UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi

**Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico
sobre a composição química superficial e sobre o comportamento
de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvária de ratos**

BAURU
2016

GUSTAVO GONÇALVES DO PRADO MANFREDI

Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico sobre a composição química superficial e sobre o comportamento de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvária de ratos

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende

BAURU
2016

M313e

Gonçalves do Prado Manfredi, Gustavo

Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico sobre a composição química superficial e sobre o comportamento de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvaria de ratos / Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi. – Bauru, 2015.

92 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

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

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: 005/2014

Data: 26/05/2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dados Curriculares

Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi

Nascimento	24 de julho de 1990
Naturalidade	Birigui – SP
Filiação	Pascoal Manfredi Neto e Maria Noemi Gonçalves do Prado Manfredi
2010 – 2013	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP)
2012 – 2013	Iniciação científica na disciplina de Materiais Dentários, sob orientação do Prof. Dr. Paulo A.S. Francisconi
2015 – 2015	Curso de aperfeiçoamento em implantodontia na APCD de Bauru
2014 – 2016	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de Concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia, pela FOB-USP.

Dedicatória

Dedico àquelas pessoas que possuem vontade de aprender, e que acreditam que a eterna busca do saber é mais interessante do que o conhecido.

À minha família, que faz de minha vida viável nesse mundo: vocês são minha raiz, meu tronco e meu fruto.

Agradecimentos

Acredito muito que os agradecimentos, além de serem ditos, devem ser representados com atitudes, gestos, sorrisos e com o sentimento de querer o melhor para a pessoa. Minha sincera gratidão a todos aqueles que de certa forma doaram um pouco de si para minha formação profissional, pessoal e para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à **Profa. Dra. Maria Lúcia Rubo de Rezende (Malu)**, pelas conversas sobre vida, família, casos clínicos, cirurgias e seminários, das quais me fizeram refletir e ter senso crítico e, conseqüentemente, ajudaram na minha transição de graduando para pós-graduando com muito mais propriedade e bagagens para caminhar nessa estrada.

Agradeço a todos os **professores da Disciplina de Periodontia**. À **Profa. Dra. Adriana Campos Passanezi Sant'Ana**, por seu jeito acolhedor e carinhoso de transmitir os ensinamentos da periodontia nas clínica e seminários. À **Profª. Drª. Carla Andreotti Damante**, por ajudar no meu processo de aprendizagem de forma leve e tranquila, e pelas orientações na cultura celular desse trabalho. À **Profa. Dra. Mariana Schutzer Ragghianti Zangrando**, por ser uma grande incentivadora dos alunos sempre querendo o melhor. Ao **Prof. Dr. Sebastião Luíz Aguiar Gregghi**, pelas sabias palavras tanto na clínica quanto fora dela, que fazem termos discernimento para questões do mundo afora.

Ao **Prof. Dr. Paulo Noronha Lisboa Filho**, pela parceria no projeto. Muito obrigado por disponibilizar o laboratório e sua equipe para esta e para as demais pesquisas realizadas por nosso grupo, sempre mostrando disposição.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Grandini**, que viabilizou o uso do Microscópio Eletrônico de Varredura para as análises desta pesquisa.

Ao pós-graduando da FC/UNESP **Prof. Dr. Fabio Bossoi Vicente** e ao graduando **Leonardo Francisco Gonçalves Dias**, por ajudar na obtenção dos resultados de nossas pesquisas, sempre dispostos e esclarecendo todas as minhas dúvidas. Obrigado pelas conversas e tempo agradáveis.

Ao departamento de **Bioquímica**, e ao **Prof. Dr. Rodrigo Oliveira**, por disponibilizar seu laboratório e por contribuir com o seu conhecimento neste projeto.

Aos professores Dr. **Heitor Marques de Honório** e o **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris**, pela contribuição da realização e supervisão da análise estatística.

Agradeço a todos **os professores da FOB-USP**, que sempre ofereceram grandes conhecimentos que foram compartilhados ao longo destes anos. Muito obrigado!

Agradeço a todos os funcionários da periodontia **Asascleide Vital** (Cleidinha), **Edilaine Lúcio Rodrigues Torrecilha**, **Ivânia Komatsu da Costa Arruda**, **Marcela Maria Pereira** e **Marco Antonio de Godoy**, pelas dicas de vida e do dia-a-dia que fazem total diferença nas atitudes que tomamos, muitas vezes nos salvando de nós mesmos.

Agradeço a convivência e aos momentos compartilhados da **pós-graduação do departamento**: Alejandra Frias, Déia, Bruna Ferraz, Érika Carvalho, Giovanna Veronesi, Ísis Balderrama, Jefrey Rojas, Lucas Cambiaghi, Luísa, Matheus Cardozo, Mônica Garcia, Paula Cunha, Paula Karam, Poma, Rapha Michel, Renato Barros, Samira Salmeron e Vitor. Poderia escrever um livro de cada um, e cada um seria único e especial, com vários atos que iriam ser finalizados com o meu **multíssimo obrigado por tudo!**

A todos os meus **pacientes**, que me deram a oportunidade do aprendizado para tornar-me um melhor cirurgião-dentista.

A todos os meus **colegas do CIP** (Centro Integrado de Pesquisa), que proporcionaram momentos de descontração e conhecimento. E aos funcionários **Marcelo Milanda Ribeiro Lopes** e **Márcia Sirlene Zardin Graeff** por estarem sempre à disposição para ajudar nas pesquisas. Muito obrigado.

À **Cintia Kazuko Tokuhara**, por me ajudar em vários momentos da pesquisa e fora dela, sempre me tranquilizando com seu jeito positivo. **Muitíssimo obrigado!**

Agradeço a cada um dos funcionários do biotério, **Elias Francisco Cresta**, **Erasmu Gonçalves Da Silva**, **Luiz Carlos Da Silva** e **Richard Nelson Guanaes Simões** que sempre ofereceram sua ajuda com o agendamento e os protocolos do biotério.

Ao **Edimauro de Andrade** pela disponibilização e por me orientar na metalização das amostras e sobre o MEV.

Aos **funcionários** da biblioteca, da esterilização, do coseas, da faxina, dos departamentos, da parte administrativa, manutenção e toda a Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP).

Aos **graduandos** pela contribuição de bons momentos e de conhecimento nas clínicas, em sala de aula e em todos os outros momentos compartilhados.

Aos meus grandes **amigos da XLIX, da minha infância**, das **esquinas da vida** e da **pós-graduação**, agradeço o carinho e ajuda.

Agradeço a minha **Família**, pois é nela que me encontro, onde eu posso me refugiar das tempestades, para depois voltar em alto-mar. E navegando nesse mar da vida, nunca esquecer que cada barco possui histórias que devem ser respeitadas. Que as vezes coisinhas tão pequenas podem se tornar tão grandes em um piscar de olhos, e com isso vamos aprendendo e crescendo.

Agradeço a Deus, por tudo isso. E por me fazer perceber que realmente NADA É POR ACASO...

Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi

Agradecimentos Institucionais

À esta **Faculdade**, em nome da diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado** e ao vice-diretor **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, por nos oferecer a melhor infra-estrutura possível.

À **FC/UNESP** pela parceria e a viabilização dessa e das demais pesquisas realizadas.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Janson**, presidente da Comissão de Pós-Graduação por todo o auxílio e atenção dissipada.

Ao **Prof. Dr. José Rubo**, chefe do departamento de Prótese por toda ajuda dissipada.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela credibilidade e concepção inicial da bolsa de treinamento técnico e Auxílio à Pesquisa (Processo 2014/15136-8), essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela disponibilidade da bolsa de estudo.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

RESUMO

Pesquisas prévias evidenciaram que a desmineralização óssea com ácido cítrico melhora a consolidação de enxertos autógenos em bloco e favorece o espalhamento e a morfologia de pré-osteoblastos em cultura. Os resultados promissores encontrados com o ácido cítrico levantaram a suspeita de que a tetraciclina ácida pudesse suscitar efeitos semelhantes. Assim, este estudo se propôs a avaliar comparativamente o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre superfícies ósseas de calvária de ratos desmineralizadas com tetraciclina ácida (50mg/mL) e com ácido cítrico (10%, pH1) em diferentes tempos de aplicação. Foram removidas 126 amostras ósseas bicorticais da calvária de 63 ratos Wistar adultos machos empregando broca trefina de 5 milímetros de diâmetro. As amostras foram distribuídas aleatoriamente em um dos seguintes grupos de estudo (n=18): AC 15 no qual as amostras foram desmineralizadas por ácido cítrico durante 15 segundos; AC 30, no qual as amostras foram desmineralizadas por ácido cítrico durante 30 segundos; AC 60, no qual as amostras foram desmineralizadas por ácido cítrico durante 60 segundos; TCN 15 no qual as amostras foram desmineralizadas por tetraciclina durante 15 segundos; TCN 30, no qual as amostras foram desmineralizadas por tetraciclina durante 30 segundos; TCN 60, no qual as amostras foram desmineralizadas por tetraciclina durante 60 segundos e C, grupo controle formado por amostras não desmineralizadas. Os pré-osteoblastos foram cultivados sobre as amostras por 24, 48 e 72 horas (n= 6) para serem examinadas à microscopia eletrônica de varredura. Vinte e uma amostras coletadas de outros 11 animais foram distribuídas entre os mesmos grupos e analisadas com espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para análise da composição química superficial (n=3). A área de recobrimento superficial por células foi significativamente maior após 24 e 48 horas de cultura nos grupos AC15 (60,38% e 100% respectivamente), AC30 (99,32% e 100% respectivamente), AC60 (99,22% e 100% respectivamente), TCN15 (96,73% e 70,24% respectivamente) e TCN30 (64,72% e 57,40% respectivamente) do que nos grupos TCN60 (9,67% e 51,45% respectivamente) e C (5,99% e 31,83% respectivamente). Às 72 horas os grupos apresentaram recobrimento praticamente completo das superfícies ósseas por células, com exceção do grupo TCN60 (56,15%). As células

apresentaram-se com morfologia compatível com em estágios mais avançados de diferenciação nos grupos que sofreram desmineralização do que no controle. As variações nas porcentagens anatômicas (A%) dos elementos C, O, Na, Mg, P e Ca foram insuficientes para justificar mudanças no comportamento celular. Concluiu-se que a desmineralização quer por ácido cítrico ou tetraciclina de superfícies ósseas são favoráveis para o crescimento e diferenciação de células pré-osteoblásticas especialmente quando empregada conforme os grupos AC30 e TCN15. Os mecanismos por trás desses resultados ainda carecem de elucidação.

Palavras-chave: Desmineralização. Osteoblastos. Ácido cítrico. Tetraciclina.

ABSTRACT

Bone demineralization effect of tetracycline and citric acid on the surface chemical composition and the pre-osteoblasts cultured behavior in rat calvaria bone

Previous researches have demonstrated that bone demineralisation by citric acid improves the consolidation of bone autografts and promotes spreading and morphology of pre-osteoblasts in culture. The promising results with citric acid raised the suspicion that tetracycline could elicit similar effects. Thus, the aim of this study was to comparatively evaluate the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cultured on bone surfaces of rat calvaria demineralized with tetracycline (50mg / ml) and citric acid (10%, pH1) at different times of application. 126 bicortical samples were removed from the calvarial bone of 63 adult male Wistar rats using trephine drill of 5 mm in diameter. Samples were randomly assigned to one of the following study groups (n = 18) AC 15 in which the samples were demineralized by citric acid for 15 seconds; AC 30, in which the samples were demineralized by citric acid for 30 seconds; AC 60 wherein the samples were demineralized by citric acid for 60 seconds; TCN 15 in which the samples were demineralized tetracycline for 15 seconds; TCN 30, in which the samples were demineralized tetracycline for 30 seconds; TCN 60 wherein the samples were demineralized tetracycline for 60 seconds, and C, control group of samples not demineralized. The pre-osteoblasts were cultured on the samples for 24, 48 and 72 hours (n = 6) to be examined in the scanning electron microscope. Twenty-one samples were collected from other 11 animals and were distributed among the same groups for analysis of the surface chemical composition by energy dispersive spectroscopy (EDS) (n = 3). The average percentage of the bone surfaces covered by cells was significantly higher after 24 and 48 hours of culture in groups AC15 (60.38% and 100% respectively), AC30 (99.32% and 100% respectively), AC60 (99.22% and 100% respectively) TCN15 (96.73% and 70.24% respectively) and TCN30 (64.72% and 57.40% respectively) than in groups TCN60 (9.67% and 51.45% respectively), and C (5.99% and 31.83% respectively). At 72 hours, all the groups presented almost complete covering of the surfaces by cells, with the exception of TCN60 group (56.15%). Cells presented with

morphology compatible with more advanced stages of differentiation in groups undergone to demineralization than control. Variations in the anatomical percentages (A%) of the elements C, O, Na, Mg, Ca and P were insufficient to justify changes in cell behavior. The conclusion was that both demineralization of citric acid or tetracycline are favorable for the growth and differentiation of pre-osteoblasts especially when used according to AC30 and TCN15 groups. The mechanisms behind these results still need elucidation.

Keywords: demineralization. Osteoblasts. Citric acid. Tetracycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Obtenção das amostras. A: tricotomia na região da calvária. B: incisão semilunar. C: retalho total para exposição da calvaria. D: osteotomia com trefina de 5mm de diâmetro. E: amostra armazenada em criotubo estéril.....	42
Figura 2	- Distribuição das amostras nas placas de cultura celular de 24 poços.....	44
Figura 3	- Armazenamento das amostras após fixação nos “stubs” metálicos interiormente à metalização para observação em MEV.....	46
Figura 4	- Fotomicrografia de uma amostra do grupo TCN30 no período de 24 horas.	47
Figura 5	- Gráfico da porcentagem média da área de recobrimento da superfície óssea no período de 24, 48 e 72 horas.	52
Figura 6	- Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas de cada grupo de estudo, de acordo com os tempos de cultura de 24, 48 e 72 horas (MEV x 400).	53
Figura 7	- Gráfico da variação do pH do meio de cultura durante 24, 48 e 72 horas.	54
Figura 8	- Gráfico da composição da superfície óssea.....	55
Figura 9	- Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas dos grupos de estudo às 24 horas de cultura.	57
Figura 10	- Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas dos grupos de estudo após 48 horas de cultivo celular.....	58
Figura 11	- Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras pertencentes aos grupos de estudo às 72 horas de cultivo celular.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras entre os grupos de estudo.	43
Tabela 2 - Porcentagem média de área recoberta por pré-osteoblastos cultivados sobre amostras ósseas	52
Tabela 3 - Composição da superfície óssea antes e depois da desmineralização.	55

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
%A	Porcentagens atômicas médias
°C	Graus Celsius
µl	Microlitros
<	Menor
>	Maior
±	Desvio padrão
®	Marca registrada
AC	Ácido cítrico
AC15	Desmineralização com ácido cítrico a 10 %, por 15 segundos
AC30	Desmineralização com ácido cítrico a 10 %, por 30 segundos
AC60	Desmineralização com ácido cítrico a 10 %, por 60 segundos
ANOVA	Teste de análise de variância
BMPs	Bone morphogenetic proteins (proteínas ósseas morfogenéticas)
C	Carbono
Ca	Cálcio
CAII	Anidrase carbônica II
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento pessoal do ensino superior
CIP	Centro Integrado de Pesquisa
CEP	Comitê de ética em pesquisa
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
Dr(a).	Doutor(a)
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
et al.	E outros; Colaboradores
FAPESP	Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo
FOB-USP	Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo
FC/UNESP	Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
H ⁺	Prótons
IGF	Fator de crescimento derivado de insulina

Kv	Quilovolt
Na	Sódio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Magnésio
ml	Militros
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
O	Oxigênio
OC	Osteoclastos de camundongos
P	Fósforo
PBS	Solução tampão salina
PCA	Cristais de apatita pobremente cristalinos
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Expressão da prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogênio
TCN	Tetraciclina ácida hidrocloreada
TCN15	Desmineralização com tetraciclina ácida hidrocloreada, a 50mg/ml, por 15 segundos
TCN30	Desmineralização com tetraciclina ácida hidrocloreada, a 50mg/ml, por 30 segundos
TCN60	Desmineralização com tetraciclina ácida hidrocloreada, a 50mg/ml, por 60 segundos
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador β 1
TNF- α	Fatores de necrose tumoral alfa
TIFF	Tagged Image File Format
TRAP	Fosfatase ácida tartarato-resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Mecanismos fisiológicos da reabsorção e neoformação ósseas	25
2.2	Consolidação de enxertos ósseos	27
2.3	Desmineralização dos tecidos duros	28
3	PROPOSIÇÃO	35
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Aspectos Éticos	41
4.2	Procedimento Cirúrgico	41
4.3	Tratamento das amostras.....	42
4.4	Cultura de Células Pré-osteoblásticas.....	43
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura e Verificação do Ph.....	44
4.5.1	Fixação das Amostras e Verificação do pH do meio	44
4.5.2	Desidratação e Metalização das Amostras.....	45
4.5.3	Análise das Imagens	46
4.5.4	Análise Quantitativa.....	47
4.5.5	Análise Morfológica	48
4.6	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	48
4.7	Forma de Análise dos Resultados	48

5	RESULTADOS	49
5.1	Análise quantitativa.....	51
5.2	Dados do pH do meio de cultura	54
5.3	MEV / EDS – composição da superfície	54
5.4	Análise Morfológica	56
5.4.1	24 horas.....	56
5.4.2	48 horas.....	57
5.4.3	72 horas.....	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	71
7.1	Conclusão geral.....	73
7.2	Conclusões específicas	73
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	87

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Estudos prévios evidenciaram que a utilização de agentes desmineralizantes em superfícies ósseas acelera os processos biológicos de remodelação do tecido ósseo (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015). Nessas superfícies foi verificado aumento na proliferação osteoblástica que foi atribuída à liberação de substratos químicos após a desmineralização que podem auxiliar a diferenciação celular e a consolidação de enxertos ósseos (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015).

Esses estudos embasaram sua hipótese na desmineralização óssea fisiológica produzida por osteoclastos que, ao lançarem o conteúdo ácido de seus lisossomos no meio, promovem exposição do colágeno tipo I da matriz óssea e proteoglicanas associadas (BERGENHOLTZ, BABAY, 1998; RUGGERI et al., 2007), moléculas estas, quimiotrativas para células precursoras osteoblásticas. Decorre dessa ação osteoclástica a liberação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) responsáveis pela indução da diferenciação de células indiferenciadas dos tecidos adjacentes em osteoblastos (URIST et al., 1968).

Agentes químicos desmineralizantes para superfície de tecidos duros têm sido amplamente documentados como biomodificadores de dentina e cimento, visando a potencializar os processos reparativos em tratamentos de defeitos periodontais, na dependência da liberação de fatores que atuam na cicatrização periodontal e na criação de um substrato que privilegia a seleção de células nos eventos de reparação (REGISTER, BURDICK, 1975; WIKESJÖ, NILVEUS, SELVIG, 1992; STERRETT, BANKEY, MURPHY, 1993; MARIOTTI, 2003; AMARAL et al., 2011; SILVA et al., 2016). Os agentes mais utilizados para este fim são o ácido cítrico (GARRETT, CRIGGER, EGELBERG, 1978), tetraciclina (TERRANOVA, MARTIN, 1982; ISIK et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2000) e EDTA (BLOMLOF, LINDSKOG, 1995; BLOMLOF, BLOMLOF, LINDSKOG, 1996).

Embora haja vasto conhecimento sobre os efeitos dos modificadores químicos de superfície em cimento e dentina, há escassez de estudos concernentes à caracterização das superfícies ósseas vitais submetidas à desmineralização ácida e sobre o comportamento celular sobre essas superfícies. A desmineralização ácida das superfícies de contato entre enxertos ósseos autógenos em bloco e seu leito

receptor promoveu e acelerou a formação e consolidação óssea na interface em comparação à não desmineralização (REZENDE et al., 2014). Também foi evidenciada, em cultura de pré-osteoblastos sobre superfícies ósseas desmineralizadas, morfologia celular de estágios mais adiantados de diferenciação em comparação a células cultivadas sobre osso não desmineralizado (REZENDE et al., 2015). Esses resultados foram atribuídos não apenas à antecipação da atividade osteoclástica mimetizada pelo ácido, como também às prováveis alterações de topografia e composição das superfícies desmineralizadas (SALMERON, 2015).

Até o presente, apenas o ácido cítrico e o EDTA foram documentados em superfícies ósseas com o objetivo de acelerar os processos de remodelação. Ainda que a tetraciclina venha apresentando efeitos promissores sobre dentina e cimento, seu efeito sobre o osso foi investigado em apenas um trabalho de dissertação de mestrado executado na disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, ainda não publicado (ROJAS-PAULUS, 2016).

A proposta deste estudo foi testar a hipótese de que a desmineralização intencional do osso com tetraciclina resulta em comportamento celular tão favorável quanto ao produzido pelo ácido cítrico no que se refere à adesão, espalhamento e morfologia de diferenciação de uma linhagem de pré-osteoblastos de camundongos. Além disso, pretende-se comparar eventuais mudanças de composição química superficial óssea após a desmineralização.

2 Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo foi construído de forma a facilitar a compreensão da metodologia e dos resultados e, para tal, abordará conceitos sobre o mecanismo fisiológico da reabsorção e neoformação ósseas, eventos biológicos da consolidação dos enxertos ósseos, comportamento de osteoblastos em cultura e desmineralização dos tecidos duros.

2.1 Mecanismos fisiológicos da reabsorção e neoformação ósseas

Em condições fisiológicas, o osso exibe alta capacidade de regeneração, reparando-se após algum tempo quando lesado por patologia ou trauma com a produção de novo osso com características morfofuncionais semelhantes às do tecido original perdido. (DIMITRIOU, TSIRIDIS, GIANNOUDIS, 2005; PHILLIPS, 2005; TSIRIDIS, UPADHYAY, GIANNOUDIS, 2007; Al-AQL et al., 2008). Em circunstâncias normais, a neoformação e a reabsorção ósseas estão em um equilíbrio estável, mas quando há desequilíbrio, quer pela extensão da perda óssea ou devido a certas alterações sistêmicas, o reparo pode ser retardado, ou não haver reparação mesmo após longos períodos (COMARCK, 1987; KATCHBURIAN, ARANA, 2004; DATTA et al., 2008; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Entre exemplos dessa condição, encontram-se reabsorções patológicas como as que ocorrem nas periodontites, artrites reumatóides, doenças osteoporóticas primárias ou secundárias e tumores ósseos (TAKAYANAGI, 2005).

A fase de reabsorção óssea inicia-se através de estímulos mecânicos ou hormonais (SIMS, MARTIN, 2014) que sensibilizam células como os leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais que passam a produzir diversos sinais bioquímicos, entre os quais metaloproteinases da matriz (MMPs), que são enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1993), resultando em dissolução da camada osteoide não mineralizada e no recrutamento de osteoclastos na região (NAVARRO, 2006). O recrutamento de osteoclastos é advindo da estimulação dos osteócitos, que são células residentes na matriz óssea,

pelos fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), hormônio da paratireoide, fator de crescimento derivado de insulina (IGF), entre outros, que irão ativar osteócitos para estimular a fusão de pré-osteoclastos e a diferenciação de osteoclastos maduros. Quando diferenciados, os osteoclastos se polarizam e aderem à superfície óssea onde, pela liberação de enzimas lisossomais, como catepsina K e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), promovem a degradação dos componentes orgânicos e inorgânicos da matriz, cujos restos são removidos por macrófagos (SIMS, MARTIN, 2014).

A acidificação do meio ósseo pelo íon H^+ ocorre por ação da anidrase carbônica II (CAII), que é a enzima que catalisa a conversão de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) em ácido carbônico, prótons (H^+) e íons bicarbonato e, dessa forma, o meio ácido proporcionado pelo H^+ secretado pelas ATPases vacuolares (V-ATPases) levam a ativação das enzimas catepsina K, MMP-9 e fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), que são as principais responsáveis pela degradação da porção orgânica da matriz óssea. (BOYLE, SIMONET, LACEY, 2003).

A interação de potencial hidrogênio (pH) com os osteoclastos foi verificada em um estudo (KIM et al., 2001) no qual as mudanças no pH do meio exerciam efeitos nos osteoclastos para a dissolução dos cristais de apatita pobremente cristalinos (PCA) in vitro. Foi constatado quando o pH era ácido (6,5), aumentava a dissolução do PCA pelos osteoclastos. Em contrapartida, foi verificado que a atividade osteoclástica diminuía à medida que o meio se tornava alcalino, chegando a ser bloqueada quando o pH atingia 7,15 e 7,4 que são níveis próximos do fisiológico.

A atividade osteoclástica na matriz óssea, leva à liberação de fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento fibroblástico e fator de crescimento transformador, que promovem a diferenciação e o recrutamento osteoblastos, que são células responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso bem como pela sua mineralização (DATTA et al., 2008; RUCCI, 2008; RAGGATT, PARTRIDGE, 2010). Essas células sintetizam a matriz orgânica, constituída de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas que são componentes que interagem entre si, compondo uma estrutura para deposição de sais minerais e auxiliando na mineralização (ANDIA, 2006). Além desses fatores, a fosfatase alcalina de osteoblastos e pré-osteoblastos atua na formação dos cristais de hidroxiapatita (KATCHBURIAN, ARANA, 2004).

2.2 Consolidação de enxertos ósseos

A perda do elemento dental constitui-se em uma situação peculiar diante do restante do organismo em relação à consequente reabsorção do processo ósseo alveolar. A atividade osteoclástica progride continuamente após a extração dental, ocorrendo primeiramente diminuição da espessura do rebordo alveolar (CARDAROPOLI; ARAUJO; LINDHE, 2003) e posteriormente, redução da altura óssea (ARAUJO; LINDHE, 2005), com diferentes padrões nas regiões de maxila e mandíbula (CAWOOD; HOWELL, 1991). Também é verificada reabsorção mais pronunciada no primeiro ano após a exodontia do que nos anos subsequentes (MAGINI, 2006.)

Para a execução de procedimentos reabilitadores de rebordos alveolares edêntulos reabsorvidos ou no tratamento de defeitos ósseos ocasionados por doença periodontal, enxertos ósseos autógenos, alógenos e aloplásticos são frequentemente empregados, podendo ser utilizados na forma de blocos para ganho em espessura e altura, ou na forma particulada, para preenchimento de defeitos ósseos circunscritos (FAVERANI et al., 2014). Os enxertos autógenos são considerados “padrão ouro” devido à sua capacidade de não gerar resposta imunológica, por liberar fatores de crescimento, tais como BMPs e proporcionar uma superfície osteocondutora para adesão e crescimento celular (MIRON et al., 2011; BOYNE, 1973).

O processo de incorporação dos enxertos ósseos autógenos se dá pela substituição do osso enxertado por novo osso viável através de uma cascata de eventos similares às fases da consolidação de fraturas (GALEA, KEARNEY, 2005). Ocorre primeiramente, um processo inflamatório com aumento da atividade vascular, mediado por fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β) (PINHEIRO, GERBI, 2006). As células inflamatórias diminuem gradativamente à medida que a atividade osteoclástica aumenta, acarretando maior reabsorção e autólise dos osteócitos (BURCHARDT, 1983). Após um período de revascularização, ocorre a liberação das BMPs, que agem nas células adjacentes do canal medular e nos pré-osteoblastos e induzem a proliferação e diferenciação destas células em osteoblastos funcionais que irão secretar matriz óssea (TRUUMES, HERKOWITZ, 1999).

Considera-se que para haver consolidação do enxerto ósseo com o leito receptor são necessários imobilização do enxerto e contato íntimo entre enxerto e leito receptor, de forma a haver nutrição e revascularização do tecido enxertado para sua remodelação (TRIPLETT, SCHOW, 1996). A presença de mobilidade do enxerto resulta em reabsorção e perda óssea durante o processo de incorporação (PHILLIPS, RAHN, 1988), mas além da imobilização, desgastes e perfurações na cortical óssea do leito receptor têm sido preconizados com o objetivo de promover a revascularização do tecido enxertado (MAZZONETTO, 2008; BUSER et al., 1993). Com o mesmo objetivo tem sido recomendada a aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (GORDH et al., 1999), laser de baixa potência (OBRADOVIC, KESIC, PESEVSKA, 2009) e desmineralização óssea (REZENDE et al., 2014; REZENDE et al., 2015) na interface enxerto/leito.

2.3 Desmineralização dos tecidos duros

A desmineralização de superfícies radiculares expostas à doença periodontal é largamente empregada em Periodontia para criar um substrato biologicamente ativo para inserção celular e cementogênese (MARIOTTI, 2003). Várias substâncias ácidas tem sido testadas com esse propósito, sendo o ácido cítrico pH 1 por 3 minutos, um dos protocolos mais empregados (STERRETT, BANKEY, MURPHY, 1993; AMARAL et al., 2011). A desmineralização de tecidos duros expõe colágeno e proteoglicanas associadas (BERGENHOLTZ, BABAY, 1998; RUGGERI et al., 2007) que são quimioatrativas para células mesenquimais (WIKESJO, NILVEUS, SELVIG, 1992). Além disso, foram relatadas modificações na composição química de tecidos mineralizados depois do tratamento com ácidos, como mudanças na proporção relativa de átomos e na rugosidade superficial (SCHWARTZ et al., 2000). As modificações químicas foram capazes de modular a adsorção de componentes séricos a essas superfícies (PEARSON et al., 1988) com subsequente aumento da inserção celular (SCOTCHFORD et al., 1998).

Foi também observado que fibras colágenas, fatores de crescimento e outras moléculas regulatórias expostas sobre matrizes de dentina desmineralizada são capazes de regular a diferenciação de osteoblastos (SCHWARTZ et al., 2000). Quando exposto, o colágeno tipo I interage com integrinas dos osteoblastos,

desempenhando importante papel na interação entre essas células e o osso (FENG, 2009). Alguns autores sugeriram que a dentina desmineralizada representa um substrato ótimo para a adesão de fibrina (POLSON, PROYE, 1983; BAKER, STANLEY-PAVLOW, WIKESJO, 2005; LEITE et al., 2010), sendo as fibras colágenas expostas, quimiotáticas para fibroblastos (CHANDRA, JAGETIA, BHAT, 2006). Essa quimiotratividade também ocorre em osso desmineralizado, já que essas mesmas proteínas também fazem parte da matriz orgânica óssea (LINSLEY, WU, TAWIL, 2013).

Quando a desmineralização com ácido cítrico foi combinada com fatores de crescimento sobre superfícies radiculares expostas à doença periodontal, houve aumento da proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal humano em cultura (SANT'ANA et al., 2007). Também foi demonstrado que o fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) é liberado da matriz extracelular durante a reabsorção óssea por osteoclastos (TANG et al., 2009). Uma vez ativado, o TGF- $\beta 1$ induz a migração de células-tronco mesenquimais e estimula a síntese de glicosaminoglicanas sulfatadas por essas células (ARNOTT et al., 2007).

Um importante estudo de Schwartz et al. (2000), no qual a presente dissertação foi embasada, avaliou alterações superficiais dentinárias resultantes da desmineralização por tetraciclina ácida. Superfícies dentinárias polidas, tratadas com tetraciclina supersaturada (TCN) durante 3 minutos e lavadas com água destilada, ou expostas à ação reabsortiva de osteoclastos de camundongos (OC) receberam cultura de células osteoblásticas humanas MG63. No grupo tratado por tetraciclina, o crescimento e a diferenciação osteoblástica foi muito maior e semelhante ao que ocorreu nas lacunas ocasionadas pela reabsorção osteoclástica natural. Através de perfilometria foi observado que o grupo OC apresentava rugosidade superficial levemente superior aos outros grupos e que essa característica estava relacionada ao crescimento e espalhamento celular. Foi ainda observado que a atividade enzimática da fosfatase alcalina, a expressão de prostaglandina E2 (P GE2), expressão de fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta 1$) e de osteocalcina foram mais intensos no grupo tratado por tetraciclina do que nos demais grupos.

No tecido ósseo, os fatores osteogênicos/osteointdutores estão contidos dentro da fase orgânica e impedidos de agir pela mineralização da matriz (STEVENSON, EMERY, GOLDBERG, 1996). Sabendo disso, a desmineralização intencional do osso foi proposta por Urist em 1965 (URIST, 1965), quando o ácido

hidroclorídrico foi usado para descalcificar enxertos ósseos implantados subcutaneamente em animais. Em uma sequência de estudos desse autor, foi verificado que a desmineralização do osso e da dentina induziu a formação óssea ectópica dentro de 4 a 6 semanas depois da implantação, o que foi atribuído à diferenciação de células tronco e osteoprogenitoras promovida pelo processo de desmineralização (URIST, 1965). A base científica proporcionada por esses estudos levou ao desenvolvimento e aplicação clínica de preparados comerciais de osso liofilizado de diferentes origens (BOWERS et al., 1989).

Entretanto, poucos trabalhos relataram o potencial efeito da desmineralização do osso fresco *in situ* no reparo ósseo. Entre os pioneiros em avaliar esse tipo de procedimento está o trabalho de Rezende et al. (2014), que realizaram enxertos em blocos ósseos tipo onlay em calvária de cobaias e verificaram maior consolidação e densidade do osso neoformado quando a interface enxerto-leito foi desmineralizada por 3 minutos com ácido cítrico pH 1 a 50 %. Análises histomorfométricas demonstraram que o procedimento de desmineralização resultou em nível de neoformação óssea e consolidação dos enxertos aos 30 dias, só alcançados pelos espécimes não desmineralizados aos 60 dias, antecipando, pois, os eventos de reparo. 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.

Também Domingues (2013) chegaram às mesmas conclusões após aplicarem ácido cítrico por 3 minutos em tíbias de coelhos previamente à realização de enxertos ósseos autógenos em bloco. Após 15, 30 e 45 dias, foi observado que a desmineralização resultou em maior área de formação óssea e maior extensão de superfícies ósseas consolidadas, especialmente aos 30 dias.

Rodrigues et al. (2012) verificaram que a desmineralização com EDTA a 24 % durante 3 também melhorou o comportamento elástico de enxertos em bloco onlay realizados em tíbias de coelhos, já que o módulo de elasticidade da interface enxerto/leito foi maior, aos 90 dias, do que em amostras não desmineralizadas. Os autores sugeriram que esse comportamento ósseo seria favorável ao não destacamento dos enxertos quando da inserção de implantes nessa interface.

Procurando entender os fenômenos que justificariam os bons resultados observados com a desmineralização de enxertos ósseos, Rezende et al. (2015)

estudaram em calvária de cobaias, o efeito da desmineralização superficial do osso fresco com ácido cítrico pH 1 ao 50% durante 15, 30 e 180 segundos sobre o comportamento de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre essas superfícies por 24, 48 e 72 horas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou que a desmineralização ácida produziu maior área óssea de cobertura por células e diferenciação mais rápida dos pré-osteoblastos em comparação a amostras não desmineralizadas, especialmente nos tempos de 15 e 30 segundos (30% e 40% respectivamente às 24 horas de cultura; 34% e 44% respectivamente às 48 horas de cultura; 70% e 72% respectivamente às 72 horas de cultura). Os autores ressaltaram que o procedimento poderia ser vantajoso nos procedimentos que visam à regeneração de defeitos ósseos.

Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa demonstrou que a desmineralização com ácido cítrico pode alterar a composição química e a topografia superficial do osso fresco podendo essas alterações, influenciar o comportamento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 (SALMERON, 2015). Nesse estudo foi estudado o efeito da desmineralização com ácido cítrico a 10% ou 50% durante 30 segundos em superfícies ósseas de calvarias de ratos, sobre o comportamento celular durante 24, 48 e 72 horas em cultura. O recobrimento das superfícies ósseas por células foi maior nas amostras desmineralizadas do que nas não desmineralizadas. No mesmo estudo, foi verificado por microscopia confocal, que houve maior expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 nas superfícies desmineralizadas do que nas superfícies controle, o que levou à conclusão de que a desmineralização de superfícies ósseas parece contribuir para antecipar os eventos biológicos que resultam na deposição de novo osso.

O mais recente estudo da mesma equipe (ROJAS-PAULUS, 2016) comparou o reparo de defeitos críticos em calvária de ratos enxertados com osso autógeno particulado e desmineralizados com ácido cítrico pH1 a 50% ou tetraciclina hidrocloreada a 50mg/ml em diferentes tempos de aplicação. Foi observada maior neoformação óssea nos defeitos enxertados com osso desmineralizados por ácido cítrico do que nos grupos com tetraciclina e ambos os grupos tiveram maior neoformação óssea do que no grupo controle não desmineralizado. Já aos 7 dias, o maior preenchimento foi alcançado quando se empregou o AC por 15 segundos (AC15) ($13,28 \pm 5,69\%$), mantendo-se essa superioridade também aos 30 dias ($50,26 \pm 26,38\%$). Nesse período, entre os grupos formados por enxertos

desmineralizados por TCN, o maior preenchimento (apenas $16,00 \pm 3,04\%$) foi o produzido com TCN por 30 segundos (TCN30). Aos 60 dias, verificou-se que os grupos AC15 ($61,53 \pm 30,91\%$) e AC30 ($57,16 \pm 27,58\%$) apresentavam as maiores porcentagens de preenchimento dos defeitos, sem diferença estatística entre si, mas sim em relação aos demais grupos. Novamente, o melhor resultado dos grupos tratados com TCN ocorreu após 60 segundos de desmineralização ($8,44 \pm 2,86\%$), mas esse resultado foi pior até mesmo do que o grupo controle negativo, onde nenhum enxerto foi empregado ($29,59 \pm 7,77\%$). Um dado importante desse estudo foi que as partículas ósseas desmineralizadas por ácido cítrico estavam mais íntegras e intactas do que as não desmineralizadas, as quais sofreram reabsorção antes de serem substituídas por novo osso. Assim, o autor deduziu que a desmineralização pode ter antecipado a chegada dos osteoblastos à área, iniciando a deposição precoce de matriz orgânica. Desta forma, as partículas ósseas deixaram de ser reconhecidas como corpo estranho, deixando também de serem reabsorvidas, como ocorreu no osso não desmineralizado. Como justificativa para os resultados insatisfatórios apresentados pela TCN, o autor pontuou, com base em resultados de outras publicações, que a substância pode ter agido como inibidor das BMPs e das MMPs e, conseqüentemente, da neoformação óssea, já que resíduos dos pigmentos da tetraciclina se incorporam à superfície óssea, gerando uma reação de tipo corpo estranho que interferiria na comunicação e expressão desses fatores. O autor concluiu que 15 segundos de desmineralização com AC parecem ser suficientes para eliminar a porção mineral do osso sem danificar a estrutura das BMPs e MMPs, sugerindo, portanto, que esse seria um bom protocolo de uso em situações clínicas.

Como se percebe, existe suficiente motivação para a linha de pesquisa em que se insere esta dissertação, já que a primeira etapa do mecanismo fisiológico de remodelação óssea é a desmineralização pela produção local de ácidos pelos osteoclastos (MELCHER, 1976). Essas substâncias ácidas dissolvem minerais e liberam enzimas sobre a superfície óssea que hidrolisam a matriz orgânica (ROODMAN, 1999). As cavitações formadas sobre a superfície óssea se tornam preenchidas por proteínas produzidas pelos osteoclastos e osteoblastos e essas proteínas proporcionam substrato para a inserção e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (DODDS et al., 1995). Porém, são ainda escassos os estudos concernentes à caracterização das superfícies ósseas vitais

submetidas à desmineralização ácida e sobre o comportamento celular sobre essas superfícies.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral:

Esta pesquisa objetivou comparar os efeitos da desmineralização óssea superficial por tetraciclina ácida e por ácido cítrico em diferentes tempos de aplicação sobre o comportamento de pré-osteoblastos em cultura, além de analisar parâmetros de superfície antes e depois da desmineralização.

3.2 Objetivos específicos:

- a. Comparar quantitativamente a porcentagem média de extensão superficial óssea recoberta por pré-osteoblastos MC3T3-E1 aderidos às superfícies ósseas desmineralizadas ou não com ácido cítrico e tetraciclina ácida em diferentes tempos de aplicação após 24, 48 e 72 horas em cultura;
 - b. Comparar qualitativamente a morfologia das células cultivadas conforme o item “a”;
 - c. Comparar a composição química superficial óssea por espectroscopia de energia dispersiva após desmineralização com ácido cítrico ou tetraciclina ácida em diferentes tempos de aplicação.
-
-

4 Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa que deu origem a esta dissertação foi submetido aprovado pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (processo nº005/2014) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

4.2 Procedimento Cirúrgico

Setenta e quatro ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* – *Var. albinus rodentia mammalia*), pesando cerca de 300-400 gramas, com aproximadamente 4 meses de vida, criados e mantidos no Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, foram submetidos a cirurgia para remoção de discos ósseos bicorticais da calvaria, totalizado cento e cinquenta amostras.

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular com cloridrato de xilasina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí/SP) à dose de 0,1ml/Kg de peso corporal, juntamente com cloridrato de ketamina (Dopalen, Vetbrands, Jacareí/SP) a 0,5 ml/Kg de peso, na porção interna da coxa direita traseira com seringa de insulina (25 UI de cada fármaco). Posteriormente foi realizada a tricotomia na região frontoparietal dos animais com lâmina de barbear (Gillete – P&G do Brasil/SP), e antisepsia com digluconato de clorexidina a 2% (Chlorohex, JohnsonDiversey, São Paulo). O tegumento da linha média recebeu uma incisão semilunar com lâmina de bisturi no.15 (Lamedid Comercial e Serviços Ltda. Barueri, SP) até atingir o perióstio. A partir desta incisão, um retalho total foi levantado para exposição da cortical óssea da calota craniana da qual, dois discos ósseos bicorticais foram removidos com uma broca trefina de 5,0mm de diâmetro interno em baixa rotação e sob irrigação profusa com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%. Foram obtidos assim, 150 amostras ósseas, que foram armazenadas em tubo de criogenia estéreis de 2,0ml (TPP – Biosystems, Curitiba/PR/Brasil) e congeladas a -80°C no

Centro Integrado de Pesquisa da FOB (CIP) até o momento de sua utilização. Após esse procedimento, os animais tiveram morte induzida por sobre dose de anestésico. A figura 1 ilustra esta etapa do experimento.

Figura 1 – Obtenção das amostras. A: tricotomia na região da calvária. B: incisão semilunar. C: retalho total para exposição da calvária. D: osteotomia com trefina de 5mm de diâmetro. E: amostra armazenada em criotubo estéril.

4.3 Tratamento das amostras

Após o descongelamento em temperatura ambiente, as amostras foram assepticamente colocadas em placas de cultura de 24 poços, distribuídas de forma aleatória entre os grupos de estudo conforme a tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1 – Distribuição das amostras entre os grupos de estudo.

Grupo	Tratamento
Grupo Controle Positivo	Nove amostras que receberam lavagem com soro fisiológico
Grupo AC 15s	Nove amostras que foram submersas em ácido cítrico 10% em pH1 durante 15 segundos e lavadas em seguida com soro fisiológico
Grupo AC 30s	Nove amostras que foram submersos em ácido cítrico 10% em pH1 durante 30 segundos e em seguida lavadas com soro fisiológico
Grupo AC 60s	Nove amostras que foram submersas em ácido cítrico 10% em pH1 durante 60 segundos e em seguida, lavadas com soro fisiológico
Grupo TNC 15s	Nove amostras que foram submersas em tetraciclina ácida hidrociorada a 50mg/mL durante 15 segundos e em seguida lavadas com soro fisiológico
Grupo TNC 30s	Nove amostras que foram submersas em tetraciclina ácida hidrociorada a 50mg/mL durante 30 segundos e em seguida lavadas com soro fisiológico
Grupo TNC 60s	Nove amostras que foram submersas em tetraciclina ácida hidrociorada a 50mg/mL durante 60 segundos e em seguida lavadas com soro fisiológico

4.4 Cultura de Células Pré-osteoblásticas

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 no Departamento de Bioquímica da FOB-USP. Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados em uma capela de fluxo laminar acoplada a um sugador Nevoni. Os pré-osteoblastos foram descongelados e expandidos, sendo cultivados em meio de cultura α -MEM adicionado de 10% de soro fetal bovino, 2% de solução antibiótica e antimicótica. Em seguida, foram incubados em ambiente úmido a 37°C, numa atmosfera contendo 95 % de ar e 5 % de dióxido de carbono. Após o subcultivo para frascos de 75cm² (TPP – Biosystems, Curitiba/PR/Brasil), as células foram armazenadas em estufa até atingirem nova subconfluência e se apresentarem na quinta passagem, ideal para a realização do plaqueamento.

Foram plaqueadas 10⁴ células em cada poço de outras placas de cultura de 24 poços contendo uma amostra cada poço. Foi utilizada uma placa de 24 poços para cada período experimental de 24, 48 e 72h, onde as amostras foram organizadas de

forma a permitir o reconhecimento dos grupos (Figura 2), sendo 6 amostras por grupo experimental.

Figura 2 – Distribuição das amostras nas placas de cultura celular de 24 poços

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura e Verificação do pH

4.5.1 Fixação das Amostras e Verificação do pH do meio

Passados os períodos de cultura de 24, 48 e 72 horas, o meio de cultura foi removido dos poços e transferido para tubos Falcon, que foram distribuídos de acordo com o grupo ao qual pertenciam, para verificação do pH do meio. Desta forma, as seis coletas de meio provenientes de cada grupo foram colocadas em um

mesmo tubo correspondente ao seu grupo experimental. O pH foi medido nos períodos correspondentes ao tempo em que as células permaneceram em cultura (24, 48 e 72 horas) empregando peagâmetro.

Enquanto isso, as amostras foram lavadas duas vezes com 1 mL de solução tampão salina (PBS) e, em seguida, foram transferidas para novas placas de 24 poços estéreis para serem preparadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) segundo método de Tanaka e Kijima (TANAKA; KITAJIMA, 2009). Sendo assim, em cada poço as amostras foram submersas em 1 mL de solução de Karnovsky para fixação. Após este procedimento, as placas foram fechadas e envolvidas com papel alumínio ficando armazenadas em temperatura ambiente por três dias.

Posteriormente, o fixador Karnovsky foi removido dos poços e as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos, com 1 mL de solução tampão cacodilato 0,05 M. Em seguida, as amostras foram levadas para tampas de *ependorfs* de 2 mL, das quais foram destacadas e coladas na tampa das placas com fita dupla face, para receberem 150 µL 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. Logo após, foram cobertas por papel alumínio e permaneceram na capela por uma hora.

4.5.2 Desidratação e Metalização das Amostras

Após o final do período da pós-fixação, as amostras foram transferidas para novas placas de 24 poços e lavadas 3 vezes por 10 minutos com 1 mL de água destilada em cada poço. Após isso as amostras foram submetidas a imersão de 10 minutos de acetona em concentrações crescentes 30%, 50%, 70% e 90%. Por último, as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos, com acetona a 100%.

Estando as amostras fixadas e desidratadas, foram preparadas para a metalização em “stubs” metálicos para MEV devidamente identificados quanto aos grupos com marcações na base aos quais foram fixadas. As amostras foram mantidas em placas de 24 poços, com sílica, por 48 horas para secagem (Figura 3) antes de serem metalizadas.

Figura 3 – Armazenamento das amostras após fixação nos “stubs” metálicos anteriormente à metalização para observação em MEV.

Em seguida, as amostras foram levadas para o metalizador Quorum Q150R ES (Quorum Technologies – Laughton/East Sussex/Inglaterra), da Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FC/UNESP). Após receberem a camada de ouro, os “stubs” foram acondicionados na mesma caixa vedada contendo sílica para controlar a humidade até o momento da análise ao microscópio.

4.5.3 Análise das Imagens

As imagens de MEV foram obtidas em um microscópio EVO LS15 (Zeiss.-Alemanha), no setor do Laboratório Multiusuários de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Física da UNESP Faculdade. O microscópio foi regulado em 10 Kv, em aumento de 400 vezes. A leitura foi realizada no centro de

cada amostra e as imagens foram armazenadas no formato TIFF (Tagged Image File Format).

4.5.4 Análise Quantitativa

Para a avaliação da área recoberta pelas células cultivadas nas superfícies das amostras, as imagens obtidas do MEV foram transferidas para um computador para serem analisadas com auxílio do programa Image J, versão 1.50 (National Institute of Health, USA). A área da superfície óssea das amostras recoberta por células foi obtida pela soma das áreas delineadas pelos perímetros celulares em cada fotomicrografia, sendo esta soma subtraída da área total do campo de visualização na ampliação escolhida para cálculo da porcentagem da área recoberta por células (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia de uma amostra do grupo TCN30 no período de 24 horas, na qual se observa a delimitação da área recoberta pelas células (traço em preto) e a deposição de sais de tetraciclina (setas amarelas)

4.5.5 Análise Morfológica

As fotomicrografias foram avaliadas quanto à morfologia, levando-se em consideração o formato arredondado ou achatado das bordas, presença, extensão e intercomunicação de filopodias, aparência fusiforme ou espalhada do corpo celular e formação ou não de camadas superpostas.

4.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

As porcentagens atômicas médias (%A) sobre as amostras dos elementos carbono (C), oxigênio (O), Sódio (Na), magnésio (Mg), fósforo (P) e cálcio (Ca) foram avaliadas antes e depois da desmineralização empregando EDS

4.7 Forma de Análise dos Resultados

Para comparar os dados referentes à média da área de superfície recoberta por células foi empregada análise de variância a dois critérios (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 99% utilizando o programa GraphPad Prism 5, (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

Para análise estatística dos dados de EDS por meio do programa SigmaStat 3.5 (STATCON – Witzenhause/Hesse/Alemanha) 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%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise quantitativa

Na análise intra-grupo, todos os grupos estudados apresentaram aumento da área de superfície recoberta por células de 24 para 72 horas em cultura. Porém essa diferença foi estatisticamente significativa apenas nos grupos TCN60 e controle. No período de cultura de 24 horas, a área de superfície óssea recoberta por pré-osteoblastos foi maior nas amostras dos grupos AC30, AC60 e TCN 15 com cobertura quase total das superfícies por células nesses grupos ($p > 0,05$). Entretanto, apenas os grupos TCN60 e Controle diferiram estatisticamente dos demais grupos, apresentando menos de 10% de área de cobertura celular ($p < 0,001$).

Às 48 horas, ainda que os grupos desmineralizados por ácido cítrico tenham apresentado 100% de recobrimento das superfícies ósseas por células, não houve diferença estatística entre eles e os grupos TCN15 e TCN30, cuja porcentagem média de recobrimento foi numericamente inferior. Já os grupos desmineralizados por tetraciclina, embora tenham apresentado porcentagens de superfície recoberta por células numericamente maiores, não diferiram estatisticamente do grupo controle, que foi o que apresentou menor cobertura entre os grupos ($p > 0,05$).

Às 72 horas, o recobrimento foi total nos grupos tratados por ácido cítrico e no controle. As amostras tratadas com tetraciclina mostraram dados inferiores, sendo o pior deles apresentado pelo grupo TCN 60. Essas diferenças, no entanto, não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

A tabela 2 e a figura 5 contêm as informações numéricas de cada grupo. A figura 6 ilustra amostras representativas de cada grupo.

Tabela 2 – Porcentagem média de área recoberta por pré-osteoblastos cultivados sobre amostras ósseas

GRUPO/PERIODO	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
AC15	60,38 ± 35,40 ^{cde}	100 ± 0,00 ^e	100 ± 0,00 ^e
AC30	99,32 ± 1,67 ^e	100 ± 0,00 ^e	100 ± 0,00 ^e
AC60	99,22 ± 1,92 ^e	100 ± 0,00 ^e	100 ± 0,00 ^e
TCN15	96,73 ± 5,81 ^{de}	70,24 ± 42,80 ^{cde}	90,95 ± 10,34 ^{de}
TCN30	64,72 ± 15,11 ^{cde}	57,40 ± 41,29 ^{cde}	82,11 ± 30,01 ^{de}
TCN60	9,67 ± 9,67 ^{ab}	51,45 ± 35,12 ^{abcd}	56,15 ± 35,48 ^{bcd}
CONTROLE	5,99 ± 7,45 ^a	31,83 ± 36,63 ^{abc}	100 ± 0,00 ^e

Letras iguais representam ausência de diferença estatística na mesma linha ou na mesma coluna.

Figura 5 - Gráfico da porcentagem média da área de recobrimento da superfície óssea no período de 24, 48 e 72 horas

Figura 6 – Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas de cada grupo de estudo, de acordo com os tempos de cultura de 24, 48 e 72 horas (MEV x 400)

5.2 Dados do pH do meio de cultura

Foi observado que o pH do meio de cultura coletado dos poços onde as amostras permaneceram por 24 horas em cultura de pré-osteoblastos era levemente básico em todos os grupos. Esse pH foi diminuindo gradualmente até chegar aos níveis ideais para cultura celular (Figura 7).

Figura 7-Gráfico da variação do pH do meio de cultura às 24, 48 e 72 horas

5.3 MEV / EDS – composição da superfície

A %A de carbono aumentou em todos os grupos após a desmineralização, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa, como foi o aumento do elemento Na ($p=0,0199$). O oxigênio aumentou significativamente apenas no grupo AC15 e diminuiu nos demais grupos ($p=0,0306$). Não houve alteração significativa nos conteúdos de P e Mg após a desmineralização quer com AC, quer com TCN. O conteúdo de Ca aumentou em todos os grupos com exceção do AC60, no qual diminuiu ($p=0,0091$) (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3 – Composição das superfícies ósseas antes e depois da desmineralização.

	AC15	AC30	AC60	TCN15	TCN30	TCN60
C-antes	58,93 ± 6,62	62,67 ± 2,64	62,32 ± 4,84	62,09 ± 1,55	59,07 ± 8,18	61,62 ± 8,43
C-depois	62,59 ± 5,38	66,87 ± 1,73	66,16 ± 1,02	63,13 ± 0,83	60,40 ± 5,13	65,79 ± 3,21
O-antes	32,32 ± 8,81 ^a	36,64 ± 2,70 ^a	36,65 ± 4,32 ^a	36,2 ± 2,16 ^a	39,37 ± 6,41 ^a	37,08 ± 6,93 ^a
O-depois	33,13 ± 3,83 ^b	31,94 ± 1,46 ^b	33,39 ± 0,88 ^b	34,17 ± 1,84 ^b	34,73 ± 3,38 ^b	32,81 ± 1,63 ^b
Na-antes	0,19 ± 0,08 ^a	0,12 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,11 ^a	0,17 ± 0,10 ^a
Na-depois	0,59 ± 0,57 ^b	0,74 ± 0,59 ^b	0,32 ± 0,23 ^b	0,21 ± 0,14 ^b	0,26 ± 0,03 ^b	0,27 ± 0,36 ^b
Mg-antes	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,05	0,06 ± 0,07
Mg-depois	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,1 ± 0,04	0,02 ± 0,02
P-antes	0,80 ± 0,67	0,21 ± 0,08	0,3 ± 0,35	0,26 ± 0,23	0,73 ± 0,92	0,59 ± 0,83
P-depois	1,64 ± 0,48	0,16 ± 0,15	0,06 ± 0,02	1,11 ± 0,70	1,92 ± 1,39	0,7 ± 0,87
Ca-antes	0,55 ± 0,47 ^a	0,06 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,18 ^a	0,12 ± 0,19 ^a	0,47 ± 0,71 ^a	0,36 ± 0,59 ^a
Ca-depois	1,91 ± 0,60 ^b	0,18 ± 0,24 ^b	0,02 ± 0,02 ^b	1,22 ± 1,00 ^b	2,45 ± 2,03 ^b	0,48 ± 0,74 ^b

Letras diferentes na mesma coluna entre os mesmos elementos significam diferença estatisticamente significante

Figura 8 - Gráfico da composição da Superfície Óssea antes e depois da desmineralização

5.4 Análise Morfológica

5.4.1 24 horas

No grupo controle, após 24 horas, poucas células foram encontradas, espaçadas umas das outras, sem conexão entre elas, em vista dos poucos prolongamentos citoplasmáticos filamentosos, com contornos celulares mais arredondados ou fusiformes. Os grupos AC15, AC30 e AC60 apresentaram células bastante distribuídas, com praticamente toda superfície recoberta. Estas células apresentaram aparência mais achatada e estrelada, com evidentes prolongamentos citoplasmáticos filamentosos fazendo conexões entre as células. Nos grupos TCN15 e TCN30 pôde ser observada precipitação de sais de cloridrato de tetraciclina, que podem ter dificultado a proliferação celular. Mesmo assim, as células apresentaram aspecto achatado e estrelado, com prolongamentos citoplasmáticos fazendo conexões com as demais células. No grupo TCN60 percebe-se grande precipitação de sais sobre a superfície do osso, com poucas células e de aspecto mais fusiformes do que as do grupo Controle (Figura 9).

5.4.2 48 horas

No período de 48 horas de cultura foi verificada maior distribuição celular nos grupos Controle, AC15, AC30, AC60 e TCN60. Nos grupos desmineralizados com ácido cítrico houve recobrimento total da área pelas células, sendo perceptível uma sobreposição de camadas celulares. Todos os grupos apresentaram morfologia celular compatível com estágio de diferenciação mais avançado do que as do período anterior, com células mais achatadas com limites dificilmente distinguíveis e intercomunicantes através de filopodias. Algumas amostras de TCN15 e TCN30 apresentaram queda na proliferação celular, e em outras, foi visto o recobrimento total da área analisada (Figura 10).

Figura 10– Fotomicrografias eletrônicas de varredura de amostras representativas dos grupos de estudo após 48 horas de cultivo celular. A seta amarela no grupo controle mostra os prolongamentos citoplasmáticos mais acentuados. As setas amarelas do grupo AC15 e AC30 indicam a sobreposição celular formando camadas. No TCN3 e TCN60, apontam áreas desnudas com deposição sais de tetraciclina. (MEV x 400)

5.4.3 72 horas

Após 72 horas em cultura, os pré-osteoblastos formavam múltiplas camadas em todos os grupos de estudo. O aspecto celular era mais achatado, os limites celulares eram imperceptíveis com prolongamentos citoplasmáticos fazendo conexões e estendendo-se ao longo de toda a superfície. Nos grupos desmineralizados por tetraciclina, ainda era possível observar áreas desprovidas de células com sais de tetraciclina depositados sobre as superfícies ósseas (Figura 11).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a desmineralização de superfícies ósseas, quer com ácido cítrico, quer com tetraciclina ácida, favoreceu o crescimento de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 sobre essas superfícies. Além disso, foi verificado que as células cultivadas passaram a apresentar características morfológicas compatíveis com estágios mais avançados de diferenciação do que aquelas cultivadas sobre superfícies ósseas não desmineralizadas. Estes resultados estão de acordo com achados prévios empregando ácido cítrico somente (REZENDE et al., 2015; SALMERON, 2015).

O povoamento precoce por células osteoblásticas em 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) e, por essa razão, foi alvo de estudo nesta pesquisa na qual a análise da porcentagem de área de superfície recoberta por células MC3T3-E1 (Tabela 2) deixa perceber superioridade dos grupos AC30, AC60 e TCN 15 nesse quesito já às 24 horas de cultura, embora sem diferença estatística com os grupos AC15 e TCN 30. Por outro lado, os resultados dos grupos TCN60 e controle foram surpreendentemente baixos. Esses resultados levam a supor que o emprego de ambos os agentes desmineralizantes antecipou fenômenos de adesão, crescimento e espalhamento celular nessas superfícies. Entretanto, 60 segundos de aplicação de tetraciclina na concentração usada, pode ter sido um tempo excessivamente longo de desmineralização e pode ter atrapalhado o crescimento e diferenciação celular. Uma provável explicação para esses resultados pode estar embasada em dados de outros pesquisadores que observaram que pigmentos residuais da tetraciclina incorporados à superfície óssea acarretam uma reação de tipo corpo estranho em lugar de neoformação óssea, interferindo na comunicação e expressão das BMPs e MMPs (MUTHUKURU; SUN, 2013; GOLUB et al., 1991).

De fato, efeito danoso da tetraciclina também foi observado por Rojas-Paulus (2016) em defeitos críticos realizados em calvária de ratos como visto no capítulo Revisão de Literatura desta dissertação, onde os resultados de preenchimento do defeito com partículas ósseas autógenas desmineralizadas por tetraciclina foram

inferiores até mesmo aos do grupo controle negativo (defeito mantido sem qualquer enxerto).

Outra possível explicação para os pobres resultados encontrados com a tetraciclina é que, sendo seu pH tanto mais baixo quanto maior é sua concentração, isto poderia não somente interferir na viabilidade celular (SAMPAIO et al., 2009) como também ocasionar precipitação por saturação de cristais de cloridrato de tetraciclina associado ao cálcio mobilizado pela desmineralização, conforme visto em várias amostras em cujas superfícies ósseas não cresceram células.

Com o tempo, as diferenças entre os grupos foram diminuindo no que se refere ao recobrimento das superfícies por pré-osteoblastos. Como visto, às 48 horas foi mantida a superioridade dos grupos tratados por ácido cítrico, sem diferença estatística com TCN15 e TCN30. Entretanto, os grupos TCN60 e controle diferiram significativamente, não entre si, mas em relação aos grupos tratados com ácido cítrico. Talvez, devido a eventos precoces ocasionados pela aplicação do ácido cítrico e pelos menores tempos de aplicação da tetraciclina (15 e 30 segundos), foi percebido um atraso na proliferação e espalhamento celular nos grupos TCN 60 e controle. Às 72 horas, no entanto, todos os grupos se nivelaram na interpretação estatística, mas numericamente, os grupos tratados com ácido cítrico mostraram área de recobrimento maior do que os tratados por tetraciclina.

Um dado interessante a ser comentado é que as porcentagens de recobrimento das superfícies ósseas aqui encontradas foram bem superiores às publicadas por Rezende et al. (2015), que empregaram ácido cítrico a 50% (pH1) em diferentes tempos de aplicação. Seus resultados após 15 e 30 segundos de desmineralização foram de cerca de 30% e 40% respectivamente às 24 horas de cultura; 34% e 44% respectivamente às 48 horas de cultura; 70% e 72% respectivamente às 72 horas de cultura. Por outro lado, nesta dissertação, usando a concentração de 10% do ácido cítrico, o recobrimento foi muito superior em todos os tempos de cultura, tendo ocorrido o mesmo com a tetraciclina. Supõe-se que o fator concentração do ácido possa ter sido responsável pelos melhores resultados aqui alcançados.

A desmineralização com tetraciclina produziu efeitos de certa forma contrastantes com os de Schwartz et al. (2000), embora esses autores tenham estudado o efeito da desmineralização com tetraciclina supersaturada sobre superfícies de dentina. Em seu estudo foi avaliado o comportamento de osteoblastos

de osteossarcoma humano cultivados sobre superfícies de dentina polidas, tratadas por tetraciclina, ou por osteoclasia natural. Foi observado aumento de 75% na proliferação celular sobre superfícies tratadas com tetraciclina em relação às polidas. Os autores verificaram também que a desmineralização produziu rugosidades superficiais que mimetizaram as ocasionadas pela osteoclasia natural, com a vantagem de produzir esse efeito de forma uniforme sobre toda a superfície. Essa rugosidade teria influenciado a diferenciação celular já que a superfície rugosa é “reconhecida” pela célula como substrato favorável à diferenciação (BRUNETTE, 1986). A avaliação da rugosidade não foi alvo de estudo nesta pesquisa, mas o será em investigações futuras.

Estudos prévios da equipe de pesquisadores da Disciplina de Periodontia da FOB (USP) verificaram que pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre superfícies de osso fresco desmineralizado com ácido cítrico nas concentrações de 10 % e 50 % (pH 1) causaram maior recobrimento das superfícies pelas células, não apenas por serem mais numerosas, mas por adquirirem forma mais plana e achatada, com bordos indefinidos e várias conexões entre as células, morfologia esta, compatível com estágios de diferenciação avançada (REZENDE, 2015 ; SALMERON, 2015)..

Em concordância com os estudos anteriores já citados, ficou aqui demonstrado que sobre superfícies ósseas desmineralizadas, as células apresentaram morfologia mais espalhada e achatada com prolongamentos citoplasmáticos mais alongados conectando uma célula à outra, quase sem espaços entre elas. No grupo controle, a aparência após 24 horas era de células menores, arredondadas, com poucos prolongamentos citoplasmáticos e distribuição difusa sobre as superfícies. O mesmo comportamento celular foi relatado por Salmeron (2015), que salientou que 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). A autora destacou também que, em resposta ao microambiente, as células mudam constantemente seu fenótipo através de suas integrinas de membrana as quais processam a informação extracelular e se ligam a proteínas existentes na superfície para estabelecer sítios de adesão (SIEBERS et al., 2005; GARCÍA, 2005).

Outro aspecto que contribui para explicar a diferenciação celular antecipada é a alteração da composição química e da topografia superficial potencialmente

promovida pela desmineralização (URIST et al., 1965; URIST et al., 1968; SALMERON, 2015, Schwartz ,2000 (SCHWARTZ et al., 2000; DODDS et al., 1995; REZENDE et al., 2014).

Optou-se pela análise da composição química superficial após a desmineralização por serem os osteoblastos, células sensíveis à composição iônica e à cristalinidade da superfície (HAMBLETON et al., 1994). Os dados coletados da EDS demonstraram que a %A de C aumentou em todos os grupos após a desmineralização, ainda que de forma não significativa. De forma indireta, é possível concluir quanto a uma certa neutralidade de ambos os agentes químicos sobre em moléculas contendo íons C, abundantes em qualquer tecido vivo, principalmente quando esse dado é associado ao aumento do oxigênio no grupo AC15, grupo que pareceu apresentar o melhor comportamento em todos os aspectos nesta dissertação. Às mesmas conclusões chegou Salmeron (2015) ao analisar a composição química de superfícies ósseas desmineralizadas por ácido cítrico a 10% e 50% por 30 segundos quanto aos mesmos elementos. Já ao se analisar o conteúdo de Na nas superfícies, não era de se esperar aumento, mas sim diminuição após a desmineralização. Como houve aumento significativo e semelhante do Na entre os grupos após a desmineralização, especula-se que esse evento possa estar relacionado à lavagem das amostras com soro fisiológico que contém esse elemento em abundância. Por essa razão cogita-se empregar lavagem com água destilada deionizada estéril como foi feito no trabalho de Schwarz et al. (2000) em estudos futuros, ainda que a presença de íons Na sobre a superfície óssea seja irrelevante do ponto de vista clínico.

Não houve alteração significativa nos conteúdos de P e Mg após a desmineralização quer com AC, quer com TCN. Como o P compõe numerosas moléculas que fazem parte da estrutura do tecido ósseo, desmineralizado ou não (REZENDE et al., 2015), a não alteração de seu conteúdo pode também significar provável neutralidade dos agentes desmineralizantes sobre essas moléculas. Já o elemento Mg, é mitogênico para células ósseas (RUDE; SINGER; GRUBER, 2009). Foi demonstrada interação de osteoblastos com o Mg pelo aumento de seus receptores integrina para aumentar a adesão celular e a formação óssea (ZREIGAT et al., 2002). Neste estudo, a %A de Mg não foi alterada com a desmineralização e este dado contrasta com um estudo prévio realizado nas mesmas condições desta dissertação (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, os autores levantaram, 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 estimulador 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 pelas células osteoblásticas SaOS-2 e bloqueia a diferenciação como detectado pela medição da atividade da ALP (LEIDI et al., 2011). Ainda quanto ao elemento Mg, os resultados aqui apresentados diferem também dos apresentados por Salmeron (2015), que verificou diminuição do íon depois da desmineralização tanto empregando ácido cítrico a 10% como na concentração de 50%. Assim sendo, reputa-se de significativo valor o fato de que na presente dissertação nenhuma alteração tenha sido verificada com relação a esse elemento químico, já que a desmineralização não interferiu no contingente normal de Mg do osso e, portanto, não perturbou os mecanismos de diferenciação celular.

Como a desmineralização mobiliza íons Ca da matriz orgânica, era de se esperar uma acentuada diminuição na %A de Ca após a desmineralização (REZENDE et al., 2014; SALMERON, 2015). Entretanto, a %A desse elemento aumentou significativamente em todos os grupos. Não foi possível encontrar uma explicação razoável para esse resultado, mas em face da presença relativamente frequente de depósitos cristalizados sobre as superfícies, especula-se que a lavagem com soro fisiológico pode ter sido insuficiente em algumas amostras. Além disso, íons Ca mobilizados pela desmineralização podem ter formado sais resultantes da reação com os agentes desmineralizantes, produzindo citratos de cálcio e cloretos de cálcio que se precipitaram sobre as superfícies (AMARAL et al., 2011).

O grupo de pesquisa em que se insere esta dissertação tem sido questionado informalmente quanto ao potencial efeito deletério do baixo pH das soluções usadas como agentes desmineralizantes sobre o crescimento celular em cultura, sob a alegação de que, ainda que seja recomendada a lavagem profusa do agente desmineralizante, resquícios das soluções ácidas podem permanecer sobre a superfície óssea. Por essa razão, uma análise do pH do meio de cultura no qual se

encontravam as amostras com as células plaqueadas foi efetuada neste estudo. Sabe-se que o pH do fluido extracelular normal é de 7,4 (TEITELBAUM, 2000), mas aceita-se que os meios de cultura devam apresentar idealmente pH entre 7,0 e 7,6 (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010). Embora tenha sido verificado pH levemente básico do meio de cultura no qual as amostras permaneceram por 24 horas (7,8 em média), esse pH foi diminuindo gradualmente até chegar aos níveis compatíveis com o fluido extracelular normal (entre 7,3 e 7,5). Demonstra-se desta forma que não se fundamenta a suspeita de um eventual efeito deletério produzido pela permanência das células em ambiente ácido.

A concentração das soluções ácidas empregadas na desmineralização de tecidos duros foram alvo predominantemente de estudos sobre dentina. Um recente estudo deste grupo de pesquisa verificou superioridade da concentração de 10% em relação à de 50% do ácido cítrico no crescimento de fibroblastos de ligamento periodontal humano cultivados sobre dentina desmineralizada (CABA-PAULINO, 2014). Já Salmeron (2015) não encontrou diferenças significantes no crescimento, espalhamento e diferenciação de pré-osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre superfícies ósseas desmineralizadas com ácido cítrico a 10% ou 50%, embora os resultados numéricos tenham sido superiores quando empregada a concentração de 10%. Esses resultados motivaram o emprego da concentração de 10% para o ácido cítrico nesta pesquisa.

No que se refere à concentração da tetraciclina hidrocloreada, 50mg/mL foram escolhidos tendo em vista os resultados de diversos estudos que empregaram esse mesmo agente em biomodificação radicular, em concentrações variando entre 50 e 100mg/mL, nos quais foram encontrados efeitos favoráveis como exposição de proteínas quimioatrativas da matriz dentinária, inibição da atividade de MMPs, inibição das coleagenases, inibição da reabsorção óssea, promoção da diferenciação de fibroblastos (PENMATSA et al., 2013; NAGATA et al., 2005; WIKESJÖ et al., 1986; ISIK et al. 2000; TROMBELLI et al., 1995; STERRET et al., 1997; TROMBELLI et al., 1996; ISHI et al., 2008). Entretanto, ainda não existem suficientes dados para definir a concentração ideal para utilização da TCN em superfícies ósseas.

Os resultados aqui apresentados reforçam que a desmineralização de superfícies ósseas pode ser um procedimento vantajoso em procedimentos cirúrgicos regenerativos, uma vez que acelera os eventos biológicos de adesão e diferenciação osteoblástica. Como os resultados de recobrimento superficial por

células foi muito semelhante entre os grupos AC30 e AC60, sugere-se o uso do tempo menor, levando-se em conta a racionalização do trabalho. Em face dos resultados obtidos, pode-se sugerir que estudos clínicos sejam executados empregando desmineralização óssea em procedimentos regenerativos com ácido cítrico a 10% durante 30 segundos, ou tetraciclina ácida a 50mg/mL durante 15 segundos, protocolos estes, que produziram melhor comportamento celular. Se bem-sucedidos, esses estudos teriam ampla aplicação em terapias envolvendo as áreas odontológicas de Periodontia e Cirurgia Bucomaxilofacial e áreas médicas como Ortopedia e Cirurgia Plástica.

7 Conclusão

7 CONCLUSÕES

7.1 Conclusão geral:

Com base nos resultados alcançados pode-se concluir que a desmineralização de superfícies ósseas por ácido cítrico a 10% ou tetraciclina a 50mg/mL promoveu o crescimento e o aspecto morfológico de diferenciação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas nessas superfícies, especialmente quando usados por 30 e 15 segundos respectivamente.

7.2 Conclusões específicas:

- a. Às 24 horas de cultura, apenas os grupos TCN60 e controle foram significativamente inferiores aos demais no que se refere à área de superfície recoberta por células. Às 48 horas de cultura esses mesmos grupos equipararam-se aos demais grupos que empregaram TCN, mas mantiveram-se significativamente inferiores aos que empregaram ácido cítrico quanto ao mesmo parâmetro. Às 72 horas não houve mais diferença entre os grupos em relação à área de cobertura por células;
 - b. A morfologia celular em amostras ósseas tratados por ácido cítrico ou tetraciclina em todos os tempos de aplicação e cultura mostrou-se compatível com estágios mais avançados de diferenciação do que nas amostras não desmineralizadas;
 - c. A análise da composição química superficial demonstrou que, após a desmineralização óssea não ocorrem alterações capazes de causar prejuízo aos eventos biológicos e celulares envolvidos no reparo ósseo.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADDISON, W. N.; NELEA, V.; CHICATUN, F.; CHIEN, Y. C.; TRAN-KHANH, N.; BUSCHMANN, M. D.; NAZHAT, S. N.; KAARTINEN, M. T.; VALI, H.; TECKLENBURG, M. M.; FRANCESCHI, R. T.; MCKEE, M. D. Extracellular matrix mineralization in murine MC3T3-E1 osteoblast cultures: an ultrastructural, compositional and comparative analysis with mouse bone. **Bone**, v. 71, n., p. 244-256, 2015.

AI-AQL, Z. S.; ALAGL, A. S.; GRAVES, D. T.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **J Dent Res**, v. 87, n. 2, p. 107-118, 2008.

ALLARD, R. H.; LEKKAS, C.; SWART, J. G. Autologous versus homologous bone grafting in osteotomies, secondary cleft repairs and ridge augmentations: a clinical study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 64, n. 3, p. 269-274, 1987.

AMARAL, N. G.; REZENDE, M. L.; HIRATA, F.; RODRIGUES, M. G.; SANT'ANA, A. C.; GREGHI, S. L.; PASSANEZI, E. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 5, p. 469-475, 2011.

ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.S. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35(2): p. 191-98, , 2006.

ARAUJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 2, p. 212-218, 2005.

ARNOTT, J. A.; NUGLOZEH, E.; RICO, M. C.; ARANGO-HISIJARA, I.; ODGREN, P. R.; SAFADI, F. F.; POPOFF, S. N. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a downstream mediator for TGF-beta1-induced extracellular matrix production in osteoblasts. **J Cell Physiol**, v. 210, n. 3, p. 843-852, 2007.

BAKER, D. L.; STANLEY PAVLOW, S. A.; WIKESJO, U. M. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 6, p. 561-566, 2005.

BEHL, Y.; SIQUEIRA, M.; ORTIZ, J.; LI, J.; DESTA, T.; FAIBISH, D.; GRAVES, D. T. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8711-8718, 2008.

BERGENHOLTZ, A.; BABAY, N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 18, n. 2, p. 171-179, 1998.

BLOMLOF, J.; LINDSKOG, S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. **Eur J Oral Sci**, v. 103, n. 1, p. 17-24, 1995.

BLOMLOF, J. P.; BLOMLOF, L. B.; LINDSKOG, S. F. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. **J Periodontol**, v. 67, n. 9, p. 841-845, 1996.

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

BOWERS, G. M.; CHADROFF, B.; CARNEVALE, R.; MELLONIG, J.; CORIO, R.; EMERSON, J.; STEVENS, M.; ROMBERG, E. Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III. **J Periodontol**, v. 60, n. 12, p. 683-693, 1989.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BOYNE, P. J. The use of marrow-cancellous grafts in the regeneration of mandibular bone. **Trans Int Conf Oral Surg**, v. 4, n., p. 58-63, 1973.

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

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin Orthop Relat Res**, v., n. 174, p. 28-42, 1983.

BUSER D, BRÄGGER U, LANG NP, NYMAN S. Regeneration and of jaw bone using guided tissue regeneration. *Clin Oral Implants Res*. 1990;1(1):22-32

BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, U.; HIRT, H. P.; BERTHOLD, H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. **Int J Periodontics Restorative Dent**, v. 13, n. 1, p. 29-45, 1993.

CABA-PAULINO C.E. 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

CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 809-818, 2003.

CAWOOD, J. I.; HOWELL, R. A. Reconstructive preprosthetic surgery. I. Anatomical considerations. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 20, n. 2, p. 75-82, 1991.

CHAN, G. K.; DUQUE, G. Age-related bone loss: old bone, new facts. **Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 62-71, 2002.

CHANDRA, R. V.; JAGETIA, G. C.; BHAT, K. M. The attachment of V79 and human periodontal ligament fibroblasts on periodontally involved root surfaces following treatment with EDTA, citric acid, or tetracycline HCL: an SEM in vitro study. **J Contemp Dent Pract**, v. 7, n. 1, p. 44-59, 2006.

COÊLHO, J. D. C. A. Parâmetros biofísicos, bioquímicos e imunohistoquímicos de fêmures de *Rattus norvegicus albinus* em diferentes idades para padronização de valores de referência estática e dinâmica [Tese]. Araçatuba (SP): Faculdade De Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, 2013.

COMARCK, D. H. Ham's Histology. In: Lippincott, J. B. (Ed.). **Bone**: Philadelphia, 1987, p.273-323.

DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.

DOMINGUES R.S. 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

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p. 1392-1404, 2005.

DODDS, R. A.; CONNOR, J. R.; JAMES, I. E.; RYKACZEWSKI, E. L.; APPELBAUM, E.; DUL, E.; GOWEN, M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. **J Bone Miner Res**, v. 10, n. 11, p. 1666-1680, 1995.

FAVERANI, L. P.; RAMALHO-FERREIRA, G.; DOS SANTOS, P. H.; ROCHA, E. P.; GARCIA JUNIOR, I. R.; PASTORI, C. M.; ASSUNCAO, W. G. Surgical techniques for maxillary bone grafting - literature review. **Rev Col Bras Cir**, v. 41, n. 1, p. 61-67, 2014.

FENG, X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. **Curr Chem Biol**, v. 3, n. 2, p. 189-196, 2009.

GALEA, G.; KEARNEY, J. N. Clinical effectiveness of processed and unprocessed bone. **Transfus Med**, v. 15, n. 3, p. 165-174, 2005.

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

GARRETT, J. S.; CRIGGER, M.; EGELBERG, J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. **J Periodontal Res**, v. 13, n. 2, p. 155-163, 1978.

GIANNOBILE, W. V. R., H.F; LANG, N.P. O Tecido Ósseo. In: Lindhe J, LangN.P. Karring T. Tratamento de periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5a ed. Rios de janeiro : Editora Guanabara Koogab LTDA; 2010. p 83-95. v., n., p., 2010.

GORDH, M.; ALBERIUS, P.; JOHNNELL, O.; LINDBERG, L.; LINDE, A. Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting. **Plast Reconstr Surg**, v. 103, n. 7, p. 1909-1918, 1999.

HAMBLETON J.C, SCHWARTZ Z, KHARE A, WINDELER S.W, LUNA M, BROOKS B.P, et al. Culture surfaces coated with various implant materials affect chondrocyte growth and metabolism. *J Orthop Res*. 1994;12(4):542-52.

HOROWITZ, M. C.; XI, Y.; WILSON, K.; KACENA, M. A. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 12, n. 1, p. 9-18, 2001.

ISHI, E. P.; DANTAS, A. A.; BATISTA, L. H.; ONOFRE, M. A.; SAMPAIO, J. E. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. **J Contemp Dent Pract**, v. 9, n. 5, p. 25-33, 2008.

ISIK, A. G.; TARIM, B.; HAFEZ, A. A.; YALCIN, F. S.; ONAN, U.; COX, C. F. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. **J Periodontol**, v. 71, n. 2, p. 219-225, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KARSENTY, G.; WAGNER, E. F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. **Dev Cell**, v. 2, n. 4, p. 389-406, 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIM, H. M.; KIM, Y. S.; WOO, K. M.; PARK, S. J.; REY, C.; KIM, Y.; KIM, J. K.; KO, J. S. Dissolution of poorly crystalline apatite crystals by osteoclasts determined on artificial thin-film apatite. **J Biomed Mater Res**, v. 56, n. 2, p. 250-256, 2001.

LEIDI M; DELLERA F; MARIOTTI M; MAIER J.A. High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro. **Magnes Res**. 2011;24(1):1-6

LEITE, F. R.; SAMPAIO, J. E.; ZANDIM, D. L.; DANTAS, A. A.; LEITE, E. R.; LEITE, A. A. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. **Quintessence Int**, v. 41, n. 4, p. 341-349, 2010.

LINSLEY, C.; WU, B.; TAWIL, B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 11-12, p. 1416-1423, 2013.

LLOYD, S. A.; YUAN, Y. Y.; SIMSKE, S. J.; RIFFLE, S. E.; FERGUSON, V. L.; BATEMAN, T. A. Administration of high-dose macrophage colony-stimulating factor increases bone turnover and trabecular volume fraction. **J Bone Miner Metab**, v., n., p., 2009.

MAGINI, R. S. Enxertos ósseos no seio maxilar. Estética e função. São Paulo: Santos; 2006., v., n., p., 2006.

MARIOTTI, A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 205-226, 2003.

MASTERS, D. H. Implants. Bone and bone substitutes. **CDA J**, v. 16, n. 1, p. 56-65, 1988.

MATTILA PK, LAPPALAINEN P. FILOPODIA. Molecular architecture and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2008;9(6):446-54.

MAZZONETTO, R. Reconstrução em Implantodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade . Nova Odessa: Napoleão. v., n., p., 2008.

MCCAULEY, L. K.; NOHUTCU, R. M. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v. 73, n. 11, p. 1377-1391, 2002.

MELCHER, A. H. Biological processes in resorption, deposition and regeneration of bone. . In: **Stahl SS, ed. Periodontal surgery. Biologic basis and technique, vol. 1. Springfield: Charles C Thomas**, v. 99-120, n., p., 1976.

MINOCHA, T.; RAHUL, A. Comparison of fibrin clot adhesion to dentine conditioned with citric acid, tetracycline, and ethylene diamine tetra acetic acid: An in vitro scanning electron microscopic study. **J Indian Soc Periodontol**, v. 16, n. 3, p. 333-341, 2012.

MIRON, R. J.; HEDBOM, E.; SAULACIC, N.; ZHANG, Y.; SCULEAN, A.; BOSSHARDT, D. D.; BUSER, D. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. **J Dent Res**, v. 90, n. 12, p. 1428-1433, 2011.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde** 2010, v.2

MUTHUKURU, M.; SUN, J. Doxycycline counteracts bone morphogenic protein 2-induced osteogenic mediators. **J Periodontol**, v. 84, n. 5, p. 656-665, 2013.

NAGATA, M. J.; BOSCO, A. F.; LEITE, C. M.; MELO, L. G.; SUNDEFELD, M. L. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 908-914, 2005.

OBRADOVIC, R. R.; KESIC, L. G.; PESEVSKA, S. Influence of low-level laser therapy on biomaterial osseointegration: a mini-review. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 3, p. 447-451, 2009.

PEARSON, B. S.; KLEBE, R. J.; BOYAN, B. D.; MOSKOWICZ, D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. **J Dent Res**, v. 67, n. 2, p. 515-517, 1988.

PENMATSA, T.; VARMA, S.; MYTHILI; RAO, K. P.; KISHORE, T.; BINDU, H. Effect of various concentrations of tetracycline hydrochloride demineralization on root

dentin surface: A scanning electron microscopic study. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 5, n. Suppl 1, p. S48-53, 2013.

PHILLIPS, A. M. Overview of the fracture healing cascade. **Injury**, v. 36 Suppl 3, n., p. S5-7, 2005.

PHILLIPS, J. H.; RAHN, B. A. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. **Plast Reconstr Surg**, v. 82, n. 5, p. 872-877, 1988.

PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. **Photomed Laser Surg**, v. 24, n. 2, p. 169-178, 2006.

POLSON, A. M.; PROYE, M. P. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. **J Periodontol**, v. 54, n. 3, p. 141-147, 1983.

REGISTER, A. A.; BURDICK, F. A. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized in situ. I. Optimum range. **J Periodontol**, v. 46, n. 11, p. 646-655, 1975.

REZENDE, M. L.; CONSOLARO, A.; SANT'ANA, A. C.; DAMANTE, C. A.; GREGHI, S. L.; PASSANEZI, E. Demineralization of the contacting surfaces in autologous onlay bone grafts improves bone formation and bone consolidation. **J Periodontol**, v. 85, n. 5, p. e121-129, 2014.

REZENDE, M.L; COESTA P.T; OLIVEIRA R.C; SALMERON S; SANT'ANA A.C, DAMANTE C.A; et al. Bone demineralization with citric Acid enhances adhesion and spreading of preosteoblasts. **J Periodontol**. 2015;86(1):146-54.

RODRIGUES M.G.S, REZENDE M.L.R, SANTANA A.C.P, GREGHI S.L.A, DOMINGUES R.S, DAMANTE C.A, 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.

ROJAS-PAULUS, J. E. Efeito da desmineralização do enxerto ósseo autógeno particulado no reparo de defeitos críticos em calvária de ratos. Estudo microscópico e microtomográfico. **Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru,, v., n., p., 2016.**

ROODMAN, G. D. Cell biology of the osteoclast. **Exp Hematol**, v. 27, n. 8, p. 1229-1241, 1999.

ROSCHGER, P.; PASCHALIS, E. P.; FRATZL, P.; KLAUSHOFER, K. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone**, v. 42, n. 3, p. 456-466, 2008.

RUDE R.K; SINGER F.R; GRUBER H.E. 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.; BRESCHI, L. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2007.

SALIM, R. A.; SOUZA-SILVA, G. H.; MARZOLA, C. Reconstrução de maxila atrófica com enxerto de crista do osso ilíaco – Revista da literatura e apresentação de caso clínico-cirúrgico. **Rev Odontol.**, v. 10(1):871-86, n., p., 2007.

SALMERON, S. Efeito da desmineralização óssea sobre parâmetros de superfície e sobre o comportamento de pre-osteoblastos em cultura: estudo em microscopia eletrônica de varredura e confocal. **161 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru**, v., n., p., 2015.

SAMPAIO, J. E. C.; FONTANARI, L. A.; PINTO, S. C. S.; CAVASSIM, R. BIOMODIFICAÇÃO RADICULAR: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **R. Periodontia**, v. 19 - 04, n., p., 2009.

SANT'ANA, A. C.; MARQUES, M. M.; BARROSO, T. E.; PASSANEZI, E.; DE REZENDE, M. L. Effects of TGF-beta1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. **J Periodontol**, v. 78, n. 10, p. 2007-2017, 2007.

SCHWARTZ, Z.; LOHMANN, C. H.; WIELAND, M.; COCHRAN, D. L.; DEAN, D. D.; TEXTOR, M.; BONEWALD, L. F.; BOYAN, B. D. Osteoblast proliferation and differentiation on dentin slices are modulated by pretreatment of the surface with tetracycline or osteoclasts. **J Periodontol**, v. 71, n. 4, p. 586-597, 2000.

SCOTCHFORD, C. A.; CASCONI, M. G.; DOWNES, S.; GIUSTI, P. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. **Biomaterials**, v. 19, n. 1-3, p. 1-11, 1998.

SILVA, A. C.; MOURA, C. C.; FERREIRA, J. A.; MAGALHAES, D.; DECHICHI, P.; SOARES, P. B. Biological Effects of a Root Conditioning Treatment on Periodontally Affected Teeth - An In Vitro Analysis. **Braz Dent J**, v. 27, n. 2, p. 160-168, 2016.

SIMS, N. A.; MARTIN, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **Bonekey Rep**, v. 3, n., p. 481, 2014.

STERRETT, J. D.; BANKEY, T.; MURPHY, H. J. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. **J Clin Periodontol**, v. 20, n. 5, p. 366-370, 1993.

STERRETT, J. D.; SIMMONS, J.; WHITFORD, G.; RUSSELL, C. M. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 7, p. 457-463, 1997.

STEVENSON, S.; EMERY, S. E.; GOLDBERG, V. M. Factors affecting bone graft incorporation. **Clin Orthop Relat Res**, v., n. 324, p. 66-74, 1996.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TANG, Y.; WU, X.; LEI, W.; PANG, L.; WAN, C.; SHI, Z.; ZHAO, L.; NAGY, T. R.; PENG, X.; HU, J.; FENG, X.; VAN HUL, W.; WAN, M.; CAO, X. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. **Nat Med**, v. 15, n. 7, p. 757-765, 2009.

TEITELBAUM S.L. Bone resorption by osteoclasts, *Science* 289 (2000) 1504–1508

TERRANOVA, V. P.; MARTIN, G. R. Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. **J Periodontal Res**, v. 17, n. 5, p. 530-533, 1982.

TRIPLETT, R. G.; SCHOW, S. R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 54, n. 4, p. 486-494, 1996.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A.; ZANGARI, F.; GRISELLI, A.; WIKESJO, U. M.; CALURA, G. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. **J Periodontol**, v. 66, n. 8, p. 685-691, 1995.

TROMBELLI, L.; SCABBIA, A.; WIKESJO, U. M.; CALURA, G. Fibrin glue application in conjunction with tetracycline root conditioning and coronally positioned flap procedure in the treatment of human gingival recession defects. **J Clin Periodontol**, v. 23, n. 9, p. 861-867, 1996.

TRUUMEEES, E.; HERKOWITZ, H. N. Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery. **The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal** 12: 77–88, v., n., p., 1999.

TSIRIDIS, E.; UPADHYAY, N.; GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v. 38 Suppl 1, n., p. S11-25, 2007.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

URIST, M. R.; DOWELL, T. A.; HAY, P. H.; STRATES, B. S. Inductive substrates for bone formation. **Clin Orthop Relat Res**, v. 59, n., p. 59-96, 1968.

URIST, M. R.; HUO, Y. K.; BROWNELL, A. G.; HOHL, W. M.; BUYSKE, J.; LIETZE, A.; TEMPST, P.; HUNKAPILLER, M.; DELANGE, R. J. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 2, p. 371-375, 1984.

ZREIQAT H; HOWLETT C.R; 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

WIKESJO, U. M.; BAKER, P. J.; CHRISTERSSON, L. A.; GENCO, R. J.; LYALL, R. M.; HIC, S.; DIFLORIO, R. M.; TERRANOVA, V. P. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. **J Periodontal Res**, v. 21, n. 4, p. 322-329, 1986.

WIKESJO, U. M.; NILVEUS, R. E.; SELVIG, K. A. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. **J Periodontol**, v. 63, n. 3, p. 158-165, 1992.

Anexos

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 005/2014

Bauru, 26 de maio de 2014.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito da desmineralização óssea por tetraciclina e ácido cítrico sobre a composição química superficial e sobre o comportamento de pré-osteoblastos cultivados em osso da calvária de ratos**, de autoria de Gustavo Gonçalves do Prado Manfredi, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO COM RECOMENDAÇÃO *ad referendum* desta Comissão, nesta data.

Análise e parecer do relator:

*"Recomendações: a) No item 5.7 – constam os nomes comerciais das drogas ketamina (Anasedan, Vetbrands), xilasina (Dopalen, Vetbrands) e xilocaina a 2% com norepinefrina 1:50000, (Merrell Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda), **recomenda-se** acrescentar o nome da droga junto ao comercial e a dosagem utilizada como está no projeto; b) ainda no item 5.7 – Conferir o uso da droga xilocaina a 2% com norepinefrina 1:50000 (Merrell Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda), pois consta apenas no protocolo e não no projeto.*

Estando todos os procedimentos de acordo com o regimento da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais sou de parecer favorável à APROVAÇÃO com RECOMENDAÇÃO do referido projeto."

Considerando as recomendações não implicam em impedimentos éticos, a pesquisa pode ser iniciada, porém, os pesquisadores devem manifestar-se quanto ao parecer acima.

Atenciosamente,

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

Profª Drª Maria Lúcia Rubo de Rezende

Docente do Departamento de Prótese (Periodontia)

Tabelas da estatística da composição das superfícies ósseas antes e depois da desmineralização.

GRUPO		AC15	AC30	AC60	TCN15	TCN30	TCN60	All Grps
C-antes	Mean	58,93000	62,67333	62,32000	62,09000	59,07667	61,62667	61,11944
C-antes	N	3	3	3	3	3	3	18
C-antes	Std.Dev.	6,629306	2,646816	4,846741	1,557819	8,186479	8,436625	5,270325
O-antes	Mean	32,32667	36,64667	36,65333	36,20000	39,37333	37,08667	36,38111
O-antes	N	3	3	3	3	3	3	18
O-antes	Std.Dev.	8,818845	2,703189	4,326180	2,160278	6,414120	6,935174	5,278148
Na-antes	Mean	0,193333	0,123333	0,126667	0,120000	0,196667	0,170000	0,155000
Na-antes	N	3	3	3	3	3	3	18
Na-antes	Std.Dev.	0,080829	0,015275	0,072342	0,040000	0,119304	0,105830	0,075712
Mg-antes	Mean	0,076667	0,050000	0,046667	0,030000	0,086667	0,065000	0,058824
Mg-antes	N	3	3	3	3	3	2	17
Mg-antes	Std.Dev.	0,051316	0,034641	0,025166	0,017321	0,056862	0,077782	0,042261
P-antes	Mean	0,803333	0,216667	0,320000	0,266667	0,730000	0,596667	0,488889
P-antes	N	3	3	3	3	3	3	18
P-antes	Std.Dev.	0,678552	0,086217	0,350000	0,236925	0,923418	0,839663	0,562054
Ca-antes	Mean	0,550000	0,060000	0,120000	0,126667	0,470000	0,366667	0,282222
Ca-antes	N	3	3	3	3	3	3	18
Ca-antes	Std.Dev.	0,478226	0,078102	0,181934	0,193477	0,711266	0,592312	0,417705
C-depois	Mean	62,59333	66,87000	66,16667	63,13667	60,40333	65,79333	64,16056
C-depois	N	3	3	3	3	3	3	18
C-depois	Std.Dev.	5,386143	1,732253	1,027148	0,831525	5,132644	3,219850	3,725087
O-depois	Mean	33,13333	31,94000	33,39000	34,17000	34,73667	32,81667	33,36444
O-depois	N	3	3	3	3	3	3	18
O-depois	Std.Dev.	3,836461	1,460582	0,883855	1,841630	3,380833	1,631206	2,235753
Na-depois	Mean	0,593333	0,740000	0,323333	0,213333	0,266667	0,273333	0,401667
Na-depois	N	3	3	3	3	3	3	18
Na-depois	Std.Dev.	0,577437	0,597746	0,234379	0,140119	0,032146	0,205994	0,367827
Mg-depois	Mean	0,080000	0,036667	0,010000	0,053333	0,100000	0,026667	0,051111
Mg-depois	N	3	3	3	3	3	3	18
Mg-depois	Std.Dev.	0,036056	0,055076	0,010000	0,040415	0,043589	0,025166	0,044969
P-depois	Mean	1,640000	0,166667	0,060000	1,110000	1,926667	0,700000	1,003125
P-depois	N	3	3	2	3	3	2	16
P-depois	Std.Dev.	0,481352	0,158219	0,028284	0,704486	1,390300	0,876812	0,966545
Ca-depois	Mean	1,916667	0,183333	0,026667	1,226667	2,453333	0,483333	1,048333
Ca-depois	N	3	3	3	3	3	3	18
Ca-depois	Std.Dev.	0,603020	0,242143	0,020817	1,004208	2,032101	0,743931	1,256542

Carbono	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	141255,7	1	141255,7	4808,196	0,000000
GRUPO	121,2	5	24,2	0,825	0,555359
Error	352,5	12	29,4		
TEMPO	83,2	1	83,2	4,571	0,053793
TEMPO*GRUPO	15,8	5	3,2	0,174	0,967325
Error	218,5	12	18,2		

Oxigênio	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	43779,98	1	43779,98	1740,949	0,000000
GRUPO	58,89	5	11,78	0,468	0,792789
Error	301,77	12	25,15		
TEMPO	81,90	1	81,90	5,998	0,030646
TEMPO*GRUPO	34,06	5	6,81	0,499	0,771610
Error	163,86	12	13,66		

Sódio	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	2,788900	1	2,788900	42,78730	0,000028
GRUPO	0,344633	5	0,068927	1,05747	0,429690
Error	0,782167	12	0,065181		
TEMPO	0,547600	1	0,547600	7,19396	0,019957
TEMPO*GRUPO	0,357267	5	0,071453	0,93870	0,490459
Error	0,913433	12	0,076119		

Magnésio	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0,100523	1	0,100523	56,51212	0,000012
GRUPO	0,018622	5	0,003724	2,09374	0,142662
Error	0,019567	11	0,001779		
TEMPO	0,000577	1	0,000577	0,32269	0,581408
TEMPO*GRUPO	0,004627	5	0,000925	0,51765	0,758182
Error	0,019667	11	0,001788		

Fósforo	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	15,94085	1	15,94085	26,54040	0,000430
GRUPO	6,98411	5	1,39682	2,32561	0,119953
Error	6,00626	10	0,60063		
TEMPO	1,42821	1	1,42821	3,75360	0,081428
TEMPO*GRUPO	2,31142	5	0,46228	1,21496	0,369665
Error	3,80493	10	0,38049		

Cálcio	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	15,93340	1	15,93340	23,99529	0,000367
GRUPO	9,96418	5	1,99284	3,00116	0,055145
Error	7,96827	12	0,66402		
TEMPO	5,28234	1	5,28234	9,62778	0,009141
TEMPO*GRUPO	5,29105	5	1,05821	1,92873	0,162926
Error	6,58387	12	0,54866		

Tabelas da estatística da porcentagem média de área recoberta por pré-osteoblastos cultivados sobre amostras ósseas

GRUPO	24 H	24 H	24 H	48 H	48 H	48 H	72 H	72 H	72 H
	Mean	N	Std.Dev.	Mean	N	Std.Dev.	Mean	N	Std.Dev.
AC15	60,38833	6	35,39900	100,0000	6	0,00000	100,0000	6	0,00000
AC30	99,32000	6	1,66565	100,0000	6	0,00000	100,0000	6	0,00000
AC60	99,22167	6	1,90652	100,0000	6	0,00000	100,0000	6	0,00000
TCN15	96,73833	6	5,80964	70,2433	6	42,79645	90,9583	6	10,34274
TCN30	64,72167	6	15,11083	57,4017	6	41,28604	82,1183	6	30,01422
TCN60	9,67833	6	9,66755	51,4568	6	35,11583	56,1583	6	35,48110
CONTROLE	5,99833	6	7,44758	31,8350	6	36,63334	100,0000	6	0,00000
All Grps	62,29524	42	40,59356	72,9910	42	37,65550	89,8907	42	22,62254

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	709865,1	1	709865,1	1867,066	0,000000
GRUPO	65998,2	6	10999,7	28,931	0,000000
Error	13307,1	35	380,2		
TEMPO	16261,1	2	8130,6	15,409	0,000003
TEMPO*GRUPO	30439,3	12	2536,6	4,807	0,000011
Error	36935,1	70	527,6		

GRUPO	TEMPO	DV_1	a	b	c	d	e
AC15	24 H	60,3883			****	****	****
AC30	24 H	99,3200					****
AC60	24 H	99,2217					****
CONTROLE	24 H	5,9983	****				
TCN15	24 H	96,7383				****	****
TCN30	24 H	64,7217			****	****	****
TCN60	24 H	9,6783	****	****			
AC15	48 H	100,0000					****
AC30	48 H	100,0000					****
AC60	48 H	100,0000					****
CONTROLE	48 H	31,8350	****	****	****		
TCN15	48 H	70,2433			****	****	****
TCN30	48 H	57,4017			****	****	****
TCN60	48 H	51,4568	****	****	****	****	
AC15	72 H	100,0000					****
AC30	72 H	100,0000					****
AC60	72 H	100,0000					****
CONTROLE	72 H	100,0000					****
TCN15	72 H	90,9583				****	****
TCN30	72 H	82,1183				****	****
TCN60	72 H	56,1583		****	****	****	****