UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SAMIRA SALMERON

Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal

BAURU
2015

SAMIRA SALMERON

Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral - Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Versão corrigida

BAURU

2015

Salmeron, Samira

Sa35e Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal / Samira Salmeron. – Bauru, 2015.

166 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Rubo de Rezende

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 031/2012

Data: 03/12/2012

DADOS CURRICULARES

Samira Salmeron

03 de Novembro de 1982	Nascimento: Piracicaba/SP/Brasil
Filiação	Antonio Salmeron Lidia Bonoche Salmeron
2004 – 2007	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).
2005 – 2007	Iniciação Científica junto à Disciplina de Cirurgia – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).
2008	Prática Profissionalizante junto à Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).
2008	Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia – Instituto de Ensino Odontológico (IEO, Bauru/SP).
2010	Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Avançada em Implantodontia – Odontologia Prof. Edgard Moraes (OPEM, Bauru/SP).
2009 – 2011	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas – Reabilitação Oral (Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).
2010 – 2014	Docente convidada dos Cursos de Especialização em Periodontia (FOB/USP e FUNBEO), Implantodontia (OPEM) e Periodontia e Implantodontia (COPH), Prótese Dentária (FACOPH) e do Curso de Atualização em Periodontia (FOB/USP).
2011 – 2015	Doutorado em Ciências no Programa Odontológicas Aplicadas – Reabilitação Oral (Periodontia) pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese às pessoas que compartilharam e acreditaram
neste sonho junto comigo, ao meu bem mais precioso, **minha**
família ...*

*Aos meus pais **Antonio** e **Lidia**, por me ensinarem os verdadeiros
valores da vida, personificando a família no sentido mais amplo
e esplêndido da palavra!*

*À minha irmã **Sintia**, por acreditar no impossível e despertar o
melhor de mim, sempre!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À amiga e orientadora Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende, com a qual aprendi muito e em quem me espelho para seguir adiante... Agradeço os anos de convivência, as batalhas vencidas, os obstáculos ultrapassados e, acima de tudo, o conhecimento adquirido. Obrigada por todo aprendizado, pela parceria fiel, pela confiança creditada e pelas oportunidades recebidas. Seus ensinamentos são valores que levarei para toda a vida!

Meus sinceros agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e, antes de tudo, agradeço a **DEUS** pela minha vida e por tudo que sou! Obrigada **Senhor** por se fazer tão presente nas horas mais difíceis, por me mostrar novas alternativas, por me fazer olhar as situações de forma diferente, por me dar forças para continuar lutando sempre, mesmo diante das piores adversidades e, acima de tudo, por me mostrar, todos os dias, que estou no caminho certo!

Aos meus **queridos pais ANTONIO SALMERON e LIDIA BONOCHER SALMERON** por serem sempre os primeiros a me apoiarem e a acreditarem nas minhas escolhas! Agradeço imensamente pelos ensinamentos de vida, pelos valores passados, pelo esforço a nós dedicado, pela paciência e carinho. Não tenho palavras para expressar minha eterna gratidão e meu reconhecimento por tudo, absolutamente tudo que fizeram e fazem por mim! À vocês devo minha vida e com vocês compartilho todas as minhas vitórias e conquistas!

À minha **irmã SINTIA SALMERON**, real expressão do amor fraternal! Obrigada por todas as palavras de incentivo, pela cumplicidade, pela convivência engrandecedora e pela ajuda incondicional. Pessoa que admiro por sua determinação e vontade de realizar cada vez mais. Agradeço por estar presente nos momentos bons e ruins da minha vida, fazendo tudo parecer mais simples...

Aos meus **avós maternos DOMINGOS BONOCHER (in memorian) e WILMA MARTINS BONOCHER (in memorian)** que, mesmo não mais presentes fisicamente, sempre farão parte da minha história e compartilharão do meu crescimento! Serei eternamente grata pelos valores ensinados e pelas incríveis recordações, as quais levo comigo hoje e sempre!

Aos meus **avós paternos ANTONIO LOPES SALMERON (in memorian)** e **MERCEDES PARIZOTTO SALMERON** pelas importantes lições de vida passadas ao longo das gerações, valorizando sempre a honestidade, o amor e a família acima de tudo!

Ao meu **tio WALTER DOMINGOS BONOCHER** por se fazer presente em todos os momentos, mesmo estando distante! Agradeço toda preocupação, carinho e reitero o espaço importante que ocupa na minha vida!

À minha **família (tios e primos)** pelo apoio e vibração a cada degrau alcançado!

Aos **amigos AFONSO CARLOS TELLES NUNES** e **KAREN CUNHA ANTUNES** pelos incontáveis momentos que passamos juntos e que nos deram suporte e sabedoria necessários para enfrentar as lutas diárias e continuarmos sonhando, sempre... Obrigada por tudo, mas principalmente, obrigada pela amizade verdadeira que nos une!

Aos **amigos ADALBERTO VICENTINI SILVA** e **GUILHERME VIANNA FERRAZ DE CAMARGO** por todo apoio e amizade incondicional recebidos! Pessoas maravilhosas que admiro imensamente pelo caráter e humanidade, as quais espero ter sempre ao meu lado. Agradeço cada palavra de incentivo e cada gesto de carinho!

Aos **amigos** de ontem, hoje e sempre **DÉBORAH CAETANO FERRAZ, CAMILA ARANTES GARCIA** e **MARCELO MAZOTI** por estarem aqui, mesmo estando do outro lado do mundo! Obrigada por fazerem parte da minha vida, mostrando que as verdadeiras amizades ultrapassam as barreiras do tempo e do espaço quando o sentimento cultivado é verdadeiro!

Aos **amigos ADRIANO ALMEIDA, MAIKE PAULINO DA SILVA e VIVIAM DE OLIVEIRA SILVA** pelos momentos incríveis que passamos nos EUA! Agradeço a colaboração nos experimentos e, principalmente, a oportunidade de conhecer vocês em um momento tão importante da minha vida. A experiência que tivemos e as recordações de tudo que passamos serão levadas comigo pelo resto da vida!

Ao meu **orientador estrangeiro Prof. Dr. HOMAYOUN HUSSEIN ZADEH** pela indescritível oportunidade de trabalhar com sua equipe na Universidade do Sul da Califórnia (USC), onde aprendi muito e fui muito bem recebida. Obrigada pela confiança e parceria estabelecida!

Ao meu **co-orientador Prof. Dr. RODRIGO CARDOSO DE OLIVEIRA**, professor livre-docente da Disciplina de Bioquímica da FOB/USP, por sua colaboração imensurável no desenvolvimento desse trabalho, desde a fase de projeto. Obrigada por disponibilizar seu laboratório e por contribuir de forma tão ativa durante todo o processo. Seus conhecimentos e sugestões foram imprescindíveis para a qualidade dos resultados apresentados!

Ao **amigo e colaborador Prof. Dr. MARCELO OLIVEIRA FREIRE**, pesquisador do Forsyth Institute – Universidade de Harvard, por toda dedicação desde o início! Obrigada pela ajuda na elaboração do projeto que viabilizou minha ida ao exterior, por todo apoio nas análises no Brasil e nos EUA, pelo suporte financeiro com os materiais e, acima de tudo, por sua enorme contribuição científica, sem a qual não teríamos alcançado resultados tão promissores!

Ao **professor titular aposentado** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Prof. Dr. EULOIR PASSANEZI** que muito participou da minha formação profissional, dividindo suas valiosas experiências teóricas e clínicas.

Ao **professor titular** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Prof. Dr. SEBASTIÃO LUIZ AGUIAR GREGHI**, um dos professores responsáveis pela escolha da minha especialidade. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos desde a época da graduação e, agora, na pós-graduação e por toda confiança depositada ao longo desses anos de convivência!

À **professora livre-docente** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Profa. Dra. ADRIANA CAMPOS PASSANEZI SANT'ANA**, por todo o aprendizado na graduação e pós-graduação. Obrigada pelo carinho e compreensão com que sempre me atendeu e por todas as oportunidades recebidas!

À **professora** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Profa. Dra. CARLA ANDREOTTI DAMANTE**, por sua imensa colaboração neste trabalho, me ajudando nos experimentos com cultura de células. Obrigada por todo ensinamento e parceria!

À **professora** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **Profa. Dra. MARIANA SCHUTZER RAGGHIANI ZANGRANDO**, pelos grandes conhecimentos compartilhados nesse pouco tempo de convivência. Agradeço a amizade e a confiança em mim creditadas!

Ao **vice-diretor da FOB/USP** e **professor titular** da Disciplina de Farmacologia da mesma faculdade **Prof. Dr. CARLOS FERREIRA DOS SANTOS** por sua imensa colaboração, em todos os sentidos! Agradeço por toda ajuda, por cada palavra de incentivo, pela parceria de muitos anos, amizade e, acima de tudo, por servir de exemplo nessa minha longa jornada acadêmica!

Ao **professor livre-docente** do Departamento de Física da FC/UNESP **Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho** pela colaboração e parceria estabelecidas ao disponibilizar seu laboratório e sua equipe na execução de parte deste estudo, tornando possível a utilização do equipamento de Microscopia Confocal para as análises dos parâmetros de superfície.

Ao **professor titular** do Departamento de Física da FC/UNESP **Prof. Dr. Carlos Roberto Grandini** pela viabilização do uso do Microscópio Eletrônico de Varredura para as análises do comportamento celular e de composição da superfície, estabelecendo, também, uma parceria com nossa equipe.

Ao **Prof. Dr. HEITOR MARQUES HONÓRIO** por dedicar parte de seu tempo nos ajudando com as análises estatísticas.

À **amiga CLARISSA RIBEIRO FONSECA** pela amizade acolhedora e por sua enorme boa vontade e disponibilidade em ajudar com as cirurgias dos animais!

Aos **cirurgiões-dentistas ÍSIS DE FÁTIMA BALDERRAMA e PAYELY FANA GONZALEZ** pela colaboração nas cirurgias dos animais.

Aos **pós-graduandos** da Disciplina de Periodontia **JEFREY ELIAS ROJAS PAULUS** e **GUSTAVO GONÇALVES DO PRADO MANFREDI** pela ajuda na execução das cirurgias dos animais, **PAULA STEPHANIA BRANDÃO HAGE KARAM** por sua colaboração na cultura de células, **RAFAEL FERREIRA** pela ajuda na fixação das amostras, e à todos, **ANDRÉIA PEREIRA DE SOUZA, PAULUS, JOÃO PAULO CORRÊA BARROS, JORGE FRANCISCO FIAMENGUI FILHO, MARIA ALEJANDRA FRÍAS MARTÍNEZ, MARIA ALEJANDRA MEDINA VALDIVIA, PAULA DE OLIVEIRA CUNHA, RAPHAELLA COELHO MICHEL e VITOR DE TOLEDO STUANI**, por todos os momentos de descontração e pelas trocas de conhecimento e experiências vividas!

Às **pós-graduandas** **CINTIA KAZUKO TOKUHARA** pelas orientações na cultura de células e **RAFAELA ALVES DA SILVA ALAVARCE** pela ajuda no preparo dos reagentes. Agradeço a elas e aos **pós-graduandos** **ANA REGINA CASAROTO**, **HELITON GUSTAVO DE LIMA** e **KAREN HENRIETTE PINKE** por todo o conhecimento compartilhado, a amizade cultivada e a convivência incrível que tivemos durante todos esses anos.

Às **pós-graduandas** da FC/UNESP **LARISA BALDO DE ARRUDA** e **LUCIANA DANIELE TRINO** pela ajuda na elaboração do método de obtenção dos dados relacionados aos parâmetros de superfície e pela realização das análises no microscópio confocal. Obrigada pela amizade e por sempre me atenderem com a maior boa vontade do mundo!

À **funcionária** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **IVÂNIA KOMATSU DA COSTA ARRUDA** e **toda sua família** pela amizade e dedicação durante todos esses anos de convivência! Agradeço imensamente, minha **amiga**, os incontáveis momentos em que estive presente, me incentivando a continuar...

À **funcionária** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **EDILAINE LÚCIO RODRIGUES TORRECILHA** pelo carinho e atenção em todos os momentos que tivemos a oportunidade de estar juntas!

À **secretária** da Disciplina de Periodontia **MARCELA MARIA PEREIRA** pela forma atenciosa com que sempre me recebeu, disponibilizando tudo o que estava ao seu alcance para me ajudar!

Ao **funcionário** da Disciplina de Periodontia da FOB/USP **MARCOS ANTONIO DE GODOY** pelo apoio e incentivo demonstrados a cada conversa no departamento.

À **funcionária** da FC/UNESP **THAÍS PERES ZANETINE MARQUES** pelas excelentes imagens capturadas no microscópio eletrônico de varredura.

Às **secretárias** do Departamento de Prótese **ANA CLÁUDIA PEREIRA MATTAR** e **DÉBORA ANDREA RIÊRA BLASCA** por estarem sempre dispostas a ajudar, passando as orientações e informações necessárias.

Aos **funcionários** do Biotério da FOB/USP **ELIAS FRANCISCO CRESTA**, **ERASMO GONÇALVES DA SILVA**, **LUIZ CARLOS DA SILVA** e **RICHARD NELSON GUANAES SIMÕES** por cederem e cuidarem dos meus animais e pela enorme boa vontade em atender aos nossos pedidos.

Aos **funcionários** do Centro de Pesquisa Integrado (CIP) **MARCELO MILANDA RIBEIRO LOPES** e **MÁRCIA SIRLENE ZARDIN GRAEFF** pela disponibilidade em colaborar com as nossas pesquisas, dando todo apoio necessário aos experimentos.

Aos **funcionários** da Assistência Técnica Financeira **BRUNO DA SILVA THOMAZINI** e **ZELMA BATISTA BORGES** pela imensa contribuição na minha ida ao exterior, viabilizando o transporte das amostras.

Às **funcionárias** da pós-graduação **ANA LETÍCIA PALOMBO MOMESSO**, **FÁTIMA CASSADOR CARVALHO** e **LEILA REGINA DA SILVA** pelos esclarecimentos e por toda ajuda prestada; e **MARIA MARGARETH PEREIRA MOKARZEL** pela colaboração durante todo o processo e burocracia envolvendo a bolsa de doutorado sanduíche.

Aos **funcionários** da biblioteca, da esterilização e toda a Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP).

Aos **animais** criados especialmente para esta pesquisa, os quais dedicaram sua vida em sacrifício e em prol dos avanços no conhecimento científico!

À **Pós-graduação** da FOB/USP, na pessoa do **Presidente Prof. Dr. GUILHERME DOS REIS PEREIRA JANSON**, pela disponibilização de recursos que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

Às **agências de fomento FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP)** pela concessão do Auxílio à Pesquisa solicitado, sem o qual não seria possível a concretização desse trabalho; e **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pela bolsa de estudos regular no país e pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

À **Universidade do Sul da Califórnia (USC)** e seus **funcionários** pela excelente recepção e oportunidade recebidas!

À **Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP)**, na pessoa da **diretora Profa. Dra. MARIA APARECIDA DE ANDRADE MOREIRA MACHADO**, pela oportunidade de me graduar e elevar meus conhecimentos em Odontologia!

E a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta tese e concretização deste sonho...

Meus sinceros agradecimentos!

Samira Salmeron

*“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está
vendo e pensar uma coisa diferente”.*

Roger Von Oech

RESUMO

A desmineralização óssea superficial tem se demonstrado favorável à consolidação de enxertos e ao comportamento celular, entretanto os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos. Os subsídios para o embasamento biológico da desmineralização, proporcionado por publicações anteriores, sugeriram que modificações na superfície óssea teriam influenciado o comportamento de pré-osteoblastos em cultura. Assim, este estudo objetivou comparar o efeito de duas concentrações de ácido cítrico na desmineralização de superfícies ósseas onde foram cultivadas células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), e analisar parâmetros de superfície comparando superfícies desmineralizadas a não desmineralizadas. Setenta amostras ósseas bicorticais foram removidas das calvárias de 35 ratos e divididas em grupos para as análises: 1) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliação da área de recobrimento e espessura da camada de células sobre as amostras (n = 15) durante 24, 48 e 72 horas: Grupo AC.10 – amostras desmineralizadas por 30 segundos com ácido cítrico 10 %; Grupo AC.50 – amostras desmineralizadas por 30 segundos com ácido cítrico 50 %; e Grupo C (controle) – amostras não desmineralizadas; 2) Microscopia Confocal para análise da área de expressão e intensidade de fluorescência das BMP-2, -4 e -7: AC.10 – seis amostras desmineralizadas conforme item 1); AC.50 – seis amostras desmineralizadas conforme item 1); C – três amostras não desmineralizadas; 3) Microscopia Confocal para análise da rugosidade superficial média (Ra e Sa): Grupos AC.10 e AC.50 com cinco amostras cada, desmineralizadas conforme o item 1), sendo cada amostra seu próprio controle (análises antes e depois da desmineralização). Também foram avaliadas as distâncias entre picos (P-P) e entre picos e vales (P-V) antes e depois da desmineralização; 4) Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV / EDS) para análise da composição superficial: mesmas amostras do item 3) foram avaliadas antes e depois da desmineralização quanto à porcentagem atômica (%A) de carbono, oxigênio, magnésio, fósforo, enxofre e cálcio. Análises estatísticas foram feitas adotando nível de significância de 95 %. Amostras desmineralizadas apresentaram células morfologicamente em estágios mais avançados de diferenciação do que as não desmineralizadas. A área de recobrimento superficial foi significativamente maior após 24 horas de cultura nos grupos teste do que no controle e a espessura da camada de células também foi maior nos grupos

teste às 48 e 72 horas. Houve significativamente maior expressão de BMP-2 e -7 nos grupos teste do que no controle e, apenas AC.10 demonstrou maior expressão de BMP-4 do que os demais grupos, sem significância em relação a AC.50. Os parâmetros de superfície Ra e Sa foram inconclusivos, mas P-P e P-V diminuíram consideravelmente após a desmineralização para distâncias compatíveis com superfícies favoráveis à adesão e diferenciação celular. A análise da composição química superficial revelou diminuição da %A de enxofre e magnésio nos grupos teste. A concentração do ácido, embora não tenha apresentado diferença significativa para a maioria das análises, pareceu ter influência positiva nos resultados para o ácido cítrico 10 %. Concluiu-se que a desmineralização superficial parece promover a proliferação e diferenciação celular, proporcionando superfícies com características de composição e topografia que favorecem o comportamento celular verificado.

Palavras-chave: Ácido cítrico. Osteoblastos. Proteínas ósseas morfogenéticas.

ABSTRACT

Effect of bone demineralization on surface parameters and on behavior of pre-osteoblasts in culture: study in scanning electron microscopy and confocal microscopy

The superficial bone demineralization has proved to be a favorable procedure for bone grafts consolidation and cell behavior, however the underlying mechanisms have not been clarified yet. Therefore, this study aimed to compare the effect of two concentrations of citric acid on demineralization of bone surfaces where pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) were cultivated, and analyze surface parameters comparing demineralized bone surfaces with non-demineralized surfaces. Seventy bicortical bone samples were harvested from the calvaria of 35 rats and divided into groups as follows: 1) Scanning Electron Microscopy (SEM) to evaluate the coating area and thickness of cells layers cultured on the samples (n = 15) for 24, 48, and 72 hours: Group CA.10 – samples demineralized for 30 seconds with 10 % citric acid; Group CA.50 – samples demineralized for 30 seconds with 50 % citric acid, and Group C (control) – non-demineralized samples; 2) Confocal Microscopy for analysis of expression area and intensity of fluorescence of BMP-2, -4, and -7: CA.10 – six samples demineralized as item 1); CA.50 – six samples demineralized as item 1); Group C – three non-demineralized samples; 3) Confocal Microscopy for surface mean roughness analysis (Ra and Sa): Groups CA.10 and CA.50 made up of five samples each and demineralized according to item 1), each sample was its own control (analysis before and after demineralization). The distances between peaks (P-P) and between peaks and valleys (P-V) were also evaluated before and after demineralization; 4) Scanning Electron Microscopy / Energy Dispersive Spectroscopy (SEM / EDS) to analyze the surface composition: the same samples of item 3) were evaluated before and after demineralization for atomic percentage (%A) of carbon, oxygen, magnesium, phosphorus, sulfur and calcium. Statistical test was made by adopting the 95 % significance level. Demineralized samples showed cells with morphology in the later stages of differentiation than non-demineralized ones. The coating surface area by cells was significantly higher after 24 hours of culture in the test groups than in the control and the thickness of the layers were also greater in the test groups at 48 and 72 hours of evaluation. There was significantly higher

expression of BMP-2 and -7 in test groups than in the control group, and only the CA.10 group showed higher BMP-4 expression than the other groups, but the difference was not statistically significant compared to the CA.50 group. Ra and Sa surface parameters were inconclusive, however P-P and P-V decreased considerably after demineralization to distances compatible with surfaces favorable to cell adhesion and cell differentiation. The chemical composition analysis of the surfaces revealed a decrease in the %A for sulfur and magnesium in test groups. Although the acid concentration did not show significant difference for most analysis, it seemed to have a positive influence for the results with citric acid 10 %. It was concluded that the surface demineralization seems to promote cell proliferation and differentiation, providing surfaces with composition and topography that can favor observed cell behavior.

Keywords: Citric acid. Osteoblasts. Bone morphogenetic proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografias de pré-osteoblastos MC3T3-E1 extraídas de: A e B – Sudo et al.(1983); C – You et al. (2011); D – Hule et al. (2008); E e F – Song e Mano (2013) cujas barras de escala correspondem a 30 µm	80
Figura 2 – Sequência de procedimentos cirúrgicos	89
Figura 3 – Disposição das amostras na placa de cultura de 24 poços para o plaqueamento das células MC3T3-E1	92
Figura 4 – Fotomicrografia ilustrativa de uma amostra com identificação (em rosa) das regiões empregadas para as análises morfológica e quantitativa	93
Figura 5 – Fotomicrografia ilustrativa do método de medição da área de recobrimento da superfície óssea onde se encontra demarcada em amarelo a área correspondente à área de cobertura celular da amostra	94
Figura 6 – Fotomicrografia ilustrativa do método de medição da espessura da camada de células MC3T3E-1 (linha amarela) sobre a superfície da amostra	95
Figura 7 – Esquema representativo dos campos de aquisição de imagens das amostras e as fotomicrografias de cada campo separadamente	99
Figura 8 – Fotomicrografia de uma amostra ilustrativa do método de avaliação da área correspondente à expressão de BMP-2 (vermelho contornado em azul) na superfície	100
Figura 9 – Histograma gerado pelo programa ConfocalUniovi ImageJ para intensidade de fluorescência de uma amostra	101
Figura 10 – A) Esquema representativo das dimensões do trapézio sobreposto à amostra. B) Regiões selecionadas para análise (1, 2 e 3)	102

Figura 11 – Janela gerada pelo programa computadorizado do microscópio confocal referente aos parâmetros de superfície	102
Figura 12 – Gráfico ilustrativo gerado pelo programa computadorizado do microscópio confocal referente aos parâmetros de superfície no qual foram medidas as distâncias entre picos (vermelho) e entre picos e vales (azul)	103
Figura 13 – Fotomicrografias ilustrativas do método de aquisição dos dados de composição da superfície nas quais são identificadas as regiões de análise (em rosa) antes e depois da desmineralização	104
Figura 14 – Fotomicrografias de duas amostras do grupo C após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1)	110
Figura 15 – Fotomicrografia da periferia de uma amostra do grupo C após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) onde se observa a presença de uma camada celular com a sobreposição de uma célula mais achatada do que as vistas na Figura 14, exibindo prolongamentos citoplasmáticos mais evidentes (setas amarelas) (aumento 200 x)	111
Figura 16 – Fotomicrografias de amostras do grupo C após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1)	112
Figura 17 – Fotomicrografias das superfícies das amostras do grupo AC.10 após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1)	114
Figura 18 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.10 após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) em que nota-se a presença de células superpostas em camadas com aspecto achatado e extensas filopodias intercomunicantes (aumento 200 x)	115

Figura 19 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.10 após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1), onde se observa uma camada celular múltipla de difícil individualização e com inúmeras conexões mantidas pelos prolongamentos citoplasmáticos formando uma rede de filopodia (aumento 200 x)	116
Figura 20 – Fotomicrografias das superfícies das amostras do grupo AC.50 após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1)	118
Figura 21 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.50 após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) onde múltiplas camadas celulares são vistas com morfologia achatada e estrelada sem bordas definidas e cobrindo toda a superfície (aumento 500 x)	119
Figura 22 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.50 após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) demonstrando a presença de múltipla camada celular com características morfológicas de estágios avançados de diferenciação, sem definição de limites celulares (aumento 500 x)	120
Figura 23 – Fotomicrografias das superfícies ósseas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) de amostras representativas dos grupos experimentais relativos à área de recobrimento	122
Figura 24 – Fotomicrografia de uma amostra representativa do grupo AC.10 de 72 horas demonstrando a presença de múltiplas camadas de células na região da borda da amostra (seta amarela) (aumento 200 x)	123
Figura 25 – Fotomicrografias de amostras representativas dos grupos experimentais quanto à expressão de BMPs na superfície óssea	126

Figura 26 – Fotomicrografias de uma amostra representativa do grupo AC.10 em que se observa a mesma superfície óssea antes e depois da desmineralização128

Figura 27 – Fotomicrografias de uma amostra representativa do grupo AC.50 em que se observa a mesma superfície óssea antes e depois da desmineralização129

Figura 28 – Gráficos da composição da superfície óssea dos grupos AC.10 (A) e AC.50 (B) antes e depois da desmineralização131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanhos das células MC3T3-E1, em diferentes tempos de cultivo, verificadas na literatura	80
Tabela 2 – Especificações dos anticorpos primários, seus alvos e as respectivas diluições utilizadas nos experimentos	97
Tabela 3 – Especificações dos anticorpos secundários, seus alvos, as respectivas diluições utilizadas nos experimentos e os corantes conjugados	98
Tabela 4 – Porcentagem média da área de recobrimento da superfície óssea entre os grupos de estudo de acordo com o período experimental	122
Tabela 5 – Espessura mediana da camada de células entre os grupos de estudo de acordo com o período experimental	124
Tabela 6 – Área mediana correspondente à expressão de BMPs nas superfícies ósseas dos grupos de estudo	125
Tabela 7 – Intensidade de fluorescência correspondente à expressão de BMPs nas superfícies ósseas dos grupos de estudo	125
Tabela 8 – Parâmetros médios de superfície obtidos antes e depois da desmineralização com ácido cítrico a 10% (AC.10) e 50% (AC.50)	127
Tabela 9 – Porcentagem atômica média dos elementos selecionados para análise de composição da superfície (EDS) antes e depois da desmineralização com ácido cítrico a 10% (AC.10) e 50% (AC.50)	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC.10	Grupo desmineralizado com ácido cítrico a 10 %, pH 1, durante 30 segundos
AC.50	Grupo desmineralizado com ácido cítrico a 50 %, pH 1, durante 30 segundos
ALP	Alkaline phosphatase (fosfatase alcalina)
α -MEM	Meio mínimo de cultura alfa
ANKH	ANKH inorganic pyrophosphate transport regulator (gene ANKH)
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins (Proteínas Ósseas Morfogenéticas)
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2 (Proteína Óssea Morfogenética 2)
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein 4 (Proteína Óssea Morfogenética 4)
BMP-7	Bone Morphogenetic Protein 7 (Proteína Óssea Morfogenética 7)
BSP	Bone sialoprotein (Sialoproteína Óssea)
C	Grupo controle não desmineralizado
CS	Condroitin-sulfato (sulfato de condroitina)
DBM	Demineralized bone matrix (matriz óssea desmineralizada)
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
IGF	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
MC3T3-E1	Linhagem de pré-osteoblastos de camundongos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEV/EDS	Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia de Energia Dispersiva
MG-63	Células osteoblásticas humanas
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2 (Metaloproteinase da matriz 2)
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9 (Metaloproteinase da matriz 9)
n	Número de amostras por grupo
OP-1	Proteína osteogênica
OPN	Osteopontin (Osteopontina)
P	Passagem em que as células se encontram na cultura
p	Nível de significância
PBS	Solução tampão salina
PDGF	Fatores de crescimento derivados de plaquetas

PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial Hidrogeniônico
P-P	Distância entre picos
P-V	Distância entre picos e vales
Ra	Rugosidade superficial média de uma linha
rhBMP-2	BMP-2 recombinante humana
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (transcrição reversa da polimerase em cadeia)
RTG	Regeneração tecidual guiada
Runx2	Runx-related transcription factor 2 (fator de transcrição osteoblástica Runx-2)
Sa	Rugosidade superficial média de uma área
SaOS-2	Células osteoblásticas humanas
Sm	Perfil linear
TCN	Tetracycline-HCl (tetraciclina hidroclorada)
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
C	elemento químico carbono
Ca	elemento químico cálcio
Mg	elemento químico magnésio
O	elemento químico oxigênio
P	elemento químico fósforo
S	elemento químico enxofre
CO ₂	dióxido de carbono
cm	centímetro (unidade de comprimento)
cm ²	centímetro quadrado (unidade de área)
mm	milímetro (unidade de comprimento)
μm	micrômetro (unidade de comprimento)
μm ²	micrômetro quadrado (unidade de área)
mL	mililitro (unidade de volume)
μL	microlitro (unidade de volume)
g	grama (unidade de massa)
bpp	bits por pixel (unidade de profundidade de cor)
kV	quilovolt (unidade de tensão elétrica)
%	porcentagem
%A	porcentagem atômica
Δ	variação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	63
2 REVISÃO DE LITERATURA	67
2.1 BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO	67
2.1.1 Fatores de crescimento	68
2.1.1.1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)	69
2.2 REPARO E REGENERAÇÃO ÓSSEA	71
2.3 DESMINERALIZAÇÃO TECIDUAL	72
2.3.1 Concentração do ácido cítrico	74
2.4 CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE E A DIFERENCIAÇÃO CELULAR	76
2.4.1 Composição química da superfície	77
2.4.2 Dimensões de células MC3T3-E1	79
3 PROPOSIÇÃO	83
4 MATERIAL E MÉTODOS	87
4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	87
4.2 DESMINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	90
4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CELULAR	90
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	90
4.3.1.1 Cultura de células	91
4.3.1.2 Coleta e preparo das amostras para MEV	92
4.3.1.3 Aquisição das imagens	93
4.3.1.4 Análise morfológica descritiva	94
4.3.1.5 Análise quantitativa – área de recobrimento da superfície	94
4.3.1.6 Análise quantitativa – espessura da camada de células	95
4.4 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE ÓSSEA	96
4.4.1 Microscopia Confocal – imunofluorescência	96
4.4.1.1 Aquisição das imagens	98
4.4.1.2 Análise quantitativa – área de expressão das BMPs nas superfícies das amostras	99
4.4.1.3 Análise quantitativa – intensidade de fluorescência das BMPs expressas nas superfícies das amostras	100
4.4.2 Microscopia Confocal – parâmetros de superfície	101
4.4.2.1 Análise quantitativa – Ra e Sa	103

4.4.2.2 Análise quantitativa – P-P e P-V	103
4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV / EDS)	104
5 RESULTADOS	109
5.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CELULAR	109
5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	109
5.1.1.1 Análise morfológica descritiva	109
5.1.1.2 Análise quantitativa – área de recobrimento da superfície	121
5.1.1.3 Análise quantitativa – espessura da camada de células	123
5.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE ÓSSEA	124
5.2.1 Microscopia Confocal – imunofluorescência	124
5.2.2 Microscopia Confocal – parâmetros de superfície	126
5.2.3 MEV / EDS – composição da superfície	130
6 DISCUSSÃO	135
7 CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS	149
ANEXO	165

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Um dos princípios básicos da regeneração tecidual é a capacidade de proliferação, migração, diferenciação e síntese de proteínas reguladas por fatores de crescimento polipeptídicos por células indiferenciadas no local da ferida (CAFFESSE; QUIÑONES, 1993; GRAVES; COCHRAN, 1994). O reparo ósseo é um fenômeno que se inicia pela ação local de células clásticas que utilizam substâncias ácidas para eliminar a fase mineral dos tecidos e expor seu conteúdo proteico, dando lugar à fase de deposição de novo tecido (HEATH et al., 1984; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003; LORENZO et al., 1992; POLSON; PROYE, 1983). Com base nesse princípio biológico, foi possível demonstrar que ácidos aplicados no osso, para remoção do conteúdo mineral, resultaram em matriz óssea desmineralizada (DBM), a qual abriga proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) capazes de induzirem a deposição de novo osso (URIST, 1965).

O uso de ácidos para desmineralizar tecidos duros é bastante antigo, tendo sido amplamente documentado em biomodificação de superfícies de dentina e cimento visando potencializar os processos reparativos em tratamentos de defeitos periodontais (SELVIG et al., 1981; BAL; EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992; PITARU et al., 1984b; SELVIG; HALS, 1977). O condicionamento ácido de superfícies radiculares tem sido defendido por proporcionar remoção da *smear layer* resultante da raspagem (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; BLOMLÖF et al., 2000; HERITIER, 1983), descontaminação da superfície (BAL; EREN; BALOS, 1990), liberação de fatores que atuam na cicatrização dos tecidos periodontais (POLSON; PROYE, 1983) e criação de um substrato que privilegia a seleção de células nos eventos de reparação (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; PITARU et al., 1984a; PITARU et al., 1984b).

Maior proliferação e diferenciação de osteoblastos foram observadas sobre dentina desmineralizada por tetraciclina hidrocloreada supersaturada (TCN) em parte devido ao aumento de rugosidade produzida pela ação do ácido (SCHWARTZ et al., 2000) e, também, pela composição de superfície (GUO et al., 2007). Na literatura recente, existe apenas um trabalho, pertencente a este grupo de pesquisa, que avaliou o crescimento e diferenciação de osteoblastos sobre superfície óssea recém-exposta e desmineralizada com ácido cítrico (REZENDE et al., 2015).

Resultados promissores com o emprego da desmineralização óssea superficial também foram relatados em cirurgias de enxerto ósseo autógeno em bloco em outros trabalhos deste mesmo grupo de pesquisa (REZENDE; DOMINGUES; SALMERON, 2014; REZENDE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012; DOMINGUES, 2013). Esses estudos objetivaram melhorar e antecipar a consolidação de enxertos previamente à instalação de implantes e diminuir sua taxa de reabsorção substituindo, com vantagens, outros métodos de tratamento da interface enxerto/leito receptor como exposição dos espaços medulares através de perfurações nas corticais do leito e/ou enxerto (ALBERIUS et al., 1996; BUSER et al., 1993) e remoção por desgaste da camada cortical do osso receptor (ALBERIUS; GORDH, 1998; CARVALHO; VASCONCELOS; PI, 2000).

Diferentes concentrações de ácido cítrico foram estudadas sobre dentina, sendo verificado comportamento celular mais favorável frente as concentrações mais baixas do ácido (FONTANARI et al., 2011; LAN et al., 1999; ROMPEN; GOFFINET; NUSGENS, 1999). Um estudo recente concluiu que a concentração de 10 % do ácido cítrico em pH 1 é superior à de 50 % quanto à adesão e proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano sobre raízes periodontalmente comprometidas, tratadas com esse agente desmineralizante (CABA-PAULINO, 2014).

Os subsídios para o embasamento biológico da desmineralização óssea, proporcionado pelas publicações citadas, sugeriram que modificações na topografia e composição da superfície teriam influenciado o comportamento de osteoblastos cultivados sobre as superfícies ósseas desmineralizadas. Assim, os objetivos deste estudo incluíram comparar o efeito de duas concentrações distintas de ácido cítrico, usadas para desmineralizar superfícies ósseas de calvária de ratos sobre as quais foram cultivadas células pré-osteoblásticas, e analisar parâmetros de superfície como composição química, exposição de BMPs e topografia após a desmineralização, comparando superfícies desmineralizadas a superfícies não desmineralizadas.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A regeneração óssea em Periodontia, Implantodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial constitui uma meta de pesquisa importante. A recuperação do tecido ósseo perdido envolve etapas complexas e princípios biológicos importantes ainda não totalmente esclarecidos. A seguir serão abordados temas de fundamental importância para elucidação dos mecanismos envolvidos no processo.

2.1 BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por uma matriz orgânica mineralizada que contém proteínas colágenas e não colágenas (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010) e por uma porção mineralizada, na qual íons cálcio (Ca) e fósforo (P) se arranjam na forma de hidroxiapatita (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010).

As células responsáveis pela formação do tecido ósseo são os osteoblastos. Os osteoblastos derivam de células-tronco mesenquimais multipotentes que originam as células progenitoras da linhagem osteoblástica, as quais podem se proliferar e amplificar antes de expressar marcadores osteoblásticos específicos identificados (HUGHES et al., 2006).

Os pré-osteoblastos são as primeiras células identificadas da linhagem osteoblástica diferenciada (HUGHES et al., 2006). Essas células mantêm a capacidade proliferativa, porém expressam muitas das proteínas associadas ao fenótipo do osteoblasto maduro (HUGHES et al., 2006). Os osteócitos são as células mais diferenciadas da linhagem osteoblástica e permanecem na matriz óssea por longos períodos (HUGHES et al., 2006).

Osteoblastos maduros ativos que sintetizam matriz óssea apresentam núcleo grande, complexo de Golgi aumentado e retículo endoplasmático extenso (CLARKE, 2008). Esses osteoblastos secretam colágeno tipo I e outras proteínas da matriz na superfície de formação óssea (CLARKE, 2008). As populações de

osteoblastos são heterogêneas com osteoblastos diferentes expressando repertório de genes diferentes, o que pode explicar a heterogeneidade da microarquitetura trabecular em diferentes locais do esqueleto, as diferenças anatômicas em locais específicos em determinadas enfermidades e a variação regional na habilidade dos osteoblastos em responder a agentes usados para tratar doenças ósseas (CLARKE, 2008).

Os osteoblastos, quando diferenciados, possuem capacidade de migração e proliferação. A presença de células mesenquimais indiferenciadas ou células osteoprogenitoras garante a formação óssea em um determinado local para o qual migram e se diferenciam em osteoblastos (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010) e esse processo está relacionado à liberação de fatores de crescimento osteoindutores e osteopromotores.

2.1.1 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que regulam importantes eventos celulares envolvidos na reparação do tecido por se ligarem a receptores de superfície específicos (GIANNOBILE, 1996).

Após alcançarem as células-alvo específicas, os fatores de crescimento induzem vias de sinalização intracelulares, as quais resultam na ativação de genes que mudam as atividades e os fenótipos celulares (ANUSAKSATHIEN; GIANNOBILE, 2002).

Os fatores de crescimento envolvidos no processo de diferenciação e desenvolvimento dos osteoblastos são: 1) proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs); 2) fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF); 3) fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF); e 4) fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Dentre eles, destacam-se as BMPs por sua expressão nos processos de formação e remodelação ósseas.

2.1.1.1 Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

As BMPs constituem uma grande família de citocinas pertencentes à super família do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), as quais têm uma variedade de funções durante o desenvolvimento de diferentes órgãos e sistemas (HOGAN, 1996). Desempenham um papel importante no padrão de formação e diferenciação celular, organogênese, homeostasia e regeneração dos tecidos (REDDI, 2005). Foram descobertas por sua marcada capacidade de induzir a formação de cartilagem e osso a partir de células mesenquimais não esqueléticas (URIST, 1965; URIST; STRATES, 1971), através da revisão da sequência completa de eventos que ocorrem durante a ossificação endocondral (HUGHES et al., 2006). Elas foram subsequentemente clonadas, sequenciadas e produzidas comercialmente (SAMPATH et al., 1992; WOZNEY et al., 1988). Na Odontologia, as BMPs têm se demonstrado como potentes fatores de crescimento estimuladores da formação óssea alveolar (RIOS et al., 2011).

Dentre suas várias funções, as BMPs induzem a formação de osso e de cartilagem pela estimulação de eventos celulares das células mesenquimais progenitoras (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010).

Várias BMPs foram investigadas quanto à sua habilidade em induzir a cicatrização óssea, principalmente as BMPs 2, 4 e 7 (SUTTAPREYASRI et al., 2006; LEONG; BRICKELL, 1996; WEI et al., 2007). Foi demonstrado que esses fatores promovem formação óssea ectópica em vários sistemas, assim como exercem papéis críticos no reparo de fraturas (STADLINGER et al., 2008b; SUTTAPREYASRI et al., 2006; WEI et al., 2007).

A capacidade osteoindutora da BMP-2 foi demonstrada em modelos pré-clínicos e clínicos. Foi verificado que, quando essa proteína, associada a um adenovírus, é adicionada às células-tronco mesenquimais e implantada em defeitos ósseos críticos em maxilas de porcos miniatura, há maior formação óssea do que em controles sem a BMP-2 (CHANG et al., 2003). Também quando empregada de forma injetável, com um carreador de fosfato de cálcio, a BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) acelerou a cicatrização óssea em ulna de coelhos e fêmur de ratos, até

mesmo com eficácia superior aos enxertos autógenos em algumas circunstâncias (LI et al., 2003; MATSUO et al., 2003).

Sabe-se que a BMP-4 tem a capacidade de promover a osteogênese (CHOI et al., 2010; ÇAKIR-ÖZKAN et al., 2011) e exerce um papel crucial no início do desenvolvimento do osso e da cartilagem, bem como no reparo de fraturas (LEONG; BRICKELL, 1996). Observou-se, em camundongos, que a expressão de BMP-4 é induzida pelo periósteo muito precocemente depois da fratura e é importante para a formação do calo cartilaginoso (GERSTENFELD et al., 2003; NAKASE et al., 1994; BOSTROM et al., 1995).

Stadlinger et al. (2008a;b) aplicaram sulfato de condroitina (CS), BMP-4 recombinante humana (rhBMP-4) e colágeno na superfície de implantes e verificaram que alta dose de BMP-4 (2 µg/implante) aplicada a um composto de CS/colágeno aumentou a formação óssea ao passo que uma dose baixa de BMP-4 (400 ng/implante) teve efeito deletério sobre a formação óssea. Mais tarde, Miyazaki et al. (2008) relataram que o sulfato de condroitina hipersulfatada (tipo E) se une à BMP-4 e aumenta a diferenciação de osteoblastos *in vitro*.

A BMP-7 ou proteína osteogênica-1 (OP-1) é reconhecida como modulador-chave da osteogênese e diferenciação de células ósseas. Para testar a hipótese de que a OP-1 age precocemente sobre células osteoprogenitoras para induzir a diferenciação condroblástica como possível explicação para a ossificação endocondral, Asahina, Sampath e Hauschka (1996) examinaram seu efeito sobre três células clonais de camundongos, incluindo MC3T3-E1, e analisaram marcadores de formação óssea por métodos imunohistoquímicos. Seus resultados confirmaram a hipótese inicial, uma vez que verificaram marcado aumento das características osteogênicas dessas células.

A ação da BMP-7 foi comprovada mais tarde por Chen et al. (2013) que adicionaram um vetor viral à BMP-7 para avaliar seu efeito sobre osteoblastos cultivados em superfícies de discos de titânio. Verificaram que, após 24 horas em cultura, os osteoblastos apresentaram atividade de fosfatase alcalina (ALP) mais alta.

A resultados semelhantes chegaram Hakki et al. (2014) ao avaliarem se as BMP-2, 6 e 7 regulariam a proliferação, mineralização e expressão de mRNA de tecido ósseo mineralizado por células-tronco do ligamento periodontal humano. A expressão gênica de colágeno tipo I, sialoproteína óssea, osteocalcina, osteopontina e fator de transcrição osteoblástica Runx2 foram avaliadas por RT-PCR. Seus resultados

comprovaram a hipótese para as BMPs estudadas que se mostraram potentes reguladores da expressão gênica e da biomineralização de células-tronco.

Atualmente, as BMPs 2 e 7 são aprovadas para aplicações clínicas (KAMIYA, 2012).

2.2 REPARO E REGENERAÇÃO ÓSSEA

O termo regeneração refere-se ao processo de cicatrização em que ocorre restauração completa do tecido do ponto de vista morfológico e funcional (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010). Quando a integridade funcional do tecido não é alcançada, ao invés da regeneração ocorre o processo de reparação, em que um tecido fibroso substitui o tecido original (LE; BASI; ABUBAKER, 2005).

A cicatrização do tecido ósseo pode ocorrer tanto por regeneração como por reparação, dependendo das características da lesão (GIANNOBILE; RIOS; LANG, 2010). Sendo assim, o foco das pesquisas tem sido direcionado em busca de tratamentos e terapias que levem o tecido ósseo lesado a seguir o processo de regeneração, mais satisfatório biologicamente.

Um dos princípios básicos da regeneração tecidual é a capacidade de proliferação, migração e diferenciação celulares e a síntese de proteínas reguladas por fatores de crescimento polipeptídicos no local da ferida (CAFFESSE; QUIÑONES, 2000; GRAVES; COCHRAN, 1994).

Sabe-se que o sucesso da regeneração óssea artificial depende fundamentalmente da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, uma vez que grande quantidade de células não diferenciadas ou diferenciadas de forma ineficiente podem comprometer a conformação desejada do novo osso formado (AÇIL et al., 2014).

O osso tem uma propensão inata a regenerar após sofrer injúrias traumáticas (GRAYSON et al., 2015). O organismo responde ao trauma iniciando uma cascata de eventos inflamatórios e regenerativos (GRAYSON et al., 2015). Essas ações incluem liberação local e sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de células do sistema imune para a região prejudicada, inflamação do tecido mole e edema, mobilização de células ósseas progenitoras, liberação local de BMPs,

remodelação óssea e eventual substituição óssea (GRAYSON et al., 2015). Apesar dessa capacidade intrínseca do tecido ósseo, permanecem as indicações clínicas que requerem intervenção para facilitar os processos de reparo e regeneração óssea (GRAYSON et al., 2015).

Resultados de revisões sistemáticas sobre o efeito da regeneração tecidual guiada (RTG), procedimentos de enxerto ou a aplicação de proteínas da matriz do esmalte com retalho cirúrgico convencional no tratamento de defeitos infraósseos profundos produziram melhoras clínicas mais favoráveis em relação aos parâmetros clínicos (ganho de inserção clínica, redução da bolsa e preenchimento ósseo) de reparação dos tecidos moles e duros quando comparados aos procedimentos com retalho cirúrgico convencional (TROMBELLI, 2005).

2.3 DESMINERALIZAÇÃO TECIDUAL

Historicamente, a desmineralização de tecidos duros tem sido associada a procedimentos que visam à regeneração de defeitos periodontais. Provavelmente, foi a intenção de mimetizar a natureza, produzindo superfícies sobre as quais células osteoprogenitoras possam migrar e sofrer diferenciação, passando a produzir tecido mineralizado, que motivou o desenvolvimento de métodos destinados a modificar quimicamente e fisicamente superfícies de raízes dentais expostas à doença periodontal, tornando-as receptivas à adesão celular e, conseqüentemente, melhorando a reparação dos tecidos periodontais.

O uso de ácidos em Periodontia data do século XIX. Em 1899, Stewart preconizou a utilização de ácido sulfúrico ou hidrocloreídrico na superfície radicular para eliminar bactérias de sítios periodontais e obteve sucesso considerável, permitindo o surgimento de vários estudos no campo da biomodificação de superfícies de dentina e cimento (SELVIG et al., 1981; BAL; EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992; PITARU et al., 1984a; PITARU et al., 1984b; SELVIG; HALS, 1977), visando potencializar os processos reparativos em tratamentos cirúrgicos periodontais.

Os ácidos têm sido aplicados nos processos de biomodificação de superfícies de dentina e cimento durante tratamentos de defeitos periodontais (BAL;

EREN; BALOS, 1990; HERITIER, 1983; LABAHN et al., 1992; PITARU et al., 1984a; SELVIG; HALS, 1977; SELVIG et al., 1981) para proporcionar a remoção da *smear layer* resultante da raspagem (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; BLOMLÖF et al., 2000; HERITIER, 1983), descontaminar a superfície (BAL; EREN; BALOS, 1990), liberar fatores de crescimento (POLSON; PROYE, 1983) e criar um substrato seletivo para células nos eventos de reparação (REGISTER, 1973; REGISTER; BURDICK, 1975; PITARU et al., 1984a; PITARU et al., 1984b).

A reparação dos tecidos duros (dentina e osso) inicia-se pela proliferação de células clásticas que utilizam substâncias ácidas para eliminar a fase mineral dos tecidos, expondo seu conteúdo proteico e iniciando, assim, a fase de deposição de novo tecido (HEATH et al., 1984; LEWANDROWSKI et al., 1997; LI; ZHANG; KIRSNER, 2003; LORENZO et al., 1992; POLSON; PROYE, 1983). Baseado neste princípio biológico, Urist (1965) foi o primeiro a demonstrar que a matriz óssea desmineralizada (DBM) induz o desenvolvimento de osso inclusive em áreas extraesqueléticas. O autor concluiu que a DBM e citocinas específicas dela isoladas, às quais denominou proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), induzem a formação de osso em áreas ectópicas.

Na remodelação óssea, a diferenciação e a função de osteoblastos e osteoclastos dependem da sua adesão ao osso (TEITELBAUM, 2000; TEITELBAUM; ROSS, 2003; DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000). Como resultados da reabsorção óssea, quimiocinas são liberadas e ativadas para recrutar células progenitoras mesenquimais enquanto colágeno tipo I e proteínas não colágenas são desmineralizados e tornam-se disponíveis para interagir com as células recrutadas (FENG, 2009). Como o colágeno tipo I está presente em abundância na matriz óssea, é provável que a interação integrina/colágeno tipo I desempenhe um papel predominante na interação entre osteoblastos e osso (FENG, 2009). Tem sido demonstrado que a desmineralização da dentina com ácido cítrico a 10 %, durante 15 segundos até 2 minutos, mantém intactas as moléculas de colágeno tipo I e de sulfato de condroitina em nível estrutural (HABELITZ et al., 2002; RUGGERI et al., 2007).

A desmineralização de superfícies ósseas expostas para receberem enxertos autógenos foi relatada pela primeira vez por Rezende et al. (2014) que, com base nos resultados favoráveis exaustivamente estudados em dentina, levantaram a hipótese de que a desmineralização das superfícies de contato entre enxertos ósseos em bloco e seu leito receptor favoreceria a incorporação do enxerto ao leito. Os

autores verificaram, em calvária de cobaias, que a consolidação e densidade do osso neoformado na interface enxerto/leito receptor foram significativamente maiores quando essa interface foi desmineralizada por 3 minutos com ácido cítrico pH 1 a 50 % do que em enxertos não desmineralizados. Foi sugerido que a desmineralização seria uma alternativa vantajosa sobre a perfuração e/ou desgaste do leito como métodos para melhorar a consolidação dos enxertos, por não apresentar risco de reabsorção e preservar a estrutura óssea já fragilizada pela reabsorção natural.

Adicionalmente, um estudo biomecânico demonstrou que o módulo de elasticidade da interface enxerto/leito receptor desmineralizada por ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) a 24 % durante 3 minutos é maior do que em amostras não desmineralizadas, sugerindo que inserção de implantes nesta interface pode ocorrer com menor risco de destacamento do enxerto (RODRIGUES et al., 2012).

2.3.1 Concentração do ácido cítrico

Devido à ausência de dados na literatura referentes a estudos envolvendo diferentes concentrações de ácido cítrico nos processos de desmineralização da superfície óssea, são apresentados aqui resultados de estudos realizados sobre raízes de dentes, os quais podem servir como base para elucidação dos efeitos do ácido em outros tecidos mineralizados.

Sterrett, Bankey e Murphy (1993) foram um dos primeiros a verificar diferentes concentrações de ácido cítrico sobre dentina radicular de dentes bovinos. Compararam as concentrações de 10 % em pH 1,95, 20 % em pH 1,77, 25 % em pH 1,62, 30 % em pH 1,55, 35 % em pH 1,46, 40 % em pH 1,37 e 65 % em pH 1,01 nos tempos de aplicação de 1, 2 e 3 minutos e observaram que existe uma concentração ideal do ácido cítrico que é de 25 % a 30 % com 2 a 3 minutos de aplicação. Concentrações acima dessas fazem com que haja diminuição da desmineralização da dentina.

Um dos fatores que interferem no potencial demineralizante do ácido cítrico é a quantidade de íons cálcio presente no tecido, uma vez que o ácido tem efeito quelante sobre esse mineral (HENNEQUIN; PAJOT; AVIGNANT, 1994). Sabe-se que o grau de desmineralização radicular depende do dente envolvido (STEINFORT;

DEBLAUWE; BEERTSEN, 1990) e do tempo de exposição da raiz ao ambiente oral (FONTANARI et al., 2011); e que altas concentrações do ácido cítrico expõem fosfoproteínas altamente fosforiladas, resultantes da exposição da matriz colágena da dentina, que podem induzir a formação de hidroxiapatita a partir de soluções de fosfato de cálcio (HENNEQUIN; PAJOT; AVIGNANT, 1994).

Reis et al. (2008) aplicaram ácido cítrico nas concentrações de 1 %, 5 % e 10 % sobre dentina radicular durante 15 a 300 segundos e observaram efeitos erosivos da superfície radicular em concentrações mais altas e maior tempo de aplicação do ácido. Verificaram que as concentrações mais baixas e com pH baixo foram mais efetivas do que as concentrações e pH altos, as quais causaram destruição da dentina intertubular.

Outra preocupação que envolve a questão da concentração do ácido cítrico é seu possível efeito nocivo aos tecidos pelo baixo pH e alto poder desmineralizante. Entretanto, Ruggeri et al. (2007) comprovaram que as características bioquímicas do colágeno e do sulfato de condroitina permaneceram preservados em fragmentos de dentina radicular exposta à doença periodontal quando desmineralizadas com ácido cítrico a 10 % por 2 minutos.

Em um estudo recente, Caba-Paulino (2014) comparou o efeito das concentrações de 10 % e 50 % do ácido cítrico aplicado durante variados períodos de tempo sobre superfícies radiculares expostas à doença periodontal, cultivando fibroblastos do ligamento periodontal humano sobre as raízes. A autora verificou que as células apresentaram-se mais espalhadas, achatadas e com menor definição de limites nos grupos tratados com ácido cítrico a 10 % durante 90 segundos do que nos de 50 % no mesmo tempo, cujas células apresentavam-se fusiformes e arredondadas.

Como muitas superfícies desmineralizadas com o ácido a 50 % apresentavam uma camada de reprecipitação, foi especulado que esse seria um fator negativo a sugerir que, em concentrações mais altas da solução ácida usada na desmineralização, podem ocorrer alterações nas superfícies radiculares que não são compatíveis com a inserção e diferenciação celular (FONTANARI et al., 2011; LAN et al., 1999, ROMPEN; GOFFINET; NUSGENS, 1999). A mesma camada de reprecipitação já havia antes sido observada por Amaral et al. (2011) sobre superfícies de dentina condicionadas com ácido fosfórico a 37 % durante 3 minutos, a qual foi atribuída a uma provável precipitação de sais de fosfato de cálcio decorrente da saturação gradativa do ácido durante esse longo tempo de desmineralização.

2.4 CARACTERÍSTICAS DA SUPERFÍCIE E A DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Existem evidências suficientes de que a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos são afetadas pela composição química e rugosidade da superfície de implantes (SCHWARTZ; BOYAN, 1994). Foi relatado por vários autores que células precursoras osteoblásticas sofrem diferenciação ao “reconhecerem” uma superfície como rugosa e sobre ela começam a depositar novo osso (SCHWARTZ; BOYAN, 1994; KIESWETTER et al., 1996; ONG et al., 1997; SCHWARTZ et al., 2000), de tal forma que, em uma superfície rugosa, se a altura máxima de um pico, ou a distância entre um pico e outro excede as dimensões da célula precursora osteogênica, esta célula a percebe como lisa e sobre ela migra, mas não se diferencia (BRUNETTE, 1986). É o que ocorre quando osteoclastos desmineralizam a superfície óssea e preenchem a lacuna de reabsorção com osteopontina (DODDS et al., 1995) e outras proteínas (EK-RYLANDER et al., 1994) que servem como sítios de inserção para células osteoprogenitoras, iniciando a deposição de novo osso (DODDS et al., 1995).

Com relação às características superficiais de biomateriais, são abundantes os estudos que descrevem o comportamento de osteoblastos e células pré-osteoblásticas em cultura sobre superfícies de variadas composições e texturas (GUÉRIN; AMBARD; SWIDER, 2009; PARETA et al., 2010). Esses estudos abordam, na sua maioria, superfícies metálicas de implantes e arcabouços para engenharia tecidual. Na literatura recente, não foram encontrados trabalhos envolvendo crescimento e diferenciação de osteoblastos sobre superfície óssea. Entretanto, parece que, sobre superfícies de rugosidade nanométrica, a morfologia celular se apresenta mais estrelada do que sobre as superfícies micrométricas (GUO et al., 2007).

A proliferação e diferenciação de osteoblastos sobre dentina desmineralizada por tetraciclina hidrocloreada supersaturada (TCN) por 3 minutos puderam ser observadas por Schwartz et al. (2000), em cujo estudo foi demonstrado que superfícies tratadas com TCN apresentavam valores de rugosidade superficial média (Ra) inferiores às produzidas naturalmente por osteoclastos de camundongos. As análises foram realizadas por meio de perfilometria por contato e não contato. A de não contato, a *laser*, registrou valores de Ra de 0,81 μm , 0,76 μm e 0,93 μm para

superfícies polidas, tratadas com TCN e reabsorvidas por osteoclastos, respectivamente. A distância entre picos em um perfil linear (Sm) foi de 13 μm , 15 μm e 14 μm para superfícies polidas, tratadas com TCN e reabsorvidas por osteoclastos, respectivamente. Entretanto, como a área de superfície desmineralizada artificialmente é mais uniforme e ampla, melhores resultados foram encontrados para essa superfície em relação à expressão de marcadores da formação óssea. Como consequência, o comportamento dos osteoblastos cultivados sobre uma cavidade de reabsorção osteoclástica foi semelhante ao manifestado após o tratamento com TCN. A desmineralização produziu maior diminuição na produção de osteocalcina e aumento na produção de TGF- β 1 e prostaglandina E2 (PGE2), o que pode ter sido responsável, em parte, pela promoção dos eventos precoces da maturação de osteoblastos. Sugeriram que resultados clínicos ótimos podem ser conseguidos com procedimentos que imitem a topografia física e química da superfície criada pela reabsorção osteoclástica normal.

Na literatura recente, existe apenas um trabalho sobre crescimento e diferenciação de osteoblastos sobre superfície óssea recém-exposta e desmineralizada com ácido cítrico (REZENDE et al., 2015). Os autores observaram que pré-osteoblastos cultivados sobre superfícies de osso fresco desmineralizado com ácido cítrico (50 %, pH 1) apresentaram modificações morfológicas que culminaram em maior recobrimento das superfícies pelo fato das células adquirirem uma forma mais plana e achatada, com mais prolongamentos citoplasmáticos do que células cultivadas em superfícies não desmineralizadas. Os melhores efeitos foram alcançados quando a desmineralização com ácido cítrico foi feita durante 15 e 30 segundos. Foi sugerido que tal comportamento possa ser atribuído a modificações na rugosidade e composição superficiais produzidas pela desmineralização óssea.

2.4.1 Composição química da superfície

De fato, a composição da superfície também exerce influência sobre o processo de diferenciação celular. Além dos elementos que compõem o tecido ósseo mineral, como Ca e P, e dos elementos presentes em todos os tecidos vivos, C e O, destacam-se o Mg e o S nos processos de remodelação óssea. O Mg é um dos

elementos conhecidos por desempenhar importante papel na formação óssea e afetar suas características minerais (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2011). Trata-se do quarto cátion mais abundante encontrado na matriz óssea extracelular (ROY; BANDYOPADHYAY; BOSE, 2011) e o segundo cátion intracelular mais abundante, exercendo várias funções celulares (WOLF; TRAPANI, 2008). Sua deficiência pode reduzir a densidade e a ductilidade ósseas e aumentar a chance de fraturas (RUDE; SINGER; GRUBER, 2009). Cerca de 67 % do Mg total do corpo está estocado no osso (MOE, 2008), sendo importante para a homeostasia e saúde ósseas (RUDE; SINGER; GRUBER, 2009). Este elemento é mitogênico para células ósseas e também afeta a formação de cristais (RUDE; SINGER; GRUBER, 2009).

Leidi et al. (2011) verificaram que altas concentrações de Mg inibiram significativamente a formação de matriz mineral por células SaOS-2, assim como inibiram também a atividade da ALP. Os autores levantaram a hipótese de que altos níveis de Mg devem ter alterado a concentração intracelular de vários cátions, entre os quais o Ca, por competir com os mesmos transportadores. Como o Mg é um antagonista do Ca, os autores sugeriram que altas concentrações de Mg podem ter alterado a taxa Ca/Mg, levando a uma desregulação das funções celulares. Essa interação foi observada por Weng e Webster (2012) os quais justificaram que, à medida que o Mg se degrada, os íons Mg liberados reagem com os íons Ca e fosfato do ambiente para gerar fosfato de cálcio contendo magnésio (XU et al., 2009). Segundo eles, o efeito combinado do Ca e do Mg acelera a deposição de fosfato de cálcio para induzir a mineralização óssea.

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Rezende et al., 2015), sobre composição de superfície após desmineralização de calvária de cobaias com ácido cítrico pH 1 a 50 %, observamos que o Mg começou a ser detectado somente depois de 30 segundos de desmineralização, aumentando significativamente até 90 segundos e permanecendo estável aos 180 segundos. Apresentamos como possível explicação para isso, a provável liberação de íons Mg que reagiram com íons Ca e fosfato para gerar fosfato de cálcio contendo magnésio.

O S é outro elemento importante a ser estudado, uma vez que compõe o sulfato de condroitina presente nas moléculas de colágeno tipo I, expostas nos processos de desmineralização (HABELITZ et al., 2002) e responsáveis pela adesão das células ósseas no local da reabsorção para deposição de novo osso.

Também no nosso estudo (Rezende et al., 2015), a detecção de S aumentou com o tempo de desmineralização até 90 segundos, declinando após 180 segundos, sugerindo que pode ter havido uma exposição inicial gradual de moléculas de colágeno tipo I contendo S na superfície desmineralizada. Argumentamos que, como essas moléculas que contêm S aumentam a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos *in vitro*, é provável que a reprecipitação de Ca produzida pela desmineralização possa ter tornado o S menos exposto após 90 segundos de desmineralização. Por essa razão, recomendamos que esse tempo de desmineralização seja preferido quando do emprego de desmineralização do osso com ácido cítrico.

2.4.2 Dimensões de células MC3T3-E1

As células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 foram primeiramente descritas em 1983 (SUDO et al., 1983), quando oito linhagens de células foram estabelecidas a partir da calvária de camundongos recém-nascidos. Foi selecionado um clone designado com base na alta atividade de ALP no estado de repouso e muito baixa no estado de crescimento, mas a atividade dessa enzima aumentou várias centenas de vezes depois que as culturas alcançaram confluência.

Embora pouca informação esteja disponível quanto às dimensões dessas células, trata-se de um dado essencial quando se pretende discutir o comportamento celular frente a diferentes tipos de superfícies. Por essa razão, o tamanho médio das células em estágios precoces de cultura e, preferencialmente, antes da semeadura foi medido nesta tese, em imagens de publicações consultadas. A Tabela 1 informa o diâmetro médio, mínimo e máximo de pré-osteoblastos MC3T3-E1 visualizados em micrografias de alguns autores que forneceram barra de escala nessas imagens. Imagens extraídas desses artigos são exibidas em seguida, para melhor visualização das dimensões celulares (Figura 1).

Tabela 1 – Tamanhos das células MC3T3-E1, em diferentes tempos de cultivo, verificados na literatura

AUTOR	TEMPO DE CULTIVO	DIÂMETRO MÉDIO (μm)	DIÂMETRO MÍNIMO (μm)	DIÂMETRO MÁXIMO (μm)
Sudo et al. (1983)	2 dias	$26,82 \pm 15,10$	9,15	47,56
	4 dias	$24,20 \pm 7,02$	16,27	34,73
Hule et al. (2008)	24 horas	$41,07 \pm 24,16$	10,96	80,44
Song e Mano (2013)	3 horas (vidro)	$39,67 \pm 15,76$	21,39	58,09
You et al. (2011)	72 horas	$34,99 \pm 14,28$	15,75	58,78

Figura 1 – Fotomicrografias de pré-osteoblastos MC3T3-E1 extraídas de: **A e B** – Sudo et al. (1983); **C** – You et al. (2011); **D** – Hule et al. (2008); **E e F** – Song e Mano (2013). **A a C**: microscópio invertido; **D a F**: microscópio confocal

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

A proposta deste estudo foi contribuir para a elucidação dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de desmineralização óssea que parecem favorecer o comportamento de pré-osteoblastos em cultura.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre superfícies desmineralizadas quanto à morfologia, área de recobrimento da superfície e número de camadas celulares e comparar com o comportamento dessas células sobre superfícies não desmineralizadas;
- 2) Caracterizar e avaliar a influência da superfície óssea desmineralizada sobre células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 por meio da expressão de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), parâmetros de rugosidade e composição química e comparar com superfícies não desmineralizadas;
- 3) Comparar duas concentrações do ácido cítrico (10 % e 50 %) na desmineralização óssea superficial em relação aos parâmetros estudados.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (processo nº 031/2012) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP) e envolveu três instituições de ensino. Tratou-se de um projeto desenvolvido em parceria com a Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FC/UNESP) e com a Faculdade de Odontologia da Universidade do Sul da Califórnia (Ostrow School of Dentistry/University of Southern California – USC).

4.1 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Trinta e cinco ratos isogênicos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando aproximadamente 500 g, criados e mantidos no Biotério Central da FOB/USP, foram submetidos à cirurgia para remoção de tecido ósseo. Amostras bicorticais foram retiradas da calvária dos animais, totalizando 70 amostras empregadas nos experimentos.

Os animais foram anestesiados na porção interna da coxa direita traseira por injeção intramuscular de 0,5 mL de uma associação de 0,25 mL de cloridrato de xilazina (Anasedan – Vetbrands, Jacareí/SP/Brasil) com 0,25 mL de cloridrato de ketamina (Dopalen – Vetbrands, Jacareí/SP/Brasil), utilizando seringa de insulina (25 UI de cada fármaco). Após a tricotomia, realizada com lâmina de barbear (Gillette – P&G do Brasil, São Paulo/SP/Brasil), a pele recebeu antissepsia com solução de digluconato de clorexidina a 2 % (Riohex – Rioquímica Indústria Farmacêutica, São Paulo/SP/Brasil) e a região foi coberta por campo cirúrgico fenestrado estéril descartável.

No tegumento da região frontoparietal foi realizada incisão reta de aproximadamente 1,0 cm com lâmina de bisturi nº 15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda, Barueri/SP/Brasil) até atingir o periósteo. A partir dessa incisão foram feitos cortes relaxantes com tesoura de ponta romba reta (Quinelato – Schobell Industrial

Ltda, Rio Claro/SP/Brasil) e o retalho total foi totalmente removido para facilitar o acesso e a remoção das amostras ósseas, expondo toda a cortical óssea da calvária.

Duas amostras ósseas bicorticais foram removidas de cada animal com o uso de broca trefina (Neodent, Curitiba/PR/Brasil) de 5,0 de diâmetro interno, em baixa rotação e sob irrigação constante com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9 % ou soro fisiológico estéril (JP Indústria Farmacêutica S.A, Ribeirão Preto/SP/Brasil). Em seguida, logo após a remoção das duas amostras, os animais foram mortos com overdose de anestésico. Todo o remanescente de perióstio foi removido da superfície cortical externa das amostras por raspagem suave com cinzel Ochsenbein nº 1 (Quinelato – Schobell Industrial Ltda, Rio Claro/SP/Brasil), tendo o cuidado para não riscar ou alterar a superfície óssea (Figura 2).

Figura 2 – Sequência de procedimentos cirúrgicos. **A)** Animal após anestesia e tricotomia da região da calvária. **B)** Incisão reta inicial de aproximadamente 1 cm feita com lâmina de bisturi nº 15. **C)** Corte relaxante realizado com tesoura de ponta romba reta para liberação do retalho. **D)** Acesso à calvária exposta após remoção completa do retalho total. **E)** Posicionamento da trefina na região anterior da calvária para a realização da primeira perfuração. **F)** Aspecto da calvária após a realização de ambas perfurações com as amostras ainda em posição. **G)** Aspecto da calvária após a retirada das amostras, sendo possível a visualização da dura-máter intacta. **H)** Cinzel removendo o remanescente de periósteo após a retirada do disco da calvária

4.2 DESMINERALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram desmineralizadas com solução de ácido cítrico pH 1 em duas concentrações diferentes, 10 % e 50 % (Bauru Fórmulas – Farmácia de Manipulação, Bauru/SP/Brasil). Para isso, foram utilizadas placas de cultura de 24 poços estéreis, onde as amostras foram colocadas uma por poço. Em seguida, foram adicionadas 5 gotas de ácido cítrico em cada poço contendo as amostras, o suficiente para imergi-las, durante 30 segundos (Rezende et al., 2015). Após essa desmineralização, as amostras foram lavadas com soro fisiológico estéril. Primeiro, foram mergulhadas em soro por 10 segundos em uma cuba de aço inoxidável e, em seguida, lavadas com 10 mL de soro utilizando uma seringa descartável estéril. Para secar, as amostras foram colocadas cuidadosamente sobre gases estéreis para absorver o soro sem tocar a superfície da cortical externa, manipulando-as somente pelas laterais com pinça clínica estéril.

O procedimento de desmineralização descrito foi realizado da mesma maneira para todas as amostras em todas as análises que serão descritas a seguir.

4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CELULAR

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Quarenta e cinco amostras foram distribuídas aleatoriamente ($n = 15$) em três grupos destinados à cultura de células para análise morfológica qualitativa e quantitativa, conforme descrito a seguir:

GRUPO C – amostras não desmineralizadas;

GRUPO AC.10 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 10 %;

GRUPO AC.50 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 50 %.

4.3.1.1 Cultura de células

Após a retirada das amostras, aquelas pertencentes aos grupos teste (AC.10 e AC.50) foram desmineralizadas. Em seguida, todas as amostras, incluindo as do grupo C foram transportadas em placas de cultura de 24 poços estéreis, em isopor com gelo, para o Centro Integrado de Pesquisas (CIP) da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP) para o plaqueamento das células.

As células utilizadas para o experimento foram pré-osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 (subclone 4 – CRL-2593) (ATCC, Manassas/Virginia/EUA) armazenados e estocados em nitrogênio líquido pela Disciplina de Bioquímica no Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em uma capela de fluxo laminar (Pachane) acoplada a um sugador Nevoni de alta potência.

As células foram descongeladas e expandidas previamente ao dia do experimento na passagem 15 (P15) e incubadas em frascos de 25 cm² (TPP – Biosystems, Curitiba/PR/Brasil) em ambiente úmido, a 37 °C, atmosfera contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono (CO₂). Após o subcultivo para frascos de 75 cm² (TPP – Biosystems, Curitiba/PR/Brasil), as células foram armazenadas em estufa até atingirem nova subconfluência observada ao microscópio invertido de fase DMIL (Leica – EUA).

Os pré-osteoblastos foram cultivados em meio de cultura α -MEM, com nucleosídeos, adicionado de 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução antibiótica e antimicótica. Quando as células atingiram a subconfluência, foram utilizadas para o plaqueamento na passagem 16 (P16).

Foram plaqueadas 10⁴ células em cima das amostras. Foi utilizada uma placa de 24 poços para cada período experimental de 24, 48 e 72 horas, onde as amostras foram organizadas da seguinte forma (Figura 3):

Linha A: **GRUPO AC.10** – 5 amostras do grupo AC.10 + células;

Linha B: **GRUPO AC.50** – 5 amostras do grupo AC.50 + células;

Linha C: **GRUPO C** – 5 amostras do grupo C + células.

Figura 3 – Disposição das amostras na placa de cultura de 24 poços para o plaqueamento das células MC3T3-E1

4.3.1.2 Coleta e preparo das amostras para MEV

Passados os períodos de cultura de 24, 48 e 72 horas, o meio de cultura foi aspirado dos poços e descartado. Em seguida, as amostras foram lavadas cuidadosamente com 1 mL de solução tampão salina (PBS), aspirado todo o conteúdo e descartado. Tal procedimento foi realizado duas vezes. As amostras foram, então, transferidas para novas placas de 24 poços estéreis. Iniciou-se o processo de preparação das amostras para análise no MEV segundo o protocolo preconizado (TANAKA; KITAJIMA, 2009). Em cada poço foi colocado 1 mL do fixador Karnovsky, deixando as amostras totalmente imersas. As placas foram fechadas, envoltas em papel alumínio e armazenadas em temperatura ambiente, em local limpo e seco por uma semana.

Após esse período, o fixador Karnovsky foi removido dos poços e as amostras foram lavadas em 1 mL de solução tampão cacodilato 0,05 M (Electron Microscopy Sciences – Hatfield/Pensilvânia/EUA), 3 vezes por 10 minutos cada uma, nas mesmas placas de cultura. Depois disso, as amostras foram transferidas para tampas de *ependorfs* de 2 mL onde receberam 150 μ L de tetróxido de ósmio (Sigma-Aldrich – St. Louis/Missouri/EUA), preparado de solução estoque a 2 % na concentração de 1:1 com solução tampão cacodilato 0,05 M, manipulados dentro da capela de fluxo. As tampas com as amostras foram cobertas por papel alumínio e assim permaneceram, na capela, por uma hora. As amostras foram, então,

transferidas para novas placas de 24 poços estéreis e lavadas com 1 mL de água destilada por 3 vezes de 10 minutos cada uma.

Iniciou-se a sequência de desidratação com acetona. As amostras foram imersas durante 10 minutos em 1 mL de acetona nas concentrações de 30 %, 50 %, 70 % e 90 %. Por último, receberam 3 banhos de 10 minutos com acetona a 100 %. As amostras foram transferidas para *stubs* identificados e permaneceram armazenadas em caixa plástica, com sílica, por 48 horas para secagem antes da metalização.

A metalização foi feita no metalizador Quorum Q150R ES (Quorum Technologies – Laughton/East Sussex/Inglaterra), na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FC/UNESP).

4.3.1.3 Aquisição das imagens

A aquisição das imagens foi realizada em um microscópio EVO LS15 (Zeiss – Alemanha) pertencente ao Laboratório Multiusuários de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física da FC/UNESP. O microscópio foi regulado em 10 kV com aumentos de 45 x, 100 x, 200 x, 400 x, 500 x, 1000 x, 2000 x e 3000 x. Cada amostra recebeu cinco campos de leitura (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia ilustrativa de uma amostra com identificação (em rosa) das regiões empregadas para as análises morfológica e quantitativa. (MEV)

4.3.1.4 Análise morfológica descritiva

A análise morfológica celular foi feita por um pesquisador calibrado e cego ao experimento a partir das imagens obtidas dos cinco campos com aumentos de 200 x e 500 x.

4.3.1.5 Análise quantitativa – área de recobrimento da superfície

Não foi considerada a quantidade de células sobre as superfícies dada à impossibilidade de individualização das células em algumas amostras. Assim, considerou-se apenas a área de recobrimento da superfície óssea pelas células cultivadas para a análise quantitativa. A área de recobrimento superficial foi medida três vezes com intervalo de uma semana entre as medições, nas imagens ampliadas em 200 x, utilizando o programa analisador de imagens (ImageJ 1.49m, National Institutes of Health (NIH) – Bethesda/Maryland/EUA) por um pesquisador calibrado e cego ao experimento (Figura 5). O valor dessa área foi subtraído do valor total da área da fotomicrografia no aumento de 200 x e transformado em porcentagem.

Figura 5 – Fotomicrografia ilustrativa do método de medição da área de recobrimento da superfície óssea onde se encontra demarcada em amarelo a área correspondente à área de cobertura celular da amostra. (MEV)

Para análise estatística foram considerados os valores médios das três medições realizadas para cada amostra. O programa utilizado foi SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha) e o teste estatístico empregado foi a análise de variância a dois critérios (Two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de 95 %.

4.3.1.6 Análise quantitativa – espessura da camada de células

A espessura da camada de células formada durante os períodos de cultura foi medida nas imagens obtidas com aumentos de 200 x e 500 x das amostras posicionadas obliquamente nos *stubs* (uma imagem por amostra) de forma a permitir a visualização das margens onde era possível a identificação da interface entre a camada de células (quando presente) e a superfície óssea das amostras.

A região medida por pesquisador cego ao experimento, no programa ImageJ, foi sempre a de maior espessura e foram feitas três medições de cada fotomicrografia com intervalos de uma semana entre elas (Figura 6). Os dados foram obtidos em micrometros (μm).

Figura 6 – Fotomicrografia ilustrativa do método de medição da espessura da camada de células MC3T3E-1 (linha amarela) sobre a superfície da amostra. **A)** Superfície onde as células foram cultivadas; **B)** Lateral do disco ósseo. (MEV)

Para análise estatística, o programa utilizado foi SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha). Para distribuição normal dos dados, adotou-se o teste de variância a dois critérios (Two-way ANOVA) e pós-teste de Tukey com nível de significância de 95 %. Para dados de distribuição não normal, adotou-se o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn com nível de significância de 95 %.

4.4 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE ÓSSEA

4.4.1 Microscopia Confocal – imunofluorescência

Quinze amostras foram distribuídas aleatoriamente em três grupos destinados à análise da expressão das BMPs na superfície óssea utilizando imunofluorescência no microscópio confocal, conforme descrito a seguir:

GRUPO C – 3 amostras não desmineralizadas;

GRUPO AC.10 – 6 amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 10 %, sendo 2 amostras para cada BMP;

GRUPO AC.50 – 6 amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 50%, sendo 2 amostras para cada BMP.

Imediatamente após sua obtenção, as amostras foram armazenadas em criotubos individualizados onde passaram por um procedimento denominado *snap freeze*, que congelou instantaneamente as amostras utilizando nitrogênio líquido, sendo depois, mantidas a -80 °C para o transporte para o Laboratório de Imunorregulação e Engenharia Tecidual (LITE – Laboratory for Immunoregulation & Tissue Engineering) da Faculdade de Odontologia da Universidade do Sul da Califórnia (Herman Ostrow School of Dentistry of University of Southern California – USC) como parte do doutorado sanduíche realizado no período de Julho a Dezembro de 2013.

Nesse laboratório, o protocolo adotado incluiu o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, dentro do próprio criotubo. As amostras foram, então, transferidas para tubos de microcentrifuga estéreis onde foram lavadas em 500

μL de PBS por três vezes, agitando o conteúdo com a pipeta. Em seguida, o PBS foi aspirado e as amostras, transferidas para placas de seis poços estéreis, uma amostra por poço. Nessas placas, foi realizado o bloqueio das proteínas não específicas com 100 μL de BSA 3 % (Bovine Serum Albumin – Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri/EUA) diluído em PBS sobre a superfície das amostras, de forma a impedir a presença de ar sobre elas. Após 1 hora em temperatura ambiente com a tampa da placa de seis poços fechada, o BSA foi aspirado e as amostras foram lavadas com 100 μL de PBS nas próprias placas. Após a lavagem, o conteúdo foi aspirado e as amostras foram colocadas em novas placas de seis poços estéreis, cada uma em um poço. Os anticorpos primários foram incubados de acordo com as especificações e diluições descritas na Tabela 2. Cada amostra recebeu um tipo de anticorpo primário de acordo com os grupos previamente descritos. Foram colocados 100 μL dos anticorpos sobre cada uma das amostras sem interposição de ar sobre a superfície. Em seguida, gases umedecidas em PBS foram colocadas sobre toda a superfície das placas, as tampas foram fechadas e as placas mantidas seladas com parafilme, *overnight* a 4 °C.

Tabela 2 – Especificações dos anticorpos primários, seus alvos e as respectivas diluições utilizadas nos experimentos

ALVO	ANTICORPO 1 ^{ário}	EMPRESA	DILUIÇÃO
BMP-2	Anti-BMP-2 (n-14): sc-6895	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas/Texas/EUA)	1:750 μL
BMP-4	Anti-BMP-4 (3H2.3): sc-12721	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas/Texas/EUA)	1:750 μL
BMP-7	Anti-BMP7 antibody ab56023	Abcam Inc. (Cambridge/Massachusetts/EUA)	1:400 μL

Após o *overnight*, os anticorpos primários foram aspirados e as amostras, transferidas para *ependorfs* onde foram lavadas com 500 μL de PBS por três vezes de 10 minutos agitando levemente com a pipeta. Novamente, o conteúdo foi aspirado e as amostras foram colocadas em novas placas estéreis de seis poços, cada uma em um poço. Os anticorpos secundários conjugados foram incubados de acordo com as especificações e diluições descritas na Tabela 3. Cada amostra recebeu um tipo de anticorpo secundário de acordo com os grupos previamente descritos. Foram colocados 100 μL dos anticorpos sobre cada uma das amostras sem interposição de

ar sobre a superfície em ambiente livre de luz. As tampas das placas foram fechadas, envoltas em papel alumínio e mantidas por 1 hora em temperatura ambiente.

Tabela 3 – Especificações dos anticorpos secundários, seus alvos, as respectivas diluições utilizadas nos experimentos e os corantes conjugados

ALVO	ANTICORPO 2ºário	EMPRESA	DILUIÇÃO	FLUORÓFORO
Anti-BMP- 2(n-14):sc- 6895	Mouse anti-goat IgG-TR: sc-3916	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas/Texas/EUA)	1:400 µL	Texas Red (vermelho)
Anti-BMP- 4(3H2.3):sc- 12721	Donkey F(ab') ₂ anti-mouse IgG H&L preadsorbed ab 150101	Abcam Inc. (Cambridge/Massachusetts/EUA)	1:200 µL	Alexa Fluor 488 (verde)
Anti-BMP7 antibody ab56023	Goat anti-rabbit IgG H&L preadsorbed ab 150078	Abcam Inc. (Cambridge/Massachusetts/EUA)	1:200 µL	Alexa Fluor 546 (amarelo)

Após uma hora, os anticorpos secundários conjugados foram aspirados e as amostras foram delicadamente lavadas com 100 µL de PBS por três vezes nas próprias placas. O conteúdo foi aspirado e as amostras foram transferidas para as placas descartáveis do microscópio confocal com a superfície a ser analisada voltada para baixo. Essas placas foram mantidas envoltas em papel alumínio até o momento das análises, realizadas imediatamente após o preparo das amostras.

4.4.1.1 Aquisição das imagens

As análises foram realizadas em Microscópio Confocal modelo Fluoview FV10i (Olympus – Waltham/Massachusetts/EUA) em *high quality* (x 16), 1024 x 1024, *confocal aperture* de 2,5 x e aumento de 10 x. Foram selecionados cinco campos para aquisição das imagens de acordo com a Figura 7.

Figura 7 – Esquema representativo dos campos de aquisição de imagens das amostras e as fotomicrografias de cada campo separadamente. (Microscopia confocal)

4.4.1.2 Análise quantitativa – área de expressão das BMPs nas superfícies das amostras

A área correspondente à expressão das BMPs nas imagens obtidas no microscópio confocal foi medida em μm^2 no programa analisador de imagens (ConfocalUniovi ImageJ 1.51, National Institutes of Health (NIH) – Bethesda/Maryland/EUA), selecionando as regiões marcadas pelos fluoróforos (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografia de uma amostra ilustrativa do método de avaliação da área correspondente à expressão de BMP-2 (vermelho contornado em azul) na superfície. (Microscopia confocal)

Para análise estatística dos dados da área de expressão foi utilizado o programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha), aplicando os testes de análise de variância a um critério (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal e Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para dados cujo teste de normalidade falhou, com nível de significância de 95 % para todos.

4.4.1.3 Análise quantitativa – intensidade de fluorescência das BMPs expressas nas superfícies das amostras

A intensidade de fluorescência foi medida no programa ConfocalUniovi ImageJ correspondendo à quantidade de bits por pixel das cores dos fluoróforos em cada imagem (8bits por pixel), em uma escala de intensidades variando de 0 a 255, gerando um histograma com a intensidade média de cada amostra (Figura 9).

Figura 9 – Histograma gerado pelo programa ConfocalUniovi ImageJ para intensidade de fluorescência de uma amostra

Para análise estatística dos dados de intensidade de fluorescência foi utilizado o programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha), aplicando os testes de análise de variância a um critério (One-way ANOVA) e pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal e Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para dados cujo teste de normalidade falhou, com nível de significância de 95 % para todos.

4.4.2 Microscopia Confocal – parâmetros de superfície

Dez amostras foram utilizadas para análise dos parâmetros de superfície rugosidade superficial média de uma linha (Ra), rugosidade superficial média de uma área (Sa), distância entre picos em uma linha (P-P) e distância entre picos e vales da mesma linha (P-V). Foram feitas aquisições de imagens em três dimensões (3D) com Microscópio Confocal (DCM 3D – Leica, Mannheim/Baden-Württemberg/Alemanha) no Laboratório de Materiais Avançados do Departamento de Física da FC/UNESP. As mesmas amostras foram avaliadas antes e depois da desmineralização com ácido cítrico, de forma a constituírem, cada uma, o seu próprio controle. Dessa forma, as amostras foram divididas em dois grupos (n = 5):

AC.10 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 10 %;

AC.50 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 50 %.

Para que fosse possível a análise exatamente da mesma área antes e depois da desmineralização, um esquema de marcações foi elaborado para esse fim. Após a retirada das amostras da calvária dos animais, um gabarito feito com filme radiográfico, na forma de trapézio, foi posicionado no centro da superfície das amostras e a forma desenhada com lâmina de bisturi nº 15. Essa figura geométrica permitiu a identificação do posicionamento da amostra no microscópio antes e depois da desmineralização. Com a mesma lâmina, também foi demarcado o centro de cada linha paralela do trapézio para servirem como referência na identificação de três regiões selecionadas para avaliação dos parâmetros de superfície (Figura 10).

Figura 10 – A) Esquema representativo das dimensões do trapézio sobreposto à amostra. **B)** Regiões selecionadas para análise (1, 2 e 3)

As imagens foram capturadas com lente de 20 x de aumento e a área de medição de cada região correspondeu a $636,61 \times 477,25 \mu\text{m}^2$ com varreduras a cada $250 \mu\text{m}$ (Figura 11).

Figura 11 – Janela gerada pelo programa computadorizado do microscópio confocal referente aos parâmetros de superfície

4.4.2.1 Análise quantitativa – Ra e Sa

O Ra foi avaliado em uma linha de 636,61 μm de comprimento e o Sa, em uma área correspondente a 303.822,12 μm^2 em todas as amostras. Os dados foram gerados automaticamente pelo programa do microscópio confocal (Figura 11).

Para análise estatística desses dados foram considerados os valores médios de Ra e Sa por meio do programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha). Na análise intragrupos (antes e depois da desmineralização) foi empregado o teste t pareado com nível de significância de 95 %. Para comparação das diferenças intergrupos foi empregado o teste t de *Student* com nível de significância de 95 %.

4.4.2.2 Análise quantitativa – P-P e P-V

As distâncias entre os picos (P-P) e entre picos e vales (P-V) foram medidas no programa ImageJ, em μm , nos gráficos de todas as amostras gerados pelo microscópio confocal (Figura 12).

Figura 12 – Gráfico ilustrativo gerado pelo programa computadorizado do microscópio confocal referente aos parâmetros de superfície no qual foram medidas as distâncias entre picos (vermelho) e entre picos e vales (azul)

Para análise estatística desses dados foram considerados os valores médios de P-P e P-V por meio do programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha). Na análise intragrupos (antes e depois da

desmineralização) foi empregado o teste t pareado com nível de significância de 95 %. Para comparação das diferenças intergrupos foi empregado o teste t de *Student* com nível de significância de 95 %.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura / Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV / EDS)

As mesmas 10 amostras utilizadas para análise dos parâmetros de superfície foram submetidas à análise de composição da superfície. Os dados referentes à presença dos elementos químicos foram capturados pelo MEV/EDS no Laboratório Multiusuários de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física da FC/UNESP. As amostras foram analisadas antes e depois da desmineralização, sendo cada amostra seu próprio controle. Dessa forma, as amostras foram divididas em dois grupos ($n = 5$):

AC.10 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 10 %;

AC.50 – amostras desmineralizadas com ácido cítrico a 50 %.

Por se tratarem das mesmas amostras, as marcações feitas para o confocal estavam presentes e ajudaram na aquisição dos dados com o MEV/EDS. As análises foram feitas com lente de 50 x de aumento e 15 kV de tensão em três regiões de cada amostra (Figura 13).

Figura 13 – Fotomicrografias ilustrativas do método de aquisição dos dados de composição da superfície nas quais são identificadas as regiões de análise (em rosa) antes e depois da desmineralização

As porcentagens atômicas (%A) dos elementos carbono (C), oxigênio (O), magnésio (Mg), fósforo (P), enxofre (S) e cálcio (Ca) foram utilizadas para análise estatística.

Para análise estatística desses dados foram considerados os valores médios da %A por meio do programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha). Na análise intragrupos (antes e depois da desmineralização) foi empregado o teste t pareado com nível de significância de 95 %. Para comparação das diferenças intergrupos foi empregado o teste t de *Student* com nível de significância de 95 %.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO CELULAR

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.1.1.1 Análise morfológica descritiva

As amostras do grupo C, após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos, apresentaram superfície parcialmente recoberta. Essas células apresentaram aparência arredondada, na maioria das vezes, e aglomeradas em determinadas regiões, com poucos prolongamentos citoplasmáticos filamentosos, sem conexões com outras células (Figura 14).

Figura 14 – Fotomicrografias de duas amostras do grupo C após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1). **A)** Presença de uma célula exibindo prolongamentos citoplasmáticos (seta amarela) (aumento 200 x). **B)** Célula com aspecto arredondado (setas amarelas) e ausência de filamentos citoplasmáticos (aumento 500 x). (MEV)

Essa aparência se repetiu às 48 horas, com a diferença de que as células espalharam-se de forma mais difusa sobre a superfície das amostras, apresentando filopodia mais acentuada em algumas delas (Figura 15).

Figura 15 – Fotomicrografia da periferia de uma amostra do grupo C após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) onde se observa a presença de uma camada celular com a sobreposição de uma célula mais achatada do que as vistas na Figura 14, exibindo prolongamentos citoplasmáticos mais evidentes (setas amarelas) (aumento 200 x). (MEV)

Após 72 horas, a morfologia celular manteve o mesmo padrão visto às 48 horas (Figura 16).

Figura 16 – Fotomicrografias de amostras do grupo C após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1). **A)** Células superpostas a camadas subjacentes mantendo ainda a morfologia de bordas arredondadas (setas amarelas) (aumento 500 x). **B)** Camada de células superpostas com morfologia achatada e com discretos prolongamentos citoplasmáticos (setas amarelas) (aumento 1000 x). (MEV)

As amostras do grupo AC.10, após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos, apresentaram superfície totalmente recoberta por células bastante distribuídas. Essas células apresentaram aspecto mais achatado e estrelado, com prolongamentos citoplasmáticos filamentosos mais pronunciados e evidentes, iniciando conexões entre as células, sendo raros os espaços entre elas (Figura 17).

Figura 17 – Fotomicrografias das superfícies das amostras do grupo AC.10 após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1). **A)** Presença de uma célula com núcleo evidente (seta rosa) com aspecto achatado e estrelado exibindo prolongamentos citoplasmáticos mais definidos (setas amarelas) (aumento 500 x). **B)** Célula iniciando o processo de filopodia com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos ainda curtos e sem conexão com outras células (setas amarelas) (aumento 500 x). **C)** Superposição de camadas celulares de morfologia achatada e pouca definição de bordas estabelecendo conexões através de uma rede de filamentos citoplasmáticos (aumento 500 x). (MEV)

Às 48 horas, as células do grupo AC.10 apresentaram morfologia em estágio mais avançado de diferenciação, com aparência mais achatada e estrelada, superpostas em camadas com prolongamentos citoplasmáticos que se comunicavam ao longo de toda a superfície, sem espaços entre as células (Figura 18).

Figura 18 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.10 após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) em que se nota a presença de células superpostas em camadas com aspecto achatado e extensas filopodias intercomunicantes (aumento 200 x). (MEV)

Após 72 horas, as características morfológicas celulares foram as mesmas do período de 48 horas para o grupo AC.10, porém, a superposição de múltiplas camadas tornou difícil a individualização celular (Figura 19).

Figura 19 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.10 após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1), onde se observa uma camada celular múltipla de difícil individualização e com inúmeras conexões mantidas pelos prolongamentos citoplasmáticos formando uma rede de filopodia (aumento 200 x). (MEV)

De modo geral, as amostras do grupo AC.50 apresentaram comportamento celular semelhante as do grupo AC.10. Após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos, a superfície apresentou-se totalmente recoberta por células. Essas células apresentavam aspecto achatado, estrelado, com prolongamentos citoplasmáticos filamentosos pronunciados e evidentes, iniciando conexões entre as células, sendo raros os espaços entre elas (Figura 20).

Figura 20 – Fotomicrografias das superfícies das amostras do grupo AC.50 após 24 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1). **A)** Presença de células superpostas em camadas com aspecto achatado e estrelado exibindo prolongamentos citoplasmáticos definidos (setas amarelas) (aumento 500 x). **B)** Rede celular estabelecida ao redor de um canal de Volkmann (seta amarela) (aumento 500 x). **C)** Ampliação de **B** onde se observa, em espessura, a múltipla camada celular ao redor do canal (seta amarela) (aumento 1000 x). (MEV)

Após 48 horas, as características celulares eram muito semelhantes das vistas às 24 horas, com morfologia ainda mais diferenciada, aparência mais achatada e estrelada e os prolongamentos citoplasmáticos se comunicavam ao longo de toda a superfície, sem espaços entre as células (Figura 21).

Figura 21 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.50 após 48 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) onde múltiplas camadas celulares são vistas com morfologia achatada e estrelada sem bordas definidas e cobrindo toda a superfície (aumento 500 x). (MEV)

Às 72 horas, as características morfológicas celulares foram as mesmas do período de 48 horas (Figura 22).

Figura 22 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo AC.50 após 72 horas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) demonstrando a presença de múltipla camada celular com características morfológicas de estágios avançados de diferenciação, sem definição de limites celulares (aumento 500 x). (MEV)

5.1.1.2 Análise quantitativa – área de recobrimento da superfície

As amostras dos grupos AC.10 e AC.50 apresentaram 100 % de recobrimento superficial em todos os períodos de avaliação. Esses dois grupos foram diferentes estatisticamente do grupo C às 24 horas ($p < 0,001$), o qual apresentou apenas 23,53 % de recobrimento. Às 48 horas e às 72 horas de cultura celular, os grupos experimentais não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Na avaliação intragrupo, o grupo C apresentou diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os resultados de 24 horas com os de 48 horas e de 24 horas com 72 horas ($p < 0,001$). A Tabela 4 apresenta os dados referentes a esta análise. A Figura 23 exemplifica o comportamento de cada grupo.

Figura 23 – Fotomicrografias das superfícies ósseas em cultura de pré-osteoblastos (MC3T3-E1) de amostras representativas dos grupos experimentais relativos à área de recobrimento. (MEV)

Tabela 4 – Porcentagem média da área de recobrimento da superfície óssea entre os grupos de estudo de acordo com o período experimental

PERÍODO/GRUPO	C	AC.10	AC.50
24 horas	23,53 % $\pm$ 25,44 ^a	100 % $\pm$ 0,00 ^b	100 % $\pm$ 0,00 ^b
48 horas	86,67 % $\pm$ 20,18 ^b	100 % $\pm$ 0,00 ^b	100 % $\pm$ 0,00 ^b
72 horas	100 % $\pm$ 0,00 ^b	100 % $\pm$ 0,00 ^b	100 % $\pm$ 0,00 ^b

Letras iguais significam ausência de diferença estatística na mesma linha

5.1.1.3 Análise quantitativa – espessura da camada de células

Como não houve distribuição normal dos dados, foram considerados os valores medianos de espessura para análise estatística. Não houve diferença estatisticamente significativa na análise intragrupos, referentes aos períodos de cultura ($p > 0,05$). Apenas o grupo AC.50 apresentou diferença significativa em relação ao grupo C nos períodos de 48 horas ($p = 0,0419$) e 72 horas ($p = 0,0137$). A Figura 24 exemplifica as camadas de células e a Tabela 5 apresenta os dados referentes à análise da espessura da camada.

Figura 24 – Fotomicrografia de uma amostra representativa do grupo AC.10 de 72 horas demonstrando a presença de múltiplas camadas de células na região da borda da amostra (seta amarela) (aumento 200 x). (MEV)

Tabela 5 – Valores de mediana e intervalos da espessura da camada de células entre os grupos de estudo de acordo com o período experimental

PERÍODO \ GRUPO	C (μm)	AC.10 (μm)	AC.50 (μm)
24 horas	16,59 (0 – 41,06)	52,54 (0 – 170,40)	69,00 (54,48 – 149,80)
48 horas	30,26 * (0 – 86,10)	62,17 (36,06 – 159,50)	175,40 * (90,93 – 238,10)
72 horas	0 * (0 – 52,22)	118,10 (40,22 – 211,80)	178,30 * (70,97 – 272,50)

* na mesma linha significa diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

5.2 ANÁLISE DA SUPERFÍCIE ÓSSEA

5.2.1 Microscopia Confocal – imunofluorescência

As áreas de superfície correspondentes à expressão das BMPs são apresentadas na Tabela 6. Não foi verificada distribuição normal dos dados, razão pela qual foram empregados os valores referentes às medianas para a análise estatística. Houve maior área de expressão da BMP-2 nos grupos teste do que no grupo controle ($p = 0,0020$). A área de expressão da BMP-4 foi significativamente maior no grupo AC.10 do que nos demais grupos ($p = 0,0017$), não havendo significância na comparação entre AC.50 e C. A comparação entre as áreas de expressão da BMP-7 foi significativa entre os grupos teste e controle ($p = 0,0048$).

Tabela 6 – Valores de mediana e intervalos da área correspondente à expressão de BMPs nas superfícies ósseas dos grupos de estudo

GRUPO BMPs	C (μm^2)	AC.10 (μm^2)	AC.50 (μm^2)
BMP-2	154,42 ^a (121,87 – 321,16)	2987,30 ^b (917,33 – 5128,07)	1696,17 ^b (730,95 – 6803,42)
BMP-4	780,93 ^a (135,36 – 1824,24)	4610,58 ^b (1647,23 – 22586,42) ^b	618,49 ^{ac} (165,56 – 1610,79)
BMP-7	780,93 ^a (716,37 – 1284,89)	5923,57 ^b (2588,51 – 9523,12)	7968,56 ^b (1659,73 – 29828,20)

Letras iguais na mesma linha significam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$)

A análise da intensidade de fluorescência relativa à expressão das BMPs não demonstrou distribuição normal dos dados apenas para a BMP-7 (valores das medianas apresentados). Para as demais, são apresentados os valores médios de intensidade de fluorescência (Tabela 7). Foi verificada maior intensidade de fluorescência para os grupos teste do que para o controle para todas as BMPs avaliadas. Para a BMP-2 houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e o controle ($p < 0,0001$). Para a BMP-4 somente houve diferença estatística entre AC.10 e C ($p = 0,0063$). Para a BMP-7 os grupos teste foram estatisticamente diferentes do grupo C ($p = 0,0019$). Imagens de imunofluorescência à microscopia confocal representativas dos grupos são fornecidas pela Figura 25.

Tabela 7 – Valores de mediana e intervalos da intensidade de fluorescência correspondente à expressão de BMPs nas superfícies ósseas dos grupos de estudo

GRUPO BMPs	C	AC.10	AC.50
BMP-2	19,50 $\pm$ 26,39 ^a	74,78 $\pm$ 27,50 ^b	59,09 $\pm$ 16,38 ^b
BMP-4	21,06 $\pm$ 28,30 ^a	64,66 $\pm$ 20,19 ^b	52,44 $\pm$ 35,43 ^{ab}
BMP-7	0 ^a (0 – 439,40)	110,67 ^b (75,02 – 164,57)	107,70 ^b (60,15 – 155,26)

Letras iguais na mesma linha significam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$)

Figura 25 – Fotomicrografias de amostras representativas dos grupos experimentais quanto à expressão de BMPs na superfície óssea. (Microscopia Confocal)

5.2.2 Microscopia Confocal – parâmetros de superfície

Os grupos AC.10 e AC.50 não apresentaram diferença estatisticamente significativa na avaliação intragrupo antes e depois da desmineralização para os parâmetros Ra (AC.10 – $p = 0,5745$; AC.50 – $p = 0,2958$) e Sa (AC.10 – $p = 0,6064$; AC.50 – $p = 0,2817$). Também não houve diferença na avaliação intergrupo dos parâmetros $\neq$ Ra ($p = 0,2292$) e $\neq$ Sa ($p = 0,7967$). A distância entre picos diminuiu significativamente após a desmineralização no grupo AC.10 ($p = 0,0004$) e no grupo AC.50 ($p = 0,0278$). Essa diferença foi maior para o grupo AC.10 do que para o grupo

AC.50 ($p = 0,0252$). A distância entre picos e vales diminuiu significativamente nos grupos AC.10 ($p = 0,0004$) e AC.50 ($p = 0,0278$), mas a comparação entre as diferenças intergrupos não foi significativa ($p = 0,8007$). Dados apresentados na Tabela 8 e nas Figuras 26 e 27.

Tabela 8 – Parâmetros médios de superfície obtidos antes e depois da desmineralização com ácido cítrico a 10% (AC.10) e 50% (AC.50)

Parâmetros \ Grupos	AC.10			AC.50		
	Antes	Depois	Δ	Antes	Depois	Δ
Ra (μm)	7,34 $\pm$ 3,20	7,08 $\pm$ 3,39	0,26 $\pm$ 0,73	4,37 $\pm$ 2,03	4,57 $\pm$ 1,93	-0,20 $\pm$ 0,29
Sa (μm^2)	9,25 $\pm$ 2,91	9,76 $\pm$ 5,79	-0,50 $\pm$ 2,25	5,51 $\pm$ 1,56	5,92 $\pm$ 1,73	-0,23 $\pm$ 0,59
P-P (μm)	59,70 $\pm$ 24,89 ^a	29,37 $\pm$ 8,62 ^b	-30,40 $\pm$ 6,49 *	38,64 $\pm$ 15,18 ^a	28,00 $\pm$ 8,69 ^b	-12,37 $\pm$ 4,00 *
P-V (μm)	48,85 $\pm$ 16,45 ^a	24,57 $\pm$ 10,36 ^b	-24,28 $\pm$ 5,28	38,64 $\pm$ 15,18 ^a	28,00 $\pm$ 8,69 ^b	-22,55 $\pm$ 4,29

* diferença estatisticamente significativa intergrupos

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatisticamente significativa intragrupos

Ra – rugosidade superficial média da linha

Sa – rugosidade superficial média da área

P-P – distância entre picos

P-V – distância entre picos e vales

Δ – aumento médio (valores positivos) ou diminuição média (valores negativos) dos parâmetros de superfície na avaliação intragrupos

Figura 26 – Fotomicrografias de uma amostra representativa do grupo AC.10 em que se observa a mesma superfície óssea antes e depois da desmineralização. A escala de cores representa a variação de topografia (vermelho = mais alto; azul = mais baixo. Nota-se uma evidente regularização da superfície, com diminuição da altura dos picos. (Microscopia Confocal)

Figura 27 – Fotomicrografias de uma amostra representativa do grupo AC.50 em que se observa a mesma superfície óssea antes e depois da desmineralização. A escala de cores representa a variação de topografia (vermelho = mais alto; azul = mais baixo. Nota-se uma evidente regularização da superfície, com diminuição da altura dos picos. (Microscopia Confocal)

5.2.3 MEV / EDS – composição da superfície

A porcentagem atômica dos elementos Mg e S diminuiu significativamente nos grupos AC.10 ($p = 0,0007$ e $p = 0,0006$, respectivamente) e AC. 50 ($p < 0,0001$ e $p = 0,0001$, respectivamente) depois da desmineralização. Os conteúdos de P e Ca diminuíram significativamente depois da desmineralização apenas no grupo AC.50 ($p = 0,0364$ e $p = 0,0007$, respectivamente). O conteúdo de P diminuiu em ambos os grupos após a desmineralização e a comparação intergrupos dessa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,0141$). Os valores médios de %A são apresentados na Tabela 9 e representados na figura 28.

Tabela 9 – Porcentagem atômica média dos elementos selecionados para análise de composição da superfície (EDS) antes e depois da desmineralização com ácido cítrico a 10% (AC.10) e 50% (AC.50)

Elementos	AC.10			AC.50		
	Antes (%A)	Depois (%A)	Δ	Antes (%A)	Depois (%A)	Δ
C	58,98 $\pm$ 5,35	58,95 $\pm$ 6,52	0,02 $\pm$ 1,68	58,87 $\pm$ 2,60	59,74 $\pm$ 5,47	-2,73 $\pm$ 2,70
O	34,28 $\pm$ 3,12	35,04 $\pm$ 3,68	-0,76 $\pm$ 1,35	35,32 $\pm$ 2,23	35,84 $\pm$ 3,65	1,25 $\pm$ 2,99
Mg	0,13 $\pm$ 0,06 ^a	0,08 $\pm$ 0,06 ^b	0,04 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,04 ^a	0,07 $\pm$ 0,06 ^b	0,05 $\pm$ 0,04
P	2,66 $\pm$ 1,08	2,52 $\pm$ 1,12	-0,01 $\pm$ 0,32 *	2,36 $\pm$ 0,72 ^a	1,99 $\pm$ 0,98 ^b	0,49 $\pm$ 0,17 *
S	0,13 $\pm$ 0,04 ^a	0,10 $\pm$ 0,05 ^b	0,03 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02 ^a	0,09 $\pm$ 0,04 ^b	0,02 $\pm$ 0,05
Ca	3,81 $\pm$ 1,60	3,30 $\pm$ 1,62	0,51 $\pm$ 0,48	3,19 $\pm$ 1,16 ^a	2,27 $\pm$ 1,45 ^b	0,91 $\pm$ 0,53

* diferença estatisticamente significativa intergrupos

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatisticamente significativa intragrupos

Δ – aumento médio (valores positivos) ou diminuição média (valores negativos) dos parâmetros de superfície na avaliação intragrupos

Figura 28 – Gráficos da composição da superfície óssea dos grupos AC.10 (A) e AC.50 (B) antes e depois da desmineralização

Discussão

6 DISCUSSÃO

Este estudo comprovou que a desmineralização superficial do osso fresco promove a proliferação de células MC3T3-E1 com indução de fenótipo compatível com estágios avançados de diferenciação e é o primeiro a analisar características de uma mesma superfície de osso fresco antes e depois da desmineralização, com o objetivo de encontrar subsídios para explicar, ao menos em parte, o comportamento celular verificado nesta e em outras investigações prévias.

O povoamento precoce por células osteoblásticas de superfícies ósseas a serem regeneradas é de fundamental importância no reparo de feridas e representa a base dos procedimentos de regeneração óssea guiada (BUSER et al., 1990). Nesta tese, o recobrimento por células das superfícies ósseas desmineralizadas foi significativamente maior do que nas superfícies não desmineralizadas no período mais precoce de avaliação (24 horas), independentemente da concentração da solução ácida empregada. Atribuiu-se essa observação à morfologia celular mais espalhada e achatada com prolongamentos citoplasmáticos mais alongados conectando uma célula à outra, deixando poucos (e às vezes inexistentes) espaços entre as células nos grupos teste em comparação ao grupo controle. Por outro lado, as células presentes nas superfícies não desmineralizadas, após 24 horas em cultura, permaneceram menores, com morfologia mais arredondada, com poucos prolongamentos citoplasmáticos e distribuição difusa e, às vezes, focal sobre as superfícies. O mesmo comportamento celular foi relatado em outros estudos que cultivaram pré-osteoblastos em superfícies desmineralizadas e não desmineralizadas de osso (REZENDE et al., 2015) e de dentina (SCHWARTZ et al., 2000), os quais também concluíram que a desmineralização produz características superficiais favoráveis à proliferação e diferenciação celular.

As filopodias celulares podem ser comparadas a antenas ou tentáculos que as células usam para reconhecer o microambiente e estão implicadas em vários processos fisiológicos como a migração celular durante a cicatrização de feridas (MATILLA; LAPPALAINEN, 2008). Desta forma, as células mudam constantemente seu fenótipo em resposta ao microambiente por meio de suas integrinas de membrana as quais processam a informação extracelular e se ligam a proteínas existentes na superfície (fibronectina no caso do osso) para estabelecer sítios de adesão (SIEBERS

et al., 2005; GARCÍA, 2005). Após essa ligação com a superfície, as integrinas formam aglomerados e associam-se com os citoesqueletos para formar adesões focais (GEIGER et al., 2001). Nesta tese, como as células cultivadas sobre superfícies desmineralizadas apresentavam maior quantidade de filopodias em relação às não desmineralizadas, pode-se inferir que as células dos grupos teste encontraram superfícies mais favoráveis para sua adesão. Consequentemente, devido ao povoamento celular precoce e intenso sobre as superfícies desmineralizadas, não foi de se surpreender que a espessura das camadas celulares nelas formadas tenha sido também maior nos grupos teste do que no controle, principalmente às 48 e 72 horas.

Está bem estabelecido que a matriz óssea desmineralizada apresenta difusibilidade de BMPs e de outras citocinas que causam quimiotaxia e indução para que células estromais dos tecidos adjacentes se diferenciem em osteoblastos (URIST et al., 1970; REDDI; WIENTROUB; MUTHUKUMARAN, 1987; URIST; DELANGE; FINERMAN, 1983; WANG; GLIMCHER, 1999). Entre as famílias de BMPs, as BMP-2, BMP-4 e BMP-7 possuem papel chave durante o recrutamento e diferenciação osteoblástica e são os únicos tipos de fatores de crescimento e diferenciação que podem induzir isoladamente a nova formação de osso *in vitro* e em sítios heterotópicos *in vivo* (SAMPATH et al., 1992). Por essa razão, foram eleitas para estudo nesta tese.

A BMP-2 promove a maturação de osteoblastos humanos pelo aumento da expressão de fatores de transcrição e da expressão gênica de marcadores da diferenciação de osteoblastos (HOGAN, 1996). A área de expressão e intensidade de fluorescência da BMP-2, neste estudo, foi maior em superfícies ósseas desmineralizadas do que em não desmineralizadas, sem diferença estatística entre as duas concentrações estudadas do ácido cítrico. Um estudo recente demonstrou que, quando adicionada a substratos de titânio, a BMP-2 aumentou significativamente a proliferação de células osteoblásticas MG-63, com aumento da atividade de fosfatase alcalina e da deposição de cálcio, confirmando sua ação na diferenciação precoce e tardia respectivamente. A expressão gênica para osteocalcina e osteopontina foi também maior em substratos contendo BMP-2 (KIM et al., 2014). Esses achados somados aos resultados aqui expostos podem contribuir para explicar o fenótipo celular compatível com diferenciação encontrado nesta tese.

A área de expressão da BMP-4 foi maior no grupo AC.10 do que nos demais grupos, assim como aconteceu com a intensidade de fluorescência. Esta, porém, não diferiu significativamente do grupo AC.50, que, por sua vez, não diferiu do

grupo controle. Vários estudos demonstraram que a BMP-4 está presente intrinsecamente em sítios de ossificação *in vivo* e que deve ser suficiente para a osteogênese local (WANG; CLARK; BRIGHTON, 2006; UENO et al., 2003; SOJO et al., 2005; MCCULLOUGH et al., 2007; TAKEUCHI et al., 2009). Foi também demonstrado que células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 expressam BMP-4 continuamente (WANG; CLARK; BRIGHTON, 2006; SUZAWA et al., 1999). Supõe-se, portanto, que a presença abundante dessa proteína intrínseca tenha, de certa forma, se superposto à exposição adicional promovida por ação do ácido, tornando inconclusivos os resultados aqui apresentados para essa BMP.

A BMP-7 aumenta fortemente as características osteogênicas de células osteoblásticas, agindo nos estágios precoces de diferenciação tanto de linhagens celulares precursoras ósseas (ASAHINA; SAMPATH; HAUSCHKA, 1996), como de células tronco do ligamento periodontal. Nesta tese, a área de expressão e intensidade de fluorescência para a BMP-7 foi significativamente maior nos grupos desmineralizados do que no controle, o que também pode contribuir para explicar o comportamento celular sobre as superfícies das amostras dos grupos AC.10 e AC.50, principalmente no período de avaliação mais precoce.

Sabe-se que a ancoragem, proliferação e diferenciação de osteoblastos são sensíveis à composição química e rugosidade de superfície de implantes de qualquer material (SCHWARTZ; BOYAN, 1994; WEBB; HLADY; TRESCO, 2000), provavelmente porque, com o aumento da área de superfície, há maior quantidade de fibronectina disponível proporcionando mais sinalização para a adesão de células, que se espalham mais facilmente e interagem umas com as outras através de seu citoesqueleto (PEARSON et al., 1988; WEISS; REDDI, 1981). Além disso, osteoblastos exibem maior proliferação e atividade mais intensa de marcadores ósseos sobre superfícies rugosas do que em superfícies lisas (HATANO et al., 1999).

A linhagem de pré-osteoblastos MC3T3-E1 usada neste estudo é sensível a alterações de superfície, sendo que topografias rugosas promovem a maturação e diminuem a distância de migração dessas células (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; SAN MIGUEL et al., 2010). A rugosidade média (Ra) resultante após a desmineralização com ácido cítrico a 10 % foi de $7,08 \pm 3,39 \mu\text{m}$ e de $4,57 \pm 1,93 \mu\text{m}$, após desmineralização com ácido cítrico a 50 %. Quando se levou em consideração o parâmetro Sa (que analisa a rugosidade de uma área), foram encontrados valores muito próximos aos de Ra para os grupos AC.10 e AC.50 ($9,76 \pm 5,79 \mu\text{m}$ e $5,92 \pm$

1,73 μm , respectivamente). Em um estudo em que células MG63 foram cultivadas em superfícies com $R_a > 3 \mu\text{m}$, sua resposta à 1,25-dihidroxitamina D_3 foi aumentada, assim como o foi a produção de TGF- $\beta 1$ e PGE2 (SCHWARTZ et al., 2000). Por outro lado, estudos *in vitro* (KIESWETTER et al., 1996; MARTIN et al., 1995) e *in vivo* (BUSER et al., 1991; COCHRAN et al., 1996) sugeriram que, ao menos para implantes dentários, uma superfície com R_a variando entre 3 a 4 μm proporciona um excelente substrato para o crescimento de osteoblastos. Esses dados divergem dos aqui apresentados, embora nenhum outro estudo foi encontrado analisando rugosidade superficial óssea que permitisse comparação confiável.

Schwartz et al. (2000) verificaram que lacunas de reabsorção deixadas em dentina por osteoclastos de camundongo apresentavam R_a de 0,93 μm e sugeriram que os estudos que buscam procedimentos para melhorar as características de superfície de um determinado substrato para o crescimento celular deveriam procurar mimetizar a natureza, produzindo superfícies semelhantes em rugosidade às deixadas pelos osteoclastos. Os resultados aqui obtidos apresentam valores muito maiores para R_a e S_a do que o proposto por Schwartz et al. (2000), embora essa comparação deva ser feita com cautela já que os autores usaram perfilometria por contato e, nesta tese, foi empregada microscopia confocal a *laser*.

Os parâmetros de rugosidade R_a e S_a , todavia, podem não representar o método mais adequado de avaliação das características superficiais em relação ao comportamento celular sobre essas superfícies, já que correspondem à média aritmética dos valores absolutos das ordenadas de afastamento dos pontos do perfil de rugosidade em relação à linha média, dentro do percurso de medição (linha para R_a e área para S_a). É aceito que existe um limite para o efeito estimulatório da rugosidade de superfície sobre a diferenciação de osteoblastos de forma que, se a altura de um pico ou a distância entre dois picos excede a dimensão da célula, esta perceberá a superfície como lisa (BRUNETTE, 1986).

Pelo acima exposto, a medida entre dois picos consecutivos e da distância entre picos e vales do perfil de superfícies das amostras pareceu-nos constituírem parâmetros mais confiáveis para interpretar o comportamento celular sobre essas superfícies. Assim, levando-se em conta o diâmetro celular médio encontrado na literatura para células medidas antes do plaqueamento, verificou-se uma variabilidade entre $26,82 \mu\text{m} \pm 15,10$ a $41,07 \mu\text{m} \pm 24,16$ entre os autores (HULE et al., 2008; SONG; MANO, 2013; SUDO et al., 1983; YOU et al., 2011). Neste estudo, a distância

média entre picos foi de $29,37 \mu\text{m} \pm 8,62$ e $28,00 \mu\text{m} \pm 8,69$ para os grupos AC.10 e AC.50, respectivamente depois da desmineralização. A distância média entre picos e vales foi de $24,57 \mu\text{m} \pm 10,36$ e $28,00 \mu\text{m} \pm 8,69$ para os grupos AC.10 e AC.50, respectivamente depois da desmineralização. Esses valores são, portanto, compatíveis com o reconhecimento das superfícies pelas células como rugosas por encontrarem-se aproximadamente dentro do perímetro celular, o que inibiria sua migração, mas favoreceria sua diferenciação, conforme já discutido. Schwartz et al. (2000) obtiveram valores bem mais baixos de distância entre picos em superfícies desmineralizadas com tetraciclina e por atividade osteoclástica respectivamente, mas em superfícies de dentina e não de osso.

Deve-se ressaltar, ainda, que existe a possibilidade de que as células plaqueadas neste estudo já tivessem diâmetro maior do que os publicados pelos autores supracitados, pois atingiram subconfluência por volta do 10º ao 12º dia, ao passo que as imagens de células analisadas em outras publicações eram de 3 horas a 4 dias. Infelizmente, a ausência de um microscópio invertido com recursos para captura de imagem com barra de escala nos laboratórios da FOB/USP, até o momento da realização desta tese, não permitiu medir o tamanho das células MC3T3-E1 aqui empregadas, deficiência esta que poderá ser compensada em estudos futuros.

Não ficou evidenciado que a concentração do ácido tenha interferido de forma significativa nos resultados. Os dados publicados já existentes são sobre superfícies de dentina desmineralizada como parte do procedimento de biomodificação radicular em tratamentos periodontais regenerativos, mas podem servir, em parte, como parâmetro para interpretação do efeito da concentração do ácido cítrico sobre outros tecidos mineralizados.

Por exemplo, foi verificado que na concentração de 50 % do ácido cítrico sobre raízes dentais humanas, com diferentes níveis de mineralização, ocorre precipitação de citrato de cálcio e de sais de fosfato nas superfícies o que, de certa forma, anulou o efeito da desmineralização, porque teria sido induzida a formação de hidroxiapatita sobre as superfícies, o que não ocorreu em concentrações mais baixas (HENNEQUIN; PAJOT; AVIAGNANT, 1994). De fato, uma camada de reprecipitação também foi observada em outros estudos (CABA-PAULINO, 2014; AMARAL et al., 2011) que verificaram interferência de concentrações mais altas do ácido cítrico na formação de sobreposição de camadas de fibroblastos cultivados sobre superfícies de dentina, demonstrando que o ácido cítrico a 10 % resultou em um substrato mais

favorável ao crescimento e espalhamento celular do que a concentração de 50 %. É importante ressaltar também que o procedimento de desmineralização de dentina com ácido cítrico a 10 % preserva as características bioquímicas do colágeno e do sulfato de condroitina (RUGGERI et al., 2007) mas, em contrapartida, foi verificada destruição da estrutura do colágeno exposto por ácido cítrico em concentrações muito baixas (entre 0,5 % e 2 %) e por tempos muito longos como 3 minutos (CAVASSIM et al., 2012). Entretanto, foi demonstrado que a desmineralização de dentina com ácido cítrico até 2 minutos mantém intactas as moléculas de colágeno tipo I e de sulfato de condroitina em nível ultraestrutural (RUGGERI et al., 2007; FEIST et al., 2003).

O colágeno é um elemento indispensável no tecido ósseo. Estudos mostraram que o colágeno combinado com BMPs podem evitar a difusão rápida dessas proteínas. Portanto, sua concentração local deve permanecer alta o suficiente durante um período relativamente longo de tempo para exercer efeitos osseointdutores e promover mais formação óssea na superfície do implante (BESSHO et al., 1999; MURATA et al., 1999). Neste aspecto, um dos métodos que proporcionam evidência indireta da exposição de colágeno em uma superfície é o MEV/EDS, pela avaliação da detecção de S. Em estudo prévio do nosso grupo, empregando ácido cítrico a 50 % sobre superfície de osso fresco (REZENDE et al., 2015), a detecção de S aumentou significativamente com o tempo de desmineralização até 90 segundos, declinando aos 180 segundos, sugerindo que pode ter havido uma exposição gradual de moléculas contendo S, como colágeno tipo I, na superfície desmineralizada. Vários estudos confirmaram que moléculas sulfatadas como glicosaminoglicanas sulfatadas presentes na matriz óssea melhoram a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos *in vitro* (DOUGLAS et al., 2007; DOUGLAS et al., 2008; BIERBAUM et al., 2006; NAGAHATA et al., 2004; NURCOMBE; COOL, 2007). Entretanto, neste estudo, a %A de S diminuiu significativamente após a desmineralização nos dois grupos teste, sem diferença significativa entre eles e não foi encontrada base biológica para explicar esse evento, já que nos grupos desmineralizados houve melhor comportamento celular. Poder-se-ia especular que, com a reprecipitação do Ca, moléculas contendo enxofre pudessem ficar menos expostas após a desmineralização (REZENDE et al., 2015), mas não foi o que ocorreu neste estudo, já que houve significativa redução na %A de Ca em ambos os grupos teste.

Osteoblastos são células sensíveis à composição iônica e à cristalinidade da superfície (HAMBLETON et al., 1994) e, por esta razão, a análise dos elementos

químicos expostos pela desmineralização foi considerada importante para discutir seus efeitos, muito embora a presença ou ausência de certos elementos não seja uma referência definitivamente conclusiva. Por exemplo, a não interferência da desmineralização no conteúdo de C e O, pode ser interpretada apenas como uma neutralidade de ação do ácido em moléculas contendo esses íons, existentes em todo e qualquer tecido vivo. Da mesma forma, o conteúdo de P antes e depois da desmineralização deve ser analisado com cautela, já que esse elemento compõe numerosas moléculas que fazem parte da estrutura do tecido ósseo, desmineralizado ou não (REZENDE et al., 2015). Como visto, o conteúdo de P diminuiu em ambos os grupos, mas a diferença intragrupo foi significativa apenas no grupo AC.50, podendo representar um possível efeito da concentração do ácido na exposição desse íon.

O Mg é mitogênico para células ósseas e também afeta a formação de cristais (RUDE; SINGER; GRUBER, 2009). Osteoblastos interagem com o Mg aumentando seus receptores integrina para aumentar a adesão celular e a formação óssea (ZREIGAT et al., 2002). Neste estudo, a %A de Mg diminuiu significativamente depois da desmineralização em ambos os grupos teste, em contraste parcial a um estudo prévio realizado por nosso grupo nas mesmas condições desta tese (REZENDE et al., 2015), no qual esse elemento começou a ser detectado a partir dos 30 segundos de desmineralização óssea com ácido cítrico a 50 %. No estudo citado, levantamos, como possível explicação para o evento, que os íons Mg liberados pela desmineralização teriam reagido com o Ca e com o fosfato de cálcio formados, gerando moléculas de fosfato de cálcio contendo Mg (ZREIGAT et al., 2002). Como o Mg age como cofator na síntese de proteínas e enzimas, possui um efeito regenerativo sobre a fosfatase alcalina que é transportada das células para a matriz óssea (BONUCCI; SILVESTRINI; BIANCO, 1992). Por outro lado, o excesso de Mg extracelular inibe a atividade de mineralização óssea de células osteoblásticas SaOS-2 e bloqueia a diferenciação como detectado pela medição da atividade da ALP (LEIDI et al., 2011).

Concluindo, a desmineralização de superfícies ósseas parece contribuir para antecipar os eventos biológicos que resultam na deposição de novo osso, fenômeno esse de interesse para os procedimentos regenerativos ósseos nas áreas de Periodontia, Implantodontia, Cirurgia Bucomaxilofacial e Ortopedia. Estudos em desenvolvimento na Disciplina de Periodontia do Departamento de Prótese da FOB/USP estão empregando estas e outras metodologias para estudar os efeitos do

ácido cítrico e da tetraciclina ácida em diferentes protocolos de desmineralização quanto ao comportamento e atividade de diferentes tipos celulares sobre superfícies ósseas, quanto ao reparo de defeitos críticos e de defeitos periodontais e quanto aos transcritos para MMP-2 e MMP-9, OPN, BSP, ANKH, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e Runx-2 por meio de qPCR.

Espera-se, assim, consolidar esta nova linha de pesquisa e levantar outras hipóteses para estudos futuros que venham a contribuir para o entendimento da biologia do reparo ósseo.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

De posse dos dados colhidos pela metodologia estabelecida e dentro das limitações discutidas, foi possível concluir que:

- A morfologia das células MC3T3-E1 cultivadas sobre superfícies ósseas desmineralizadas por ácido cítrico nas concentrações de 10 % e 50 % apresenta características que sugerem estágios mais avançados de diferenciação do que as cultivadas sobre superfícies não desmineralizadas;
- A desmineralização nas duas concentrações de ácido cítrico promoveu maior recobrimento das superfícies ósseas pelas células cultivadas e maior espessura de camadas de células em comparação a superfícies não desmineralizadas;
- As variações na composição atômica superficial após a desmineralização com ambas as concentrações do ácido cítrico não permitem concluir a respeito da influência desse parâmetro nas características superficiais e, conseqüentemente, sobre o comportamento celular;
- A maior expressão e intensidade de fluorescência das BMPs 2 e 7 em superfícies ósseas desmineralizadas são congruentes com as observações de morfologia e proliferação celular, mas os resultados apresentados para a BMP-4 não foram conclusivos, sugerindo que a desmineralização não influencia de forma significativa a expressão dessa BMP;
- Os parâmetros de superfície Ra e Sa não parecem representar o melhor método para avaliação topográfica para diferenciação celular, mas os valores encontrados para os parâmetros P-P e P-V mostram que as superfícies resultantes após a desmineralização são favoráveis à adesão e à manifestação de fenótipos compatíveis com diferenciação celular.

- A concentração do ácido cítrico, embora não tenha apresentado diferenças estatisticamente significantes para a maioria das análises, pareceu ter influência positiva nos resultados para o uso do ácido cítrico 10 %, pH 1.

Referências

REFERÊNCIAS

- Alberius P, Gordh M. Osteopontin and bone sialoprotein distribution at the bone graft recipient site. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124(12):1382-6.
- Alberius P, Gordh M, Lindberg L, Johnell O. Influence of surrounding soft tissues on onlay bone graft incorporation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82(1):22-33.
- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 – Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont.* 2004;17(5):536-43.
- Amaral NG, Rezende ML, Hirata F, Rodrigues MG, Sant’Ana AC, Gregghi SL, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(5):469-75.
- Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(2):129-39.
- Asahina I, Sampath TK, Hauschka PV. Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res.* 1996;222(1):38–47.
- Açil Y, Ghoniem AA, Wiltfang J, Gierloff M. Optimizing the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells by the synergistic action of growth factors. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(8):2002-9.
- Bal B, Eren K, Balos K. Effects of various root surface treatments on initial clot formation: a scanning electron microscope study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1990;32(4):281-93.
- Bessho K, Carnes DL, Cavin R, Chen H, Ong JL. BMP stimulation of bone response adjacent to titanium implants in vivo. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(3):212-8.
- Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, Scharnweber D, Tippelt S, Monsees TK, et al. Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res.* 2006;77(3):551-62.

Blomlöf L, Bergman E, Forsgårdh A, Foss L, Larsson A, Sjöberg B, et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2000;20(6):560-5.

Bonucci E, Silvestrini G, Bianco P. Extracellular alkaline phosphatase activity in mineralizing matrices of cartilage and bone: ultrastructural localization using a cerium-based method. *Histochemistry*. 1992;97(4):323-7.

Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, et al. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res*. 1995;13(3):357-67.

Brunette DM. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp Cell Res*. 1986;167(1):203-17.

Buser D, Brägger U, Lang NP, Nyman S. Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1(1):22-32.

Buser D, Dula K, Belser V, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13(1):29-45.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*. 1991;25(7):889-902.

Caba-Paulino CE. Efeito do protocolo de desmineralização por ácido cítrico na área de superfície radicular recoberta por fibroblastos do ligamento periodontal humano. Estudo à microscopia eletrônica de varredura [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2014.

Caffesse RG, Quiñones CR. Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000*. 1993;1:69-9.

Carvalho PS, Vasconcelos LW, Pi J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 e 15(4):565-70.

Cavassim R, Letie FR, Zandim DL, Dantas AA, Rached RS, Sampaio JE. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(3):376-83.

Chang SC, Chuang HL, Chen YR, Chen JK, Chung HY, Lu YL, et al. Ex vivo gene therapy in autologous bone marrow stromal stem cells for tissue-engineered maxillofacial bone regeneration. *Gene Ther.* 2003;10(24):2013-9.

Chen S, Yang J, Wang H, Chao Y, Zhang C, Shen J, et al. Adenovirus encoding BMP-7 immobilized on titanium surface exhibits local delivery ability and regulates osteoblast differentiation in vitro. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1225-31.

Choi YJ, Lee JY, Park JH, Park JB, Suh JS, Choi YS. The identification of a heparin binding domain peptide from bone morphogenetic protein-4 and its role on osteogenesis. *Biomaterials.* 2010;31(28):7226-38.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):S131-9.

Cochran DL, Numikoski PV, Higgenbottom FL, Hermann JS, Makins SR, Buser D. Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clin Oral Implants Res.* 1996;7(3):240-52.

Çakır-Özkan N, Eyibilen A, Özkan F, Gülbahar MY, Kabak YB. Immunohistochemical analysis of reconstructed sheep mandibles: transport distraction osteogenesis versus autogenous bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(4):1248-54.

Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, et al. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res.* 1995;10(11):1666-80.

Domingues RS. Efeito da desmineralização ácida da interface enxerto-leito na consolidação de enxertos ósseos autógenos em bloco [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo e 2013.

Douglas T, Heinemann S, Hempel U, Mietrach C, Knieb C, Bierbaum S, et al. Characterization of collagen II fibrils containing biglycan and their effect as a coating on osteoblast adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(4):1653-60.

Douglas T, Hempel U, Mietrach C, Heinemann S, Scharnweber D, Worch H. Fibrils of different collagen types containing immobilized proteoglycans (PGs) as coatings: characterization and influence on osteoblast behavior. *Biomol Eng.* 2007;24(5):455-8.

Ducy P, Schinke T, Karsenty. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000;289(5484):1501-4.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 1994;269(21):14853-6.

Feist IS, De Micheli G, Carneiro SR, Eduardo CP, Miyagi S, Marques MM. Adhesion and growth of cultured human gingival fibroblasts on periodontally involved root surfaces treated by Er:YAG laser. *J Periodontol.* 2003;74(9):1368-75.

Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):189-96.

Fontanari LA, Pinto SC, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi Ede P, Sampaio JE. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. *Braz Dent J.* 2011;22(6):479-85.

García AJ. Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials.* 2005;26(36):7525-9.

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(11):793-805.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.

Giannobile WV. Periodontal Tissue Engineering by Growth Factors. *Bone.* 1996;19(1):23S-37S.

Giannobile WV, Rios HF, Lang NP. O Tecido Ósseo. In: Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA; 2010. p. 83-95.

Graves DT, Cochran DL. Periodontal regeneration with polypeptide growth factors. *Curr Opin Periodontol*. 1994;178-86.

Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;6:epub ahead of print.

Guérin G, Ambard D, Swider P. Cells, growth factors and bioactive surface properties in a mechanobiological model of implant healing. *J Biomech*. 2009;42(15):2555-61.

Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO₂ grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2007;28(36):5418-25.

Habelitz S, Balooch M, Marshall SJ, Balooch G, Marshall Jr GW. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. *J Struct Biol*. 2002;138(3):227-36.

Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, et al. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(1):119-30.

Hambleton JC, Schwartz Z, Khare A, Windeler SW, Luna M, Brooks BP, et al. Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J Orthop Res*. 1994;12(4):542-52.

Hatano K, Inoue H, Kojo T, Matsunaga T, Tsujisawa T, Uchiyama, et al. Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone*. 1999;25(4):439-45.

Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta*. 1984;802(1):151-4.

Hennequin M, Pajot J, Avignant D. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin. *J Endod*. 1994;20(11):551-4.

Heritier M. Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric acid application on human root dentin. *J Periodontol*. 1983;54(9):515-21.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*. 1996;6(4):432-8.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000*. 2006;41:48-72.

Hule RA, Nagarkar RP, Altunbas A, Ramay HR, Branco MC, Schneider JP, et al. Correlations between structure, material properties and bioproperties in self-assembled beta-hairpin peptide hydrogels. *Faraday Discuss*. 2008;139:251-64.

Kamiya N. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(2):153-63.

Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD, et al. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res*. 1996;32(1):55-63.

Kim SE, Kim CS, Yun YP, Yang DH, Park K, Kim SE, et al. Improving osteoblast functions and bone formation upon BMP-2 immobilization on titanium modified with heparin. *Carbohydr Polym*. 2014;114:123-32.

Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol*. 1992;63(4):303-9.

Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J*. 1999;44(2):123-30.

Le AD, Basi DL, Abubaker AO. Wound Healing: Findings of the 2005 AAOMS Research Summit. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005;63:1426-35.

- Leidi M, Deller F, Mariotti M, Maier JA. High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro. *Magnes Res*. 2011;24(1):1-6.
- Leong LM, Brickell PM. Bone morphogenic protein-4. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996;28(12):1293-6.
- Lewandrowski K, Tomford WW, Michaud NA, Schomacker KT, Deutsch TF. An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. *Calcif Tissue Int*. 1997;61(4):294-7.
- Li RH, Bouxsein ML, Blake CA, D'Augusta D, Kim H, Li, XJ, et al. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res*. 2003;21(6):997-1004.
- Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*. 2003;60(1):107-14.
- Lorenzo JA, Pilbeam CC, Kalinowski JF, Hibbs MS. Production of both 92- and 72-kDa gelatinases by bone cells. *Matrix*. 1992;12(4):282-90.
- Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res*. 1995;29(3):389-401.
- Matsuo T, Sugita T, Kubo T, Yasunaga Y, Ochi M, Murakami T. Injectable magnetic liposomes as a novel carrier of recombinant human BMP-2 for bone formation in a rat bone-defect model. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(4):747-54.
- Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):446-54.
- McCullough KA, Waits CA, Garimella R, Tague SE, Sipe JB, Anderson HC. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation. *J Orthop Res*. 2007;25(4):465-72.
- Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki, O. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *J Cell Physiol*. 2008;217(3):769-77.

Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*. 2008;35(2):215-37.

Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999;28(3):232-7.

Nagahata M, Tsuchiya T, Ishiguro T, Matsuda N, Nakatsuchi Y, Teramoto A, et al. A novel function of N-cadherin and Connexin43: marked enhancement of alkaline phosphatase activity in rat calvarial osteoblast exposed to sulfated hyaluronan. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(3):603-11.

Nakase T, Nomura S, Yoshikawa H, Hashimoto J, Hirota S, Kitamura Y et al. Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 1994;9(5):651-9.

Nurcombe V, Cool SM. Heparan sulfate control of proliferation and differentiation in the stem cell niche. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp*. 2007;17(2):159-71.

Ong JL, Carnes DL, Cardenas HL, Cavin R. Surface roughness of titanium on bone morphogenetic protein-2 treated osteoblast cells in vitro. *Implant Dent*. 1997;6(1):19-24.

Pareta RA, Reising AB, Miller T, Storey D, Webster TJ. An understanding of enhanced osteoblast adhesion on various nanostructured polymeric and metallic materials prepared by ionic plasma deposition. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(3):1190-201.

Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. *J Dent Res*. 1988;67(2):515-7.

Pitaru S, Aubin JE, Gray A, Metzger Z, Melcher AH. Cell migration attachment and orientation in vitro are enhanced by partial demineralization of dentine and cementum and inhibited by bacterial endotoxin. *J Periodontal Res*. 1984a;19(6):661-5

Pitaru S, Gray A, Aubin JE, Melcher AH. The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblast in vitro. *J Periodontal Res*. 1984b;19(4):408-18.

Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol.* 1983;54(3):141-7.

Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(3):249-50.

Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):207-12.

Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralization in situ. *J Periodontol.* 1973;44(1):49-54.

Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. *J Periodontol.* 1975;46(11):646-55.

Reis C, De-Deus G, Leal F, Azevedo E, Coutinho-Filho T, Paciornik S. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: an assessment with co-site optical microscopy and ESEM. *Dent Mater.* 2008;24(12):1608-15.

Rezende ML, Coesta PT, Oliveira RC, Salmeron S, Sant'Ana AC, Damante CA, et al. Bone demineralization with citric Acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. *J Periodontol.* 2015;86(1):146-54.

Rezende ML, Consolaro A, Sant'Ana AC, Damante CA, Gregghi SL, Passanezi E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. *J Periodontol.* 2014;85(5):e121-9.

Rezende MLR, Domingues, RS, Salmeron S. Efeito da desmineralização ácida na consolidação de enxerto ósseo autógeno em bloco. *Relato de caso. Innov Implant J, Biomater Esthet.* 2014;8(1):48-52.

Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol.* 2011;82(9):1223-37.

Rodrigues MGS, Rezende MLR, Santana ACP, Gregghi SLA, Domingues RS, Damante CA, et al. A desmineralização de enxertos ósseos autógenos onlay pode melhorar suas propriedades mecânicas: estudo biomecânico e por MEV. *Implant News.* 2012;9:329-36.

- Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. *J Periodontol*. 1999;70(10):1144-52.
- Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Induction plasma sprayed Sr and Mg doped nano hydroxyapatite coatings on Ti for bone implant. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;99(2):258-65.
- Rude RK, Singer FR, Gruber HE. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *J Am Coll Nutr*. 2009;28(2):131-41.
- Ruggeri A Jr, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol*. 2007;52(1):1-8.
- Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem*. 1992;267(28):20352-62.
- San Miguel B, Kriauciunas R, Tosatti S, Ehrbar M, Ghayor C, Textor M, et al. Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(4):1023-33.
- Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*. 1994;56(3):340-7.
- Schwartz Z, Lohmann CH, Wieland M, Cochran DL, Dean DD, Textor M, et al. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. *J Periodontol*. 2000;71(4):586-97.
- Selvig KA, Hals E. Periodontally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electron microscopy. *J Periodontal Res*. 1977;12(6):419-29.
- Selvig KA, Ririe CM, Nilvéus R, Egelberg J. Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. *J Periodontal Res*. 1981;16(1):123-9.

Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*. 2005;26(2):137-46.

Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, Mizutani H, Ueda M. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4 (BMP-2, -4) on lengthened rat femurs. *J Craniomaxillofac Surg*. 2005;33(4):238-45.

Song W, Mano JF. Interactions between cells or proteins and surfaces exhibiting extreme wettabilities. *Soft Matter*. 2013;9:2985-99.

Stadlinger, B, Pilling E, Huhle M, Mai R, Bierbaum S, Scharnweber D, et al. Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008a;37(1):54-9.

Stadlinger B, Pilling E, Mai R, Bierbaum S, Berhardt R, Scharnweber D, et al. Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008b;19(3):1043-9.

Steinfors J, Deblauwe BM, Beertsen W. The inorganic components of cementum-and enamel-related dentin in the rat incisor. *J Dent Res*. 1990;69(6):1287-92.

Sterrett JD, Bankey T, Murphy HJ. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. *J Clin Periodontol*. 1993;20(5):366-70.

Stewart UT. Partial removal of cementum and decalcification of tooth in the treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos*. 1899;41(7):617-26.

Sudo H, Kodama HY, Amagai H, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*. 1983;96(1):191-8.

Suttapreyasri S, Koontongkaew S, Phongdara A, Leggat U. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(5):444-52.

Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono, et al. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology*. 1999;140(5):2125-33.

Takeuchi H, Nagayama M, Imaizumi Y, Tsukahara T, Nakazawa J, Kusaka Y, et al. Immunohistochemical analysis of osteoconductivity of beta-tricalcium phosphate and carbonate apatite applied in femoral and parietal bone defects in rats. *Dent Mater J*. 2009;28(5):595-601.

Tanaka FAO, Kitajima EW. *Treinamento em Técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura 2010 -1*. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA); 2009.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.

Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003;4(8):638-49.

Trombelli L. Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect? *Periodontol 2000*. 2005;37:88-105.

Ueno T, Kagawa T, Kanou M, Fujii T, Fukunaga J, Mizukawa N. et al. Immunohistochemical observations of cellular differentiation and proliferation in endochondral bone formation from grafted periosteum: expression and localization of BMP-2 and -4 in the grafted periosteum. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003;31(6):356-61.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.

Urist MR, DeLange RJ, Finerman GA. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*. 1983;220(4598):680-6.

Urist MR, Jurist JM Jr, Dubuc FL, Strates BS. Quantitation of new bone formation in intramuscular implants of bone matrix in rabbits. *Clin Orthop Relat Res*. 1970;68:279-93.

Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*. 1971;50(6):1392-406.

Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int*. 1999;65(2):156-65.

Wang Z, Clark CC, Brighton CT. Up-regulation of bone morphogenetic proteins in cultured murine bone cells with use of specific electric fields. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(5):1053-65.

Webb K, Hlady V, Tresco PA. Relationships among cell attachment, spreading, cytoskeletal organization, and migration rate for anchorage-dependent cells on model surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(3):362-8.

Wei g, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX. The enhancement of osteogenesis of nanofibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials*. 2007;28(12):2087-96.

Weiss RE, Reddi AH. Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow. *J Cell Biol*. 1981;88(3):630-6.

Weng L, Webster TJ. Nanostructured magnesium increases bone cell density. *Nanotechnology*. 2012;23(48):485.

Wolf FI, Trapani V. Cell (patho)physiology of magnesium. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(1):27-35.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*. 1988;242(4885):1528-34.

Xu L, Pan F, Yu G, Yang L, Zhang E, Yang K. In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy. *Biomaterials*. 2009;30(8):1512-23.

You L, Sheng ZY, Tang CL, Chen L, Pan L, Chen JY. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(12):1498-504.

Zreigat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, et al. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(2):175-84.

Anexo

ANEXO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 031/2012

Bauru, 03 de dezembro de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito da desmineralização óssea superficial sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura**, de autoria de Samira Salmeron, sob sua orientação, e co-orientação do Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **aprovado ad referendum** desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que ao término da pesquisa seja enviado um relatório final com os resultados obtidos para análise e emissão de parecer, o qual poderá ser utilizado para publicação em revistas científicas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompeier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende

Docente do Departamento de Prótese da FOB/USP

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mfernan@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>