nos diferentes materiais estudados e apresenta ampla distribuição no corpo humano. No tecido ósseo, está relacionado na literatura como marcador de matriz óssea recém-sintetizada,⁸⁴ ligando-se a proteínas ósseas, e pode estar relacionado ao controle da mineralização.⁸⁵

8. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada foi adequada tanto para a produção de HA convencional e HA dopada com íons Mg^{2+} e Sr^{2+} , como para a síntese de matrizes de suporte celular eletrofiadas combinando PLLA, HA e as diferentes concentrações iônicas propostas. A incorporação iônica alterou a liberação de íons Ca^{2+} e P^{2+} em pH neutro e ácido, mostrando alterações de estabilidade das matrizes modificadas. A dopagem da hidroxiapatita com 5 wt% de Mg^{2+} e 10 wt% de Sr^{2+} incorporada a membranas de PLLA eletrofiado promoveu melhor desempenho biológico, com maior proliferação e diferenciação osteogênica tardia das hPDLSC. A incorporação iônica também mostrou efeito positivo na síntese de colágeno da MEC e sugeriu maior diferenciação osteogênica das MSC nos materiais dopados. Por outro lado, a produção de diferentes tipos de GAG foi relacionada com a mineralização da matriz extracelular e a quantidade de matriz colágena. Esses achados sugerem que a modificação iônica é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de biomateriais destinados à regeneração óssea periodontal e craniofacial, devendo ser validada em modelos animais para confirmação de sua eficácia translacional.

REFERÊNCIAS

1. Tonelli P, Duvina M, Barbato L, Biondi E, Nuti N, Brancato L, et al. Bone regeneration in dentistry. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2011;8(3):24–8.
2. Ning C, Zhou Z, Tan G, Zhu Y, Mao C. Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives. *Prog Polym Sci.* 2018;81:144–62.
3. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2012;40(5):363–408.
4. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater.* 2013;26:120–32.
5. Matsumoto T, Mizuno A, Kashiwagi M, Yoshida S, Sasaki J, Nakano T. Cell-based fabrication of organic/inorganic composite gel material. *Materials (Basel).* 2011;4(1):327–38. doi:10.3390/ma4010327.
6. Ling LE, Feng L, Liu HC, Wang DS, Shi ZP, Wang JC, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(5):1732–45.
7. Zong C, Qian X, Tang Z, Hu Q, Chen J, Gao C, et al. Biocompatibility and bone-repairing effects: comparison between porous poly-lactic-co-glycolic acid and nano-hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds. *J Biomed Nanotechnol.* 2014;10(6):1091–104.
8. Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials (Basel).* 2017;10(4).
9. Muller P, Bulnheim U, Diener A, Luthen F, Teller M, Klinkenberg ED, et al. Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008;12(1):281–91.
10. Wang P, Zhao L, Liu J, Weir MD, Zhou X, Xu HH. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone Res.* 2014;2:14017.
11. Laskus A, Kolmas J. Ionic substitutions in non-apatitic calcium phosphates. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).
12. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017;105(5):1285–99.
13. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;23(10):2335–47.
14. He LY, Zhang XM, Liu B, Tian Y, Ma WH. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(7).

15. Kaygili O, Keser S, Kom M, Eroksuz Y, Dorozhkin SV, Ates T, et al. Strontium substituted hydroxyapatites: Synthesis and determination of their structural properties, in vitro and in vivo performance. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;55:538–46.
16. Querido W, Rossi AL, Farina M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. *Micron*. 2016;80:122–34.
17. Koushik TM, Miller CM, Antunes E. Bone tissue engineering scaffolds: Function of multi-material hierarchically structured scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2022. doi:10.1002/adhm.202202766.
18. Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B, et al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds.
19. Dwivedi N, Siddiqui MA, Srivastava S, Sinha N. H-13C cross-polarization kinetics to probe hydration-dependent organic components of bone extracellular matrix. *Magn Reson Chem*. 2023. doi:10.1002/mrc.5347.
20. Hassenkam T, Fantner GE, Cutroni JA, Weaver JC, Morse DE, Hansma PK. High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone.
21. Maia FR, Bastos AR, Oliveira JM, Correlo VM, Reis RL. Recent approaches towards bone tissue engineering. *Bone*. 2022;154:116256. doi:10.1016/j.bone.2021.116256.
22. Hidalgo-Bastida LA, Cartmell SH. Mesenchymal stem cells, osteoblasts and extracellular matrix proteins: enhancing cell adhesion and differentiation for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(4):405–12. doi:10.1089/ten.teb.2009.0714.
23. Kerschnitzki M, Wagermaier W, Roschger P, Seto J, Shahar R, Duda GN, et al. Architecture of the osteocyte network correlates with bone material quality. *J Struct Biol*. 2011;173(2):303–11.
24. Tossi S, Behravan J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides. *BioFactors*. 2020;46(3):326–40. doi:10.1002/biof.1598.
25. Mirghaffari M, Mahmoodiyan A, Mahboubizadeh S, Shahbazi A, Soleimani Y, Mirghaffari S, et al. Electrospun piezoelectric PLLA smart composites as a scaffold on bone fracture: a review. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96(2):261–71.
26. Khan AR, Williams DF, Kaigler D, et al. Raising the bar: progress in 3D-printed hybrid bone scaffolds. *Bioengineering*. 2024;11(4).
27. Radulescu D-E, Olar R, Machedon-Popa C, Ioniță C, Preda S, Vasile BS. Latest research of doped hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13157.
28. Wang M, Li Y, Chen J. Mechanical and biological properties of 3D printed bone scaffolds: review. *Materials (Basel)*. 2025;18(1).

29. Wang X, Zeng D, Weng W, Yan W. Zn-doped calcium phosphate ceramics: Using multi-scale analysis to understand the effect of zinc. *Mater Sci Eng C*. 2021;118:111441.
30. Frasnelli M, Cristofaro F, Sglavo VM, Dire S, Callone E, Ceccato R, et al. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:653–62.
31. Chen X, Fan H, Deng X, Wu L, Yi T, Gu L, et al. Scaffold structural microenvironmental cues to guide tissue regeneration in bone tissue applications. *Natl Eng Res Cent Biomater*.
32. Cox SC, Jamshidi P, Grover LM, Mallick KK. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;35:106–14.
33. Li Y, Li J, Zhu S, Luo E, Feng G, Chen Q, et al. Effects of strontium on proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):725–30.
34. Nardone V, Zonefrati R, Mavilia C, Romagnoli C, Ciuffi S, Fabbri S, et al. In vitro effects of strontium on proliferation and osteoinduction of human preadipocytes. *Stem Cells Int*. 2015;2015:871863.
35. Padilla S, Benito-Garzón L, Enciso Sanz S, Garzón-Gutiérrez A, García Carrodegua R, Rodríguez MA, et al. Novel osteoinductive and osteogenic scaffolds of monetite, amorphous calcium phosphate, hydroxyapatite, and silica gel: influence of the hydroxyapatite/monetite ratio on their properties. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020;6(6):3440–53.
36. Yedekçi B, Erdemli Ö, Demirtaş TT, Gümüşderelioğlu M. 3D porous PCL-PEG-PCL/B–Sr–Mg doped HA composite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2022;138:91–104.
37. Chen B, Zhang Z, Li H, Zhou Y, Li Y, Xu J, et al. Strontium/magnesium-doped coralline hydroxyapatite for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2025;xx(x):xx–xx.
38. Mouser VHM, Abbadessa A, Levato R, Hennink WE, Vermonden T, Gawlitta D, et al. Development of a biomimetic bone scaffold with controlled porosity. *Acta Biomater*. 2020;110:226–39.
39. Jung RE, Siegenthaler DW, Hämmerle CHF. Postextraction tissue management: a soft tissue punch technique. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2004;24(6):545–53.
40. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res*. 2013;57(1):3–14.
41. Shikinami Y, Matsusue Y, Nakamura T. The complete process of bioresorption and bone replacement using devices made of forged composites of raw hydroxyapatite (u-

HA) particles and poly L-lactide (PLLA). *Biomaterials*. 2005;26(27):5542–51.

42. Lee JY, Nam SH, Im SY, Hwang DS, Lee YS, Lee FY, et al. Comparison of the degradation behavior of poly(L-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide) in saline and phosphate-buffered saline. *Macromol Res*. 2003;11(5):345–50.

43. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000;21(23):2335–46.

44. Habraken WJEM, Wolke JGC, Mikos AG, Jansen JA. Injectable PLGA-based composites for bone tissue engineering. *Macromol Biosci*. 2006;6(8):551–66.

45. Zhao Y, Mu J, Zheng C, Zhou Y, Zhang Y, Wu C, et al. Immunomodulatory function of periodontal ligament stem cells with different osteogenic potential: implication for their application in bone regeneration. *Cell Death Dis*. 2022;13(3):259.

46. Liu H, Chen C, Tang Y, et al. Silicon-substituted hydroxyapatite enhances vascularization and bone regeneration in critical defects. *Adv Funct Mater*. 2023;33(18):2209857.

47. Zubiak-Mihkelsoo Z, Ślósarczyk A, Adamczyk-Cieślak B, Paszkiewicz Z, Sitarz M. Ionic doping of hydroxyapatite for bone regeneration: Advances in structure and properties over two decades—A narrative review. *Appl Sci*. 2025;15(3):1108.

48. Selim M, et al. Innovative designs of 3D scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2024. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305724005123>

49. Zhou Y, et al. Mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2021;25(4):2103–11.

50. Li X, et al. Dental pulp stem cells for bone regeneration: a systematic review. *Stem Cells Int*. 2023;2023:8895412.

51. Shuai C, Yang W, Feng P, Peng S, Pan H. Accelerated degradation of HAP/PLLA bone scaffold by PGA blending facilitates bioactivity and osteoconductivity. *State Key Laboratory of High Performance Complex Manufacturing, Central South University*. 2021.

52. Zaszczyńska A, Kołbuk D, Gradys A, Sajkiewicz P. Development of poly(methyl methacrylate)/nano-hydroxyapatite (PMMA/nHA) nanofibers for tissue engineering regeneration using an electrospinning technique. *Polymers (Basel)*. 2020;12(3):644.

53. Scalera F, Rossi A, Gervaso F, Montagna F, Giannini C, Licciulli A. Sintering and characterization of magnesium–strontium co-doped hydroxyapatite for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(4):831–42.

54. Cheng M, Wang C, Wang J, Zhang S, Zhu W, Liu Y, et al. Immunomodulatory effects of biomaterials on bone regeneration. *Bone Res*. 2021;9(1):1–15.

55. Martins G, Oliveira T, Rocha C, et al. PLLA scaffolds with controlled release of VEGF and BMP-2 enhance bone regeneration in critical-size defects. *Tissue Eng Part*

A. 2023;29(5–6):301–14.

56. Maia FR, Bastos AR, Oliveira JM, Correlo VM, Reis RL. Recent approaches towards bone tissue engineering. *Bone*. 2022;154:116256. doi:10.1016/j.bone.2021.116256.

57. Wang X, Zeng D, Weng W, Yan W. Zn-doped calcium phosphate ceramics: Using multi-scale analysis to understand the effect of zinc. *Mater Sci Eng C*. 2021;118:111441.

58. Castiglioni S, Cazzaniga A, Albisetti W, Maier JA. Magnesium and bone: A role in osteoporosis? *Nutrients*. 2013;5(8):3022–33.

59. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A, Mills BG. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *J Am Coll Nutr*. 2009;28(2):131–41.

60. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2022;148:49–68.

61. Vallet-Regí M, Ruiz-Hernández E. Bioceramics: From bone regeneration to cancer nanomedicine. *Adv Mater*. 2011;23(44):5177–88. doi:10.1002/adma.201101586.

62. García-Martínez JM, Collar EP. Organic–Inorganic Hybrid Materials. *Polymers (Basel)*. 2021;13(1):86. doi:10.3390/polym13010086.

63. Wang L, Li C, Peng X, et al. Ionic substitutions in hydroxyapatite for bone regeneration: From fundamentals to applications. *Biomater Sci*. 2025;13(2):245–60.

64. Li Y, Li J, Li J, et al. Sr-doped hydroxyapatite scaffolds with enhanced osteogenic and angiogenic activities for bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(19):21734–44.

65. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater*. 2018;8:1401–42.

66. Wang S, Hu F, Li J, Zhang S, Shen M, Huang M, et al. Design of electrospun nanofibrous mats for osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mater Sci Eng C*.

67. Geng Z, Wang R, Li Z, Cui Z, Zhu S, Liang Y, et al. Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite. *J Biomater Appl*. 2016;31(1):140–51.

68. Kanzaki N, Onuma K, Treboux G, Tsutsumi S, Ito A. Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite face. *J Phys Chem B*. 2000;104(17):4189–94.

69. Fedotkin A, Kozelskaya A, Korotchenko N, Gigilev A, Shesterikov F, Tverdokhlebov S. Influence of magnesium and strontium substitutions in the structure of hydroxyapatite lattice on the deposition rate and properties of the CaP coatings formed via RF-sputtering of the powder targets. *J Phys Conf Ser*. 2021;1799.

70. Nakazawa K, Izumi Y, Mori R. Morphological and functional studies of rat hepatocytes on a hydrophobic or hydrophilic polydimethylsiloxane surface. *Acta Biomater.* 2009;5(2):613–20.
71. Tat SK, Pelletier JP, Mineau F, Caron J, Martel-Pelletier J. Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodeling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone.* 2011;49(3):559–67.
72. Pasqualetti S, Banfi G, Mariotti M. The effects of strontium on skeletal development in zebrafish embryo. *J Trace Elem Med Biol.* 2013;27(4):375–9.
73. Salbach-Hirsch J, Rauner M, Hofbauer C, Hofbauer LC. New insights into the role of glycosaminoglycans in the endosteal bone microenvironment. *Biol Chem.* 2021;402(11):1415–25. doi:10.1515/hsz-2021-0174.
74. Nakamura R, Nakamura F, Fukunaga S. Changes in the composition of the extracellular matrix accumulated by mesenchymal stem cells during in vitro expansion. *Anim Sci J.* 2014;85(6):706–13. doi:10.1111/asj.12187.
75. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, et al. Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 1996;61(4):609–18. doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19960616)61:4<609::AID-JCB15>3.0.CO;2-A.
76. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Kelly CM, Hodgens KJ, Lee DD, Landis WJ, et al. Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Biol.* 1988;106(3):979–89.
77. Capuccini C, Torricelli P, Boanini E, Gazzano M, Giardino R, Bigi A. Interaction of Sr-doped hydroxyapatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A.* 2009;89(3):594–600.
78. Aina V, Bergandi L, Lusvardi G, Malavasi G, Imrie FE, Gibson IR, et al. Sr-containing hydroxyapatite: morphologies of HA crystals and bioactivity on osteoblast cells. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(3):1132–42.
79. Manton KJ, Haupt LM, Vengadasalam K, Nurcombe V, Cool SM. Glycosaminoglycan and growth factor mediated murine calvarial cell proliferation. *J Mol Histol.* 2007;38(5):415–24. doi:10.1007/s10735-007-9121-6.
80. Abbah S, Lu WW, Peng S, Aladin DM, Li Z, Tam WK, et al. Extracellular matrix stability of primary mammalian chondrocytes and intervertebral disc cells cultured in alginate-based microbead hydrogels. *Cell Transplant.* 2008;17(11):1181–92.
81. Takagi M, Maeno M, Yamada T, Miyashita K, Otsuka K. Nature and distribution of chondroitin sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in rabbit alveolar bone. *Histochem J.* 1996;28(5):341–51. doi:10.1007/BF02331397.
82. Waddington RJ, Roberts HC, Sugars RV, Schönherr E. Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater.* 2003;6:12–21. doi:10.22203/ecm.v006a02.

- 83.** Han Y, Gomez J, Hua R, Xiao P, Gao W, Jiang JX, et al. Removal of glycosaminoglycans affects the in situ mechanical behavior of extrafibrillar matrix in bone. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021;123:104766. doi:10.1016/j.jmbbm.2021.104766.
- 84.** Fisher LW, Schraer H. The glycosaminoglycans of estrogen-induced medullary bone in Japanese quail. *Arch Biochem Biophys.* 1980;205(2):396–403. doi:10.1016/0003-9861(80)90122-8.
- 85.** Caterson B, Melrose J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology.* 2018;28(4):182–206. doi:10.1093/glycob/cwy003.

