



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Coleta de dados para revisão sistemática para resposta biológica *in vitro* de biocerâmicas à base de fosfatos de cálcio dopadas com Boro e Estrôncio

Data collection for systematic review of in vitro biological response of Boron and Strontium doped calcium phosphate bioceramics

Gustavo Xavier Peres*, Lucas Freitas Berti[†],
Ariane Pogere[‡], José Ferreira da Silva Junior[§], Marco Augusto Stimamiglio[¶],
João Antônio Palma Setti^{||}

RESUMO

A utilização de materiais biocerâmicos dopados com íons tem sido alvo de muitas pesquisas pela capacidade de melhorar o potencial de integração óssea de enxertos e implantes. Este trabalho propõe coletar dados para um estudo preliminar de avaliação dos efeitos na resposta biológica de biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio, provocados pela adição de íons de estrôncio e boro. Este estudo preliminar visa a produção posterior de uma revisão sistemática. Foram escolhidas palavras-chaves para consultar as seguintes bases de dados: Scopus, PubMed, Embase e Web of Science. Os resultados obtidos passaram por duas fases de triagem para selecionar os artigos que podem ser utilizados para o estudo final e para a elaboração da meta-análise. Após a triagem, a meta-análise foi realizada com dados de cinco artigos utilizando ensaios de fosfatase alcalina (ALP) como parâmetro de comparação. Este estudo preliminar permitiu tomar conhecimento da produção científica publicada acerca do tema de interesse e das dificuldades que estarão presentes para a elaboração futura de uma revisão sistemática.

Palavras-chave: Materiais Biomédicos, Hidroxiapatita, Ossos, Boro, Estrôncio.

ABSTRACT

The use of ion-doped bioceramic materials has been the subject of much research due to its ability to improve the potential for bone integration of grafts and implants. This work proposes to collect data for a preliminary study to evaluate the effects on the biological response to calcium phosphates based bioceramics caused by the addition of strontium and boron ions, in order to later produce a systematic review. Keywords were chosen to consult the following databases: Scopus, PubMed, Embase and Web of Science. The results obtained went through two screening phases to select the articles that can be used for the final study and for the elaboration of the meta-analysis. After screening, meta-analysis was performed with data from five articles using alkaline phosphatase (ALP) assays as a comparison parameter. This preliminary study allowed us to learn about the scientific production published on the topic of interest and the difficulties that will be present for the future elaboration of a systematic review.

Keywords: Biomedical Materials, Hydroxyapatite, Bones, Boron, Strontium.

* Eng Mecânica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; gustavoperes@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; lenberti@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; ari.pogere@gmail.com

[§] Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, PR, Brasil; j.ferreira@unila.edu.br

[¶] Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, Curitiba, PR, Brasil; marco.stimamiglio@fiocruz.br

^{||} Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, Curitiba, PR, Brasil; setti@utfpr.edu.br



1 INTRODUÇÃO

Materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio, como a hidroxiapatita, vem sendo muito estudados por sua grande capacidade de osteointegração, um fenômeno que se refere a capacidade de fusão entre um implante e o osso e suas aplicações em implantes e enxertos ósseos (OLIVEIRA, BERTI, *et al.*, 2021). Além das propriedades biológicas inerentes desses biomateriais, existe a possibilidade de melhorar seu potencial de osteointegração através da introdução de íons inorgânicos, como estrôncio (Sr), boro (B) e magnésio (Mg), em sua composição (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, *et al.*, 2020).

Dentro do contexto abordado, nas bases de dados Scopus, PubMed, Embase e Web of Science existem poucos estudos de revisão sistemática que avaliam a alteração do desempenho biológico provocado pela introdução de íons em biocerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio e nenhum que aborda o caso específico de ensaios *in vitro*. O trabalho de Lodoso-Torrecilla e colaboradores apresenta resultados similares a proposta desse trabalho, entretanto são avaliados com ensaios *in vivo* (LODOSO-TORRECILLA, KLEIN GUNNEWIEK, *et al.*, 2020). Diante disso, este trabalho tem como objetivo fazer uma investigação preliminar do que está sendo produzido em termos de avaliação *in vitro* do impacto da dopagem de materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio com íons de Sr e B com o intuito de examinar a possibilidade de produzir uma revisão sistemática sobre o tema anunciado.

Os objetivos específicos deste trabalho são pesquisar a produção científica sobre dopagem de materiais biocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio com Sr e B nas bases de dados Scopus, PubMed, EmBase e Web of Science, e selecionar, a partir dos artigos encontrados, aqueles que seriam adequados ao tema abordado para a elaboração de uma revisão sistemática, assim como produzir uma meta-análise dos resultados obtidos com os ensaios *in vitro* de atividade ALP (fosfatase alcalina), pois a fosfatase alcalina é um importante indicador de formação de tecidos duros (YEDEKÇI, TEZCANER, *et al.*, 2021), nos artigos selecionados.

2 MÉTODO

Para encontrar artigos originais que tratam do tema de interesse, foram utilizados os seguintes termos de pesquisas: “*Hydroxyapatite*”, “*Calcium Phosphate*”, “*Ceramics*”, “*Biom mineralization*”, “*Bone Regeneration*”, “*Gene Expression*”, “*Cell Proliferation*”, “*Cell Differentiation*”, “*Boron*” e “*Strontium*”. As pesquisas foram conduzidas em 8 de junho de 2021 nas bases de dados Scopus, PubMed, EmBase e Web of Science. Somente artigos escritos na língua inglesa e publicados entre 2016 e 2021 foram incluídos nesse estudo. Considerando os critérios PICOS (AMIR-BEHGHADAMI, JANATI, 2020), esse estudo atribuiu: a População como sendo de estudos *in vitro*; a Intervenção como sendo a dopagem de íons B e Sr em biocerâmicas a base de fosfato de cálcio; o Controle como sendo essas mesmas biocerâmicas sem a dopagem; os Desfechos como sendo os valores de ensaios de atividade ALP para avaliar a resposta biológica; e o Tipo de Estudo como sendo apenas artigos de periódicos. A pergunta a ser respondida pela revisão sistemática é: “biocerâmicas a base de fosfato de cálcio dopadas com íons de Boro e Estrôncio apresentam melhor resposta biológica de diferenciação celular osteogênica em comparação com uma biocerâmica sem dopagem?”. A seleção inicial dos estudos foi baseada no conteúdo do título e resumo dos artigos encontrados. Na segunda fase a seleção foi feita após a leitura completa dos artigos que passaram da



primeira fase. Os dados extraídos dos estudos foram: tipo de biocerâmica baseada em fosfato de cálcio, íon utilizado na dopagem, porcentagem de dopagem do biomaterial, tipo de célula estudada, período de avaliação e número de corpos de prova. Para produzir a meta-análise dos desfechos, valores de ensaios de fosfatase alcalina (ALP) foram extraídos dos artigos e foram considerados a média e desvio padrão das amostras em cada período de tempo. A extração de dados dos gráficos de cada estudo foi feita utilizando software de tratamento de imagens Image J (Fiji 1.51n, ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) com auxílio do plug-in Figure Calibration desenvolvido por Frederic Hessman.

A meta-análise dos dados obtidos foi feita utilizando o software Review Manager Version 5.4.1 (Copenhagen, The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2012). Para a exibição dos desfechos obtidos pelos ensaios foram utilizados gráficos de floresta e de funil. Os dados utilizados para a meta-análise foram extraídos de ensaios ALP dos artigos escolhidos e a diferença das médias padronizadas com um intervalo de confiança de 95% foram calculadas para cada ensaio. A heterogeneidade foi avaliada através do valor de I^2 . Os estudos foram separados em subgrupos de modo a avaliar como variáveis metodológicas arbitrárias encontradas nos estudos impactaram nas respostas biológicas, e.g. por dias de avaliação e por porcentagem de dopagem das amostras. Somente foram encontrados dois artigos que realizaram ensaios com o íon Boro, portanto a meta-análise com o íon Boro ficou inviabilizada pela baixa quantidade de dados para comparação. No caso do Estrôncio, a meta-análise foi realizada com cinco estudos que utilizaram amostras com valores comparáveis. A avaliação de risco de viés não foi realizada por se tratar de um estudo preliminar para verificação da viabilidade de realização do estudo final. Os artigos selecionados para meta-análise foram: (TOVANI, OLIVEIRA, *et al.*, 2020), (STIPNIECE, WILSON, *et al.*, 2021), (KIM, KIM, 2021), (GENG, CHENG, *et al.*, 2018) e (CHEN, LIU, *et al.*, 2020)

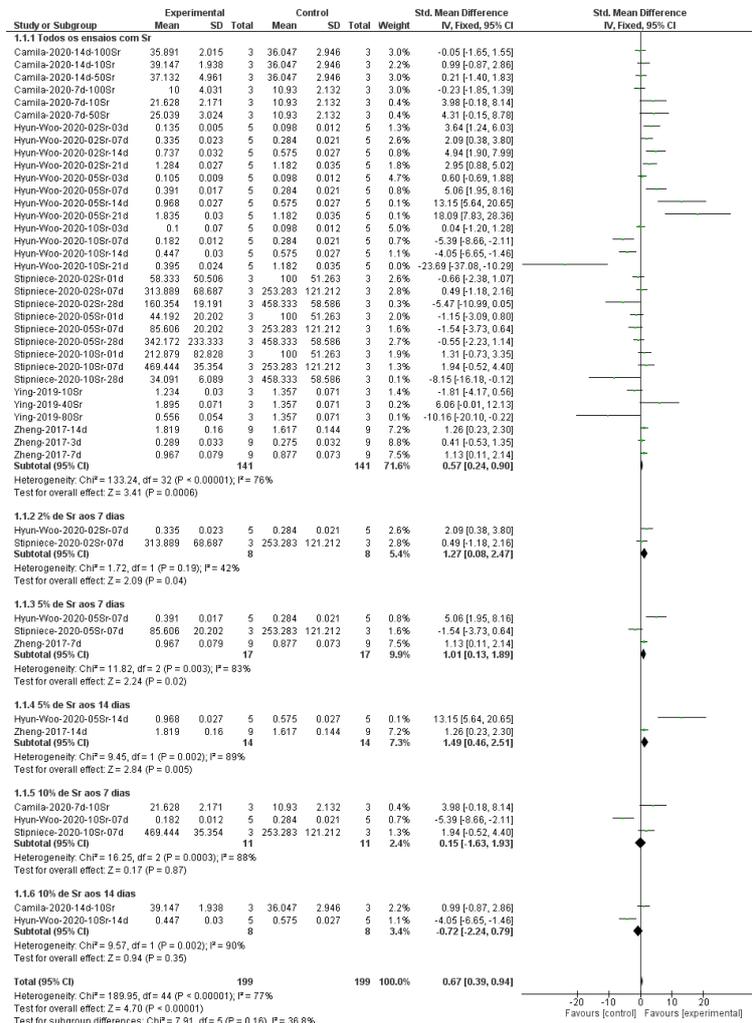
3 RESULTADOS

As pesquisas em bases de dados encontraram 116 artigos na PubMed, 135 artigos na EmBase, 139 artigos na Scopus e 281 artigos na Web of Science, totalizando 671 artigos. A partir desses resultados, 654 foram descartados na fase de avaliação de títulos e resumos, restando 17 artigos que foram lidos em sua totalidade. Para produzir a meta-análise foram selecionados 5 artigos que realizaram ensaios ALP adequados para efetuar uma comparação. Dos artigos selecionados, considerando o tipo de material, 15 utilizaram hidroxiapatita e quatro utilizaram combinações de fosfatos de cálcio. Considerando os tipos de células, oito utilizaram osteoblastos, sete utilizaram células tronco e três utilizaram outros tipos de células ou realizaram ensaios *in vivo*. Considerando os íons dopantes, 14 utilizaram somente Sr, três utilizaram Sr e Mg, um utilizou Sr, Mg e B e um utilizou somente B.

A meta-análise avaliou os resultados obtidos por ensaios ALP como indicador de alteração da capacidade biológica das amostras promovida pela intervenção. A Figura 1 apresenta o resultado geral da meta-análise.



Figura 1 - Meta-análise do resultado do ensaio ALP em todas as amostras dopadas com Sr selecionadas



Fonte: A autoria própria (2021)

Conforme apresentado na Figura 1, considerando as amostras como um todo sem divisão em subgrupos, a análise conteve 33 grupos de experimentos com 141 amostras no total e o efeito geral da dopagem das amostras no resultado do ensaio ALP (diferença média entre amostras dopadas e não dopadas) foi de 0,57 e 95% do intervalo de confiança entre 0,24 e 0,90 e com uma heterogeneidade de 76%. O valor de 0,57 significa que amostras dopadas produzem melhor resposta no ensaio ALP, indicando uma maior atividade osteogênica.

Considerando a análise com subgrupos, a meta-análise foi dividida em cinco subgrupos entre amostras dopadas com 2% de Sr e avaliadas aos 7 dias, 5% de Sr e avaliadas aos 7 dias e aos 14 dias e em amostras dopadas com 10% de Sr e avaliadas aos 7 dias e aos 14 dias.



Nas amostras dopadas com 2% de Sr e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,27 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,08 e 2,47. Esse resultado indica que aos 7 dias de realização de ensaio é possível ver uma expressão de ALP que indica um aumento de atividade osteogênica da amostra. Em amostras dopadas com 5% de Sr e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,01 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,13 e 1,89. Novamente indicando uma melhoria de atividade osteogênica da amostra. Nas amostras dopadas com 5% de Sr e avaliadas aos 14 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 1,49 a favor das amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre 0,46 e 2,51. Aos 14 dias a melhora no desempenho é superior ao que foi encontrado em amostras com tempo de experimento de 7 dias indicando que o efeito da dopagem é prolongado. Nas amostras dopadas com 10% de Sr e avaliadas aos 7 dias o efeito da dopagem na diferença das médias padronizadas foi de 0,15, favorecendo as amostras dopadas com 95% do intervalo de confiança entre -1,63 e 1,93. A diminuição da diferença das medias padronizadas pode ser explicada pela indução de condições citotóxicas causadas pelo aumento da quantidade de íons de Sr liberados pela amostra, o que interfere com a capacidade de diferenciação das células (KIM, KIM, 2021). Nas amostras dopadas com 10% de Sr e avaliadas aos 14 dias o efeito da dopagem na diferença média foi de -0,72, favorecendo as amostras de controle com 95% do intervalo de confiança entre -2,24 e 0,79. Novamente mostrando o efeito negativo da liberação excessiva de íons de Sr.

A variância dos valores de atividade ALP encontrados nos estudos incluídos faz com que a heterogeneidade seja alta. Valores com diversas ordens de grandezas para o mesmo experimento, e.g. o estudo de Stipnice e colaboradores e o estudo de Kim Hyun-Woo, nos quais se avaliou o mesmo dopante, com o mesmo percentual de dopagem e período de avaliação, o primeiro estudo relata valores na grandeza de 10^{-1} e o segundo apresenta valores na grandeza de 10^2 .

4 CONCLUSÃO

As estratégias de busca utilizadas levaram a um grande número de artigos que permitiram uma observação dos diversos métodos para análise *in vitro* do desempenho de amostras de fosfatos de cálcio dopadas com íons inorgânicos em induzir atividade osteogênica. Contudo, a variabilidade encontrada nos experimentos realizados levou à uma grande heterogeneidade estatística encontrada na meta-análise. Através da meta-análise dos ensaios ALP foi possível observar uma melhora no desempenho das biocerâmicas dopadas com 5% de Sr nos períodos avaliados de 7 e 14 dias, porém em amostras com 10% de Sr se observa um efeito negativo, no qual a dopagem diminui a capacidade osteogênica das células.



AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq – Brasil. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores gostariam de agradecer ao Centro Multiuso de Caracterização de Materiais-CMCM da UTFPR-CT.

REFERÊNCIAS

- AMIR-BEHGHADAMI, M., JANATI, A. **Population, Intervention, Comparison, Outcomes and Study (PICOS) design as a framework to formulate eligibility criteria in systematic reviews. *Emergency Medicine Journal***. [S.l.], BMJ Publishing Group. Disponível em: <https://emj.bmj.com/content/37/6/387>. Acesso em: 9 set. 2021. , 1 jun. 2020
- CHEN, Y., LIU, Z., JIANG, T., *et al.* "Strontium-substituted biphasic calcium phosphate microspheres promoted degradation performance and enhanced bone regeneration", ***Journal of Biomedical Materials Research Part A***, v. 108, n. 4, p. 895–905, 26 abr. 2020. DOI: 10.1002/jbm.a.36867. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.36867>. Acesso em: 7 set. 2021.
- GENG, Z., CHENG, Y., MA, L., *et al.* "Nanosized strontium substituted hydroxyapatite prepared from egg shell for enhanced biological properties", ***Journal of Biomaterials Applications***, v. 32, n. 7, p. 896–905, 1 fev. 2018. DOI: 10.1177/0885328217748124. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0885328217748124>. Acesso em: 6 set. 2021.
- KIM, H. W., KIM, Y. J. "Fabrication of strontium-substituted hydroxyapatite scaffolds using 3D printing for enhanced bone regeneration", ***Journal of Materials Science***, v. 56, n. 2, p. 1673–1684, 1 jan. 2021. DOI: 10.1007/s10853-020-05391-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-020-05391-y>. Acesso em: 7 set. 2021.
- LODOSO-TORRECILLA, I., KLEIN GUNNEWIEK, R., GROSFELD, E. C., *et al.* "Bioinorganic supplementation of calcium phosphate-based bone substitutes to improve: In vivo performance: A systematic review and meta-analysis of animal studies", ***Biomaterials Science***, v. 8, n. 17, p. 4792–4809, 7 set. 2020. DOI: 10.1039/d0bm00599a. Disponível em: <https://www>. Acesso em: 7 set. 2021.
- OLIVEIRA, T. M., BERTI, F. C. B., GASOTO, S. C., *et al.* "Calcium Phosphate-Based Bioceramics in the Treatment of Osteosarcoma: Drug Delivery Composites and Magnetic Hyperthermia Agents", ***Frontiers in Medical Technology***, v. 3, p. 26, 30 jun. 2021. DOI: 10.3389/fmedt.2021.700266. .
- STIPNIECE, L., WILSON, S., CURRAN, J. M., *et al.* "Strontium substituted hydroxyapatite promotes direct primary human osteoblast maturation", ***Ceramics International***, v. 47, n. 3, p. 3368–3379, 1 fev. 2021. DOI: 10.1016/j.ceramint.2020.09.182. Disponível em: <https://pure.ulster.ac.uk/en/publications/strontium-substituted-hydroxyapatite-promotes-direct-primary-huma>. Acesso em: 7 set. 2021.
- TOVANI, C. B., OLIVEIRA, T. M., SOARES, M. P. R., *et al.* "Strontium Calcium Phosphate Nanotubes as Bioinspired Building Blocks for Bone Regeneration", ***ACS Applied Materials and Interfaces***, v. 12, n. 39, p. 43422–43434, 30 set. 2020. DOI: 10.1021/acsami.0c12434. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32876428/>. Acesso em: 6 set. 2021.
- YEDEKÇI, B., TEZCANER, A., ALSHEMARY, A. Z., *et al.* "Synthesis and sintering of B, Sr, Mg multi-doped hydroxyapatites: Structural, mechanical and biological characterization", ***Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials***, v. 115, 1 mar. 2021. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2020.104230. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33307486/>. Acesso em: 6 set. 2021.