UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

KELLEN CRISTINA DA SILVA GASQUE

O papel do flúor sobre linhagens de células osteoblásticas de camundongos com densidades ósseas distintas: estudo em MC3T3-E1, C3H/HeJ e C57BL/6J

BAURU

2012

KELLEN CRISTINA DA SILVA GASQUE

O papel do flúor sobre linhagens de células osteoblásticas de camundongos com densidades ósseas distintas: estudo em MC3T3-E1, C3H/HeJ e C57BL/6J

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas, sub-área Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

(VERSÃO CORRIGIDA)

BAURU

2012

Gasque, Kellen Cristina da Silva

G214p O papel do flúor sobre linhagens de células
osteoblásticas de camundongos com densidades ósseas
distintas: estudo em MC3T3- E1, C3H/HeJ e C57BL/6J

160páginas; 32 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

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

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

Assinatura:

Data: 21 de janeiro de 2013

Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da FOB-USP

Protocolos números 017/2009 e 03/2012

DEDICATÓRIA

A **Deus**,

Pela maravilha e harmonia da criação. Pela sua onisciência e onipresença, que nunca nos desampara e nos proporciona os melhores caminhos, mesmo que não compreendamos a princípio. Pela sua infinita misericórdia e justiça. Pelo seu Amor.

Aos **Mentores Espirituais**,

Muito obrigada por me intuírem coisas boas, por me mostrarem o caminho certo e por me ampararem nos momentos difíceis. Por me intuírem tantas coisas boas e me ajudarem nessa trajetória espiritual tão maravilhosa. Vocês são um consolo para mim.

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe **Arlene**,

por ter me mostrado o caminho reto e do bem. Por me mostrar os valores morais e éticos essenciais. Pelo amor devotado.

À minha querida avó **Apparecida Cardoso**,

por todo amor e dedicação e por estar sempre ao meu lado, incondicionalmente. Jamais encontrei alguém mais sábio e bondoso nesse mundo.

Ao meu irmão **Junior**,

Pelo apoio em todos os momentos, por me tornar uma pessoa melhor sempre. Pelo seu Amor.

Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela,
mas há também aqueles que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.

Pablo Picasso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor **Rodrigo Cardoso de Oliveira,**

Pela orientação desse trabalho e durante todo o doutorado. Obrigada por permitir que eu pudesse me desenvolver sobremaneira, tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

À Professora **Marília Afonso Rabelo Buzalaf,**

Por toda a ajuda nos momentos difíceis e por ser um exemplo de dedicação ao trabalho. Pelos muitos conselhos pessoais e profissionais.

À Professora **Ana Carolina Magalhães,**

Por ter me dado apoio no momento mais complicado de meu doutorado. Pela amizade e compreensão. Por ter me ensinado uma forma muito interessante de ensinar e orientar, que pretendo utilizar como modelo quando tiver que orientar outros alunos ou funcionários a conduzir pesquisas científicas.

Felicidade!
É inútil buscá-la
em qualquer outro lugar que não seja
no calor das relações humanas...
Só um bom amigo
pode levar-nos pela mão e nos libertar.

Saint Exupéry

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À querida Professora **Camila Perez Buzalaf** ,

Obrigada por toda ajuda profissional e pessoal durante todo o doutorado. Foi uma honra ter trabalhado com você e ter podido aprender muito, não somente de Biologia Óssea e Cultura de Células, mas principalmente sobre dedicação, persistência e humildade. Com você aprendi que podemos ensinar, ajudar e aprender, sempre de maneira doce e educada. Você nunca precisou exigir respeito, pois sua conduta nos leva a respeitá-la desde a primeira conversa. Você é um exemplo de ser humano e de profissional. Seu sucesso já é realidade, mas tenho certeza de que Deus tem MUITO mais guardado pra você.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Heitor Marques Honório**, pelo carinho e solidariedade com que demonstrou ao realizar a Análise Estatística desse trabalho.

à **FAPESP**, pela bolsa (2009/07289-0) e auxílios (2010/14984-4 e 2010/18934-1) indispensáveis ao desenvolvimento desse projeto.

ao **CIP (Centro Integrado de Pesquisa)**, por formarem uma equipe coesa, competente e sempre disposta a ajudar. Por propiciarem um ambiente harmônico e profissional.

ao **Biotério** da FOB-USP, e todos os seus funcionários por todo cuidado, atenção e carinho dedicados ao meu Projeto e aos filhotes.

À **Central de Esterilização da FOB-USP**, por terem cuidado de todo o material dessa pesquisa com muito carinho e cuidado.

À especialista de laboratório e amiga **Aline de Lima Leite**, pela dedicação e cuidado com o Laboratório de Bioquímica Obrigada pela amizade, sobretudo nos momentos mais difíceis dessa etapa.

Eu poderia suportar, embora não sem dor,
que tivessem morrido todos os meus amores,
mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!

Vinícius de Moraes

AGRADECIMENTOS

Ao querido Professor **Gustavo P. Garlet** por ser um exemplo de docente e pesquisador. Por ser um líder que leva o aluno a pensar, raciocinar e criticar. Levo comigo as experiências vividas.

À amiga **Melissa Thiemi Kato** pela amizade verdadeira e pela sinceridade. Por ser um exemplo de conduta ética e moral. Simplesmente por saber que você está aí sempre.

Aos amigos **Luís Tarcísio Bannwart Filho** e **Celso Garcia** por torcerem e me incentivarem sempre. A amizade de vocês é um tesouro pra mim. Seus diversos conselhos me foram muito valiosos!

Às queridíssimas **Senda Charone, Cristiane Baldini, Heloísa Aparecida Pereira, Cínthia Maria Souza e Silva** pela amizade e por compartilharmos alegrias, tristezas, disciplinas, bebês, maridos, ex-namorados e superarmos e aproveitarmos tudo sempre juntas.

Aos queridos **Juliano Pelim Pessan, Flavia Mauad Levy e Flávia Zaidan** pela amizade e carinho e por todas as gargalhadas que tornaram minha vida mais leve (pelo menos a vida).

Aos queridos **Rafaela Alves da Silva Alavarce, Marcelo Milanda Ribeiro Lopes, Renato Murback, Marcia Zardin Graeff**, dona **Neusa Caetano** e professor **Vinicius Carvalho Porto** por propiciarem um ambiente de trabalho harmônico e organizado, pelo carinho nos momentos complicados e por compartilharmos tantas alegrias. Com certeza, sentirei saudades.

Aos amigos **Ana Sílvia Oliveira, Luciana Quintino da Silva, Renata Grangel e Geraldo Rodrigues** pela amizade e incentivo. Por serem alguém em quem sempre pude confiar.

À **Mariana Santesso Rodrigues**, pela amizade sincera e desinteressada e por ser um exemplo de humildade e dedicação. Aprendi muito nesses meses que trabalhamos juntas.

Aos alunos de Iniciação científica, **Luana Poloni Al-Ahaj, Laís Pieroni, Camila Slompo, Ana Flávia Soares, Thamara Frascarelli, Luiz Leonardo Saldanha, Felícia Miranda, Erica Priscila Fernandes e Luiz Felipe Rodrigues Carrara** pela troca de experiências pessoais e por me tornarem uma pessoa melhor profissionalmente.

Às queridas caroletes **Priscila M.A. Salomão e Livia Comar** pela amizade e troca de experiências e por tantas horas divertidas que passamos juntas.

Ao querido **Luiz Carlos da Silva**, técnico do Bioterio da FOB-USP, pelo carinho, pela prontidão, por tornar a tarefa com os filhotes muito mais tranquila.

Aos queridos técnicos **Thelma Lopes da Silva, Ovídio dos Santos e Larissa Grizzo** por todo o carinho e por facilitarem nosso trabalho no laboratório central da Bioquímica. Por encontrarem alternativas para nossos problemas cotidianos e pelas palavras de estímulo e incentivo. Pelo suporte.

Aos queridos amigos da Patologia, **Heliton Lima, Karen Pinke, Magda Paula Pereira do Nascimento e Ana Regina Casaroto**, pelo convívio diário harmônico, sério e ao mesmo tempo divertido. Sentirei falta das jornadas triplas, do feriados e dos finais de semana que vocês ajudavam a ficarem mais leves.

Aos queridos **Bruno Zarela, Lucas Fedamede, Milene Fernandes e Aline Lima Leite, Maria Cecília Freitas, Flávia Iano e Renato Martins** pela companhia e pela amizade. A assiduidade de vocês ao trabalho é um exemplo a todos nós.

À professora **Carla Damante** pela troca de experiências, por me ajudar nos procedimentos com cultura de células. Por todo cuidado.

As queridas **Alessandra Cury Machado, Flavia Amadeu, Adriana Arruda Matos e Camila Roque** por tantas trocas de experiência de vida e profissional. Pelo carinho e amizade.

EPÍGRAFE

**“Todo sopro que apaga uma chama,
reascende o que for pra ficar”**

O Teatro Mágico

RESUMO

Sabe-se que o flúor causa alterações químicas e celulares no osso, dependendo da dosagem e do tempo de exposição a esse elemento. Já foi demonstrado que alterações clínicas importantes, como a osteoporose, osteopetrose e esclerose óssea, podem ser geradas pela ingestão de flúor. Sabe-se que o flúor pode guiar os osteoblastos ao crescimento, sob doses e tempos de exposição específicos. A sensibilidade dos tecidos mineralizados ao fluoreto responde a mecanismos genéticos inerentes a cada população. Dentro de uma mesma espécie, diferentes linhagens apresentam um comportamento distinto frente a esse fármaco. Durante várias décadas, os estudos com fluoretos resumiram-se ao fluoreto de sódio, amplamente utilizado na prevenção das cáries dentárias. Recentemente, outras fontes de fluoretos como TiF_4 e SnF_2 têm sido buscadas, com intuito de potencializar as vantagens desse elemento. Porém não existem estudos ainda sobre o efeito do AlF_3 sobre o tecido ósseo até a presente data. Desse modo, achamos oportuno investigar seu papel, quando administrado a células ósseas e para tal, investigamos a viabilidade e padrão de atividade das fosfatases desse sal (AlF_3) quando administrado às células da linhagem pré-osteoblástica MC3T3, em comparação ao NaF. Além disso, sabendo que diferentes células apresentam comportamento distinto ao tratamento com fluoretos, estudamos o papel do NaF quando administrado a duas linhagens celulares de camundongos com densidades ósseas distintas e com diferentes susceptibilidades ao fluoreto: C3H/HeJ e C57BL/6J (C3H e C57, alta e baixa densidades ósseas, respectivamente). As células também foram avaliadas quanto à viabilidade celular e ao perfil das fosfatases. Todos os resultados foram submetidos à Análise de Variância a três critérios e nos permitiu identificar que entre os sais de fluoreto, apenas o NaF promoveu alterações na viabilidade celular das células MC3T3. O AlF_3 não exerceu influência na atividade da fosfatase alcalina quando consideramos as células pré-osteoblásticas, no entanto, o efeito desse fluoreto sobre a atividade das fosfatases ácidas totais e ácida resistente ao tartarato ocorre de modo dicotômico. Quando consideramos uma população celular heterogênea, coletada de calvária, como foi o caso das linhagens C3H e C57, verificamos que o NaF interferiu tanto sobre a proliferação, quanto a atividade das fosfatases de modo bastante distinto para ambas linhagens celulares. Assim concluímos que o NaF é capaz de exercer efeitos mais diversificados em diferentes tipos celulares, alterando viabilidade celular e atividade de enzimas; em contrapartida, o AlF_3 produz efeitos mais específicos e delimitados em pré-osteoblastos.

Palavras-chave: fluoretos – C57BL/6J – C3H/HeJ – MC3T3-E1 – viabilidade – fosfatases

The role of fluoride on different osteoblastic cell line from different mice strains with distinct bone density: Study on MC3T3-E1, C3H/HeJ and C57BL/6J

ABSTRACT

It is well known that fluoride causes chemical and cellular alteration on bone tissue, depending on the dosage and time of exposure to this element. Several studies have been conducted to show that some bone diseases, such as osteoporosis, osteopetrosis and esclerosis, can occur as a consequence of the excessive fluoride uptake. Fluoride can lead osteoblast to proliferate, under certain conditions as time and dosage. The same way, excessive dosages of fluoride can alter protein activity in osteoblasts, by changing the expression of retated genes. Sensitivity of mineralized tissues to fluoride depends on a genetic background inherent to each population. Within the same specie, different lineages present distint behavior to the ingestion of this íon. Over several decades, many researches focused on the study of NaF as the only source of fluoride, once it is wide spread used to the prevention of dental caries. More recently, different sources of fluoride have been assessed, like TiF_4 e SnF_2 , with the main aim to enhance biochemical and physical benefits of this element. Despite of this, none of these formulations have been tested to evaluate their effect on the bone tissue. Thus, we believe it is advisable to investigate viability and phosphatases activities of pre-osteoblast MC3T3 cells treated with Aluminium fluoride, compared to NaF treatments. Besides this, facing the knowledge that different cell lines have distinct behavior when treated with fluoride, we used two inbred strains of mice with distint mineral bone densities, C3H/HeJ (C3H, high bone density) and C57BL/6J (C57, low bone density), to assess the viability and phosphatases activities after the treatment with NaF. Overall results were tested by 3 way- Anova. AlF_3 did not exhibit influence over on alkaline phosphatase when pre-osteoblast cells are considered, but the effect of this fluoride salt on the activity of total and tartarate resistant acid phosphatases occurs on a dicotomic way. When we consider a mixed cell population, collected from calvária as for the C3H and C57 assays, NaF did interfered as with the proliferation rate as phosphatase

activities on a very distinct fashion between the two lineages. Thus, it is possible to conclude that NaF is able to exert variable effects in different cell types and enzyme activities; on the other hand, AlF_3 effects are more specific and surrounded in pre-osteoblastic cells.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de nucleosídeos utilizados na suplementação do meio MEM para o cultivo das células da linhagem MC3T3	67
--	-----------

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Importância As características e clínica das fosfatases ácidas humanas	30
Figura 2. Linhagem Osteoblástica	34
Figura 3. Diferenciação das células tronco mesenquimais	35
Figura 4. Animais com diferentes densidades ósseas utilizados nesse estudo	62
Figura 5. Biotério e procedimentos cirúrgicos de coleta da calvária	64
Figura 6. Meio, antibiótico e antifúngico utilizados com as linhagens C3H e C57	66
Figura 7. Subcultivo celular	68
Figura 8. Contagem de células	69
Figura 9. MTT e os tratamentos	71
Figura 10. Dissolução dos cristais de formazana e espectrofotômetro	72
Figura 11. Aplicação do Vermelho Neutro	73
Figura 12. Reagentes e ensaio do Von Kossa	76

Figura 13. Ensaio da redução do MTT. Diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3	79
Figura 14. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3	84
Figura 15. Ensaio da Redução do MTT. Duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF	85
Figura 16. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de Na	86
Figura 17. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3	87
Figura 18. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3	89
Figura 19. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3	95
Figura 20. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF	96
Figura 21. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes	97

concentrações de NaF

Figura 22. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF 102

Figura 23. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF 103

Figura 24. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF 104

Figura 25. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF 105

Figura 26. Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo Controle 107

Figura 27: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo MO 108

Figura 28: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo 10^{-4} M de NaF 109

Figura 29: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo 10^{-5} M de NaF 110

ABREVIATÖES

AlF ₃	Trifluoreto de alumínio
ALP	fosfatase alcalina
AMP	monofosfato de adenosina, do inglês <i>adenosine monophosphate</i>
ANOVA	Análise da Variância
ATP	trifosfato de adenosina, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
BMPs	Proteínas Morfogénéticas Ósseas, do inglês <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
CaCl ₂ (anidro)	Cloreto de cálcio
Cbfa1	fator de ligação nuclear, subunidade 1, do inglês <i>core binding factor, subunit alpha-1</i>
D-17	Linhagem celular de osteosarcoma canino
DAN	Linhagem celular de osteosarcoma de cães
DBM	matriz óssea desmineralizada
DBSS	tampão de dissecação, do inglês <i>Dissection Buffer Salt Solution</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
HBSS	tampão de Hank, do inglês <i>Hank's Buffer Salt Solution</i>
HF	ácido fluorídrico
HOS	Linhagem celular de osteosarcoma humano

IGF-I	Fator de crescimento insulínico I, do inglês <i>Insulin growth factor – I</i>
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
MAPK	proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês, <i>mitogen activated protein kinase</i>
ME	meio de Expansão
MEM	Meio essencial mínimo de Eagle, do inglês <i>Minimum essential medium Eagle</i>
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MMTV	vírus do tumor mamário de camundongos
MO	meio osteogênico
MSC	Células mesenquimal indiferenciada, do inglês <i>Mesenchymal stem cell</i>
Msx2	Fator de transcrição da família homeobox do gene de segment muscular 2, do inglês <i>muscle segment homeobox transcription factor 2</i>
MTT	Sal de tetrazólio, do inglês dimetiltiazoldifeniltetrazolium
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Hidrogenofosfato dissódico heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
NaHCO ₃	Hidrogenocarbonato de sódio

NaOH	Hidróxido de sódio
NFAT2	fator nuclear para células T2 ativadas, do inglês nuclear factor for activated T cells)
OPG	Osteoprotegerina
OSes	elementos de ação cis específicos dos osteoblastos, do inglês <i>osteoblast-specific cis-acting elements</i>
PBS	Tampão salino fosfato, do inglês <i>phosphate buffer saline</i>
Pi	fosfato inorgânico
pNPP	para-nitrofenilfosfato
pNPPase	p-nitrofenilfosfatase
PTH	Hormônio Paratiroideano, do inglês <i>Parathyroid Hormone</i>
PTKs	Quinase da proteína tirosina do inglês <i>protein tirosin kinase</i>
QTLs	locos de características quantitativas
RANKL	Ligante de RANK, do inglês RANK ligand
RUNX2	fator de transcrição 2 relacionado ao domínio runt, do inglês <i>runt related transcription factor 2</i>
SAOS-2	Linhagem celular de osteosarcoma humano
SFB	Soro fetal bovino, do inglês <i>bovine fetal serum</i>
SiF ₄	tetrafluoreto de silício
SnF ₂	Fluoreto estanhoso
TGF	Fator de crescimento transformante, do inglês <i>transforming growth factor</i>

TGF β	Fator de Crescimento Transformante β , do inglês <i>Transforming Growth Factor β</i>
TiF ₄	Tetrafluoreto de titânio
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato, do inglês <i>Tartrate resistant acid phosphatase</i>
Tris HCl	Tris hidrocloreto
UMR-106	Linhagem celular de osteosarcoma de ratos
Wnts	Via de sinalização de fatores de transcrição de controle da via beta-catenina, do inglês <i>wingless</i>
β GP	beta-glicerol-fosfato, do inglês <i>beta-glycero-phosphate</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DE LITERATURA	32
2.1	Tecido Ósseo	32
2.2	O Osteoblasto	36
2.2.1	Controle da diferenciação dos osteoblastos	37
2.2.2	Os fatores de transcrição Cbfa1 (RUNX2) e OSTERIX	38
2.2.3	Células de calvária em cultura	40
2.3	Fosfatases	43
2.3.1	Fosfatase Alcalina	44
2.3.2	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato	46
2.4	Fluoretos	46
2.5	Fluoretos e Tecido Ósseo	49
2.6	Cultura de Células	53
2.6.1	Cultura Primária	53
2.6.2	Linhagens Celulares	54
2.6.3	Linhagem MC3T3-E1	55
2.7	Modelos animais	56
2.7.1	Camundongos isogênicos e camundongos isogênicos recombinantes	57
2.7.2	Linhagem C3H/HeJ	58
2.7.3	Linhagem C57BL/6J	58
3	OBJETIVOS	60
3.1	Objetivos Específicos	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	61

4.1 Grupos Experimentais	62
4.1.1 Animais C3H/HeJ e C57Bl/6J	62
4.2 Concentrações dos fluoretos	69
4.3 Etapa 1: Viabilidade de diferentes concentrações de fluoretos e de dois sais fluoretados	71
4.3.1 Viabilidade celular pela Redução do MTT	71
4.3.2 Viabilidade celular pela Incorporação do Vermelho Neutro	72
4.3.3 Viabilidade celular de dois sais fluoretados	73
4.3.4 Viabilidade de células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto	74
4.4 Etapa 2: Efeitos do fluoreto sobre o processo de mineralização	75
4.4.1 Análise das Fosfatases	75
4.4.2 Comprovação da Mineralização por Von Kossa	76
4.5 Análise Estatística	78
5 RESULTADOS	79
5.1. Viabilidade celular testando diferentes concentrações de fluoreto e de sais fluoretados	79
5.1.1 Viabilidade celular testando dois sais fluoretados	79
5.1.1.1 Redução do MTT	79
5.1.1.2 Incorporação do Vermelho Neutro	81
5.1.2 Viabilidade de células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto	81
5.1.2.1 Redução do MTT	81
5.1.2.2 Incorporação do Vermelho Neutro	82
5.2. Efeitos do fluoreto sobre o processo de mineralização	83
5.2.1 Ensaio das Fosfatases	83
5.2.1.1 Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina nas células tratadas com diferentes concentrações de sais fluoretados	83

5.2.1.2 Atividade enzimática da Fosfatase Ácida Total nas células tratadas em diferentes concentrações de sais fluoretados	88
5.2.1.3 Atividade enzimática da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato nas células tratadas nas diferentes concentrações de sais fluoretados	90
5.2.1.4 Fosfatase Alcalina nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto	91
5.2.1.4.1 Lisados	91
5.2.1.4.2 Sobrenadantes	92
5.2.1.5 Fosfatase Ácida Total nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto	93
5.2.1.5.1 Lisados	93
5.2.1.5.2 Sobrenadantes	98
5.2.1.6 Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto	99
5.2.1.6.1 Lisados	99
5.2.1.6.2 Sobrenadantes	100
5.2.2 Von Kossa	106
6 DISCUSSÃO	111
6.1 Efeito do F na viabilidade celular	111
6.2 Efeito do F nas fosfatases	115
7 CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

1 INTRODUÇÃO

Os osteoblastos são células depositoras de matriz óssea, cuja diferenciação resulta de uma sucessão de eventos de diferenciação a partir das células tronco mesenquimais até sua maturação, quando produzem e secretam os componentes estruturais dessa matriz óssea (por exemplo, colágeno tipo I) e liberam minerais, fatores de crescimento e enzimas (YIN e LI, 2006; DUCY et al., 2000), indispensáveis para a maturação e manutenção do tecido.

Após a deposição da matriz óssea pelos osteoblastos, ocorre a sua mineralização, como resultado da formação, desenvolvimento, remodelação ou reparação do tecido ósseo. Ou seja, esses eventos orquestrados ocorrem tanto fisiologicamente durante a formação e remodelação ósseas normais, quanto patologicamente em decorrência de traumas e doenças.

As vesículas de matriz liberadas pelos osteoblastos durante a mineralização são enriquecidas com diversas enzimas responsáveis pela maturação do cristal que foi formado dentro da célula e exportado dentro dessas vesículas.

Dentre essas enzimas, podemos citar uma enorme família que são as fosfatases. Possuem o papel de hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres, como as fontes de fosfato encontradas no tecido ósseo. Estas enzimas são divididas em 3 grupos principais: fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e proteínas fosfatases. As fosfatases ácidas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0. Contrastando com as fosfatases ácidas, as alcalinas apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 9,0 (AOYAMA et al., 2003).

O mecanismo de ação das fosfatases alcalinas no tecido ósseo ainda não foi totalmente elucidado, mas sabe-se que ela atua tanto diminuindo a concentração local de fosfato inorgânico, um promotor da mineralização, quanto diminuindo a concentração extracelular de pirofosfato, um inibidor da formação mineral. Está localizada ancorada à membrana plasmática na sua face externa e

na membrana das vesículas de matriz, através do glicofosfatidilinositol (GOLUB e BOESZE-BATTAGLIA, 2007).

Ainda existe muito mistério e controvérsia sobre o papel das fosfatases ácidas, embora níveis de Fosfatase ácida resistente ao tartarato detectados no sangue estejam associados com reabsorção óssea patológica. Em humanos, as fosfatases ácidas são encontradas em níveis baixos quando em situações normais, mas podem ser usadas como marcadores de determinadas doenças (Figura 1).

Importância clínica das fosfatases ácidas humanas							
Fosfatase ácida		Importância clínica e laboratorial					
Lisossomal (LAP)		Deficiência de LAP: desordem autossômica recessiva afetando o metabolismo					
Prostática (PAP)		Marcador sorológico de cancer de prostate Marcador no semen usado em medicina legal para os casos de abuso sexual					
Eritrocítica (EAP)		Susceptibilidade aumentada aos distúrbios de desenvolvimento Teste de Paternidade					
Macrofágica (MAP)		Doença de Gaucher: um erro de nascimento afetando o metabolismo de lipídios					
Osteoclástica (OCAP)		Metástase óssea Absorção óssea					
Características das fosfatases ácidas humanas							
Fosfatase ácida humana	Tecido/células de origem	M (kDa)	cromossomo	Sequência de aminoácidos	Homologia de aminoácidos	Resistência ao tartarato	Resistência ao fluoreto
Lisossomal (LAP)	Maioria das células	100	11	423	50% PAP	-	+
Prostática (PAP)	Próstata, cérebro, rins, fígado e plaquetas	100	3	345	50%LAP	-	+
Eritrocítica (EAP)	Eritrócitos e vários outros tipos	18	2	157	Não conhecida ainda	+	+
Macrofágica (MAP)	Macrófagos do fígado, rins e pulmão	37	19	325	Alta com OCAP	+	+

Osteoclástica (OCAP)	osso	37	19	325	Alta com MAP	+	-
M: massa molecular							

Figura 1. Importância clínica e características das fosfatases ácidas humanas. Traduzida de BULL et al., 2002.

O interesse em se analisar o papel do Flúor sobre o tecido ósseo, remonta há diversas décadas e a busca pela compreensão do papel do Flúor sobre o processo da mineralização óssea é incessante (FERNANDES et al., 2012; BUZALAF e WITHFORD, 2011; EVERETT et al., 2010; MOUSNY et al., 2008; QU et al., 2008; MOUNSY et al., 2006; QU e WEI, 2006; BUZALAF ET AL., 2004; RODAN ET AL., 2000; PROFFITT E ACKERMAN, 1964). Sabe-se que o flúor pode guiar os osteoblastos ao crescimento, sob doses e tempos de exposição específicos (STRUNECKA ET AL., 2007; FARLEY ET AL., 1983). Estudos já demonstraram que uma dose excessiva de flúor poderia afetar a síntese protéica nos osteoblastos, modificando a expressão dos genes relacionados (XU ET AL., 2008; QU E WEI, 2006). Ainda existe controvérsia na literatura com relação ao papel do flúor, pois nem sempre os trabalhos podem ser comparados. Diferenças no tempo de exposição, na dose e principalmente na origem do tecido exposto ao fluoreto leva a resultados distintos, dificultando a comparação entre as pesquisas.

Durante várias décadas, os estudos com fluoretos resumiram-se ao fluoreto de sódio, amplamente utilizado na prevenção das cáries dentárias (PESSAN ET AL., 2011B; BUZALAF E LEVI, 2011), embora outras fontes estivessem disponíveis. Recentemente, outras fontes de fluoretos como TiF_4 e SnF_2 têm sido buscadas, com intuito de se aproveitar ao máximo as vantagens bioquímicas e físicas desse elemento (COMAR ET AL., 2012; HE ET AL., 2012; WAHENGAM ET AL., 2011; FALLER ET AL., 2010).

Porém não existem estudos ainda sobre o efeito do fluoreto de alumínio sobre o tecido ósseo até a presente data. Os estudos com fluoreto de alumínio até o presente momento buscam avaliar o efeito do alumínio sobre outros tecidos não-ósseos (VARNER ET AL, 1998; VARNER ET AL., 1994; OKTE ET AL., 2012).

Assim, procuramos investigar uma nova fonte de flúor, o AlF_3 quando administrado a uma linhagem de células pré-osteoblásticas com relação à produção de matriz e viabilidade celular. Além disso, buscamos verificar se o fluoreto de sódio poderia interferir de modo distinto sobre a viabilidade e perfil de fosfatases de células osteoblásticas de linhagens de camundongos cujas densidades ósseas são diferentes entre si.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2. 1 Tecido Ósseo

A formação do tecido ósseo esquelético envolve a síntese de uma matriz extracelular orgânica e proteínas características do fenótipo ósseo que ocorre durante a diferenciação osteoblástica em etapas (RODA E NODA, 1991). A mineralização da matriz orgânica é regulada por uma combinação de eventos celulares incluindo a formação de vesículas de matriz, a síntese de moléculas de matriz e a regulação do balanço iônico, sendo esse processo sensível às mudanças no conteúdo extracelular de Ca^{+2} , Pi (fosfato inorgânico) e de outros fosfatos inorgânicos como AMP (monofosfato de adenosina, do inglês *adenosine monophosphate*), ATP (trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*) e β GP (beta-glicerol-fosfato, do inglês *beta-glycero-phosphate*) (Anderson e Morris, 1993).

Em muitas células da linhagem osteoblástica, como pré-osteoblastos e osteoblastos, e da linhagem condroblástica, como condrócitos cultivadas *in vitro*, a indução da mineralização exige a adição de β GP ao meio de cultura (ECAROT-CHARRIER ET AL., 1983; NEFUSSI ET AL., 1985; BELLOWS ET AL., 1986; ARONOW ET AL., 1990; ZIMMERMANN ET AL., 1992). Quando na ausência de β GP, a mineralização pode ser mantida se o meio de cultura estiver rico em Pi (ARONOW ET AL., 1990; WHITSON ET AL., 1992) ou quando o osso mineralizado já esteja presente (GRONOWICZ et al., 1989). O β GP acelera a taxa e extensão da mineralização da matriz extracelular (Gerstenfeld et al., 1987; Stein e Lian, 1993), além de um substrato comum para a fosfatase alcalina. Seu efeito sobre o metabolismo está intimamente relacionado aos altos níveis de fosfatase alcalina. β GP assim como Pi mostraram modular a atividade da fosfatase alcalina celular (LEE ET AL., 1992; ARONOW ET AL., 1990; FARLEY ET AL., 1994) cujo aumento expressa a modificação celular para um estado mais diferenciado (STEIN E LIAN, 1993).

Em cultura, a presença de β GP mostra a expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico como fosfatase alcalina, osteocalcina e colágeno tipo I e ocorre a formação de matriz mineralizante, com uma sequência de eventos e tempo similares ao que ocorre *in vivo* (NEFUSSI ET AL., 1989A; BELLOWS ET AL., 1986; ARONOW ET AL., 1990; COLLIN ET AL., 1992). O efeito de β GP mediado por fosfatase alcalina na mineralização foi investigado com relação às propriedades cinéticas da enzima sobre células intactas em pH fisiológico, na presença ou ausência de matriz mineralizada. Evidências diretas de que a principal ectoenzima envolvida na produção de Pi derivado do β GP seja a ectofosfatase alcalina, cujo nível e propriedades cinéticas não foram afetadas pelo Pi derivado de β GP ou pela mineralização mediada por β GP (ANAGNOSTOU et al., 1996). Além disso, o Pi foi capaz de mimetizar o efeito do Pi derivado de β GP sobre a incorporação de ^{45}Ca nas células, uma vez que a análise estrutural mostrou diferenças nos focos de mineralização.

Em estudos com osteoblastos removidos de calvária de camundongos, Ecarot-Charrier e colaboradores (1983) comprovaram o processo de mineralização *in vitro* produzido por essas células. Os osteoblastos, que foram mantidos na presença de glicerofosfato, mostraram depósitos minerais em torno de 5 a 6 dias de cultivo. Esses depósitos se mostraram como pontos brancos sobre a superfície da placa e coraram positivamente para von Kossa. Além disso, a microscopia eletrônica revelou a presença de um espaço extracelular com presença de cristais semelhantes à apatita intimamente associados às fibrilas colágenas, sugerindo que o local inicial de mineralização está associado com as vesículas da matriz extracelular.

Diferentemente da maioria das outras matrizes, a matriz óssea é fisiologicamente mineralizada e é constantemente renovada durante toda a vida do indivíduo, como uma consequência da remodelação óssea. Como um órgão, podemos considerar as cartilagens das articulações, as cartilagens calcificadas nas placas de crescimento dos ossos longos (durante o crescimento do indivíduo), o espaço medular, as regiões corticais e trabeculadas das estruturas

mineralizadas. Considerando-se apenas o tecido ósseo, é possível identificar os componentes mineralizados e não mineralizados (osteóide) das regiões corticais e trabeculadas dos ossos longos e chatos como seus componentes (ROBEY AND BOSKEY, 2008).

Figura 2. Linhagem Osteoblástica. Fonte: Askmir e colaboradores (2009) (Adaptado).

A hierarquia celular das células precursoras do osso é melhor compreendida se didaticamente dividirmos o processo de desenvolvimento das células precursoras em estágios, de acordo com o grau de diferenciação e comprometimento: células tronco mesenquimais, células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos, conforme **Figura 2**. Desse modo, torna-se possível caracterizar as subpopulações celulares, mas é necessário ressaltar que não existem limites entre uma linhagem celular e outra, havendo uma coexistência harmônica e profícua entre elas, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, nas culturas primárias.

As células tronco mesenquimais formam uma população pluripotente capaz de originar múltiplas linhagens celulares, como linhagem osteoblástica,

mioblástica, condrocítica e adipocítica (**Figuras 3**) (TAKADA ET AL., 2002). As células osteoprogenitoras são comprometidas com a linhagem osteoblástica, sendo responsáveis pela expansão dos osteoblastos e pela proliferação que ocorre em resposta a diversos fatores mitogênicos. Os pré-osteoblastos apresentam uma natureza transicional entre a célula osteoblástica diferenciada e sua progenitora (ZOHAR ET AL., 1997; PITTENGER et al., 1999).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela produção da matriz óssea e o estudaremos em mais detalhe no próximo item. Os osteócitos são células que encontram-se dentro de lacunas ou canalículos, cujas funções principais são homeostasia do cálcio, transdução de sinal e mecanorrecepção (ROSSER E BONEWALD, 2012; HAZENBERG et al., 2006).

Figura 3. Diferenciação das células tronco mesenquimais. Ilustração dos possíveis caminhos de diferenciação e comprometimento que a célula tronco mesenquimal (célula

progenitora pluripotente) pode seguir, dependendo dos estímulos fornecidos a ela. Esquema de TAKADA et al., 2009.

2.2 O Osteoblasto

Os osteoblastos diferenciados e não proliferativos são caracterizados por uma marcante atividade sintetizadora de matriz óssea, produzindo colágeno tipo I, proteoglicanas e osteocalcina, por exemplo (ASHTON ET AL., 1985; MARK ET AL., 1987; PRITCHARD, 1952; VAUGHAN ET AL., 1981). Os osteoblastos maduros, totalmente diferenciados apresentam muito mais glicogênio que as células imaturas (TAKAHASHI et al., 1986a).

Quando em cultura, os osteoblastos apresentam uma morfologia quase indistinguível dos fibroblastos, sendo que a única característica morfológica específica do osteoblasto está localizado fora da célula, ou seja, sua matriz extracelular mineralizada.

Não existe evidência de que a mineralização da matriz óssea seja coordenada por genes expressos seletivamente em osteoblastos. Relembrando que o tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, todos os genes expressos em fibroblastos também são expressos em osteoblastos (DUCY et al., 2000). Por outro lado, parece que apenas dois transcritos foram identificados como específicos dos osteoblastos: Cbfa1 (fator de ligação nuclear, subunidade 1, do inglês *core binding factor, subunit alpha-1*), recentemente denominado RUNX2 (fator de transcrição 2 relacionado ao domínio runt, do inglês *runt related transcription factor 2*), que atua como fator de transcrição (DUCY et al, 1997) e Osteocalcina, uma molécula inibidora da função osteoblástica (DUCY et al., 1996).

Durante o desenvolvimento embrionário, a diferenciação do osteoblasto pode ocorrer através de 2 vias distintas. Com exceção de certos ossos chatos, existe a formação de um molde cartilaginoso que precede a formação óssea. Conforme ocorre a invasão vascular no molde de cartilagem, os condrócitos

entram em apoptose e são substituídos pelos osteoblastos atraídos ao local (HORTON, 1993, CANCEDDA ET AL., 1995; WUTHIER ET AL., 1985). Esse processo é denominado ossificação endocondral (GUICHEUX et al., 2000). Por outro lado, nas condensações celulares prévias às formações dos ossos chatos como clavículas, mandíbulas, alguns ossos do crânio, as células mesenquimais indiferenciadas se diferenciam diretamente em osteoblastos. Nesse caso, temos a ossificação intramembranosa, que não inclui um molde cartilaginoso.

2.2.1 Controle da diferenciação dos osteoblastos

As células-tronco mesenquimais são células pluripotentes localizadas na medula óssea, nos músculos e tecido adiposo e podem se diferenciar em uma variedade de tecidos, incluindo-se o osso, cartilagem, músculo e células adiposas (CAPLAN E BRUDER, 2001; JIANG et al., 2002). A diferenciação para essas linhagens celulares é controlada por uma infinidade de citocinas que regulam a expressão de grupos de fatores de transcrição específicos para determinadas linhagens celulares.

Dentre as citocinas envolvidas na diferenciação osteoblástica estão: Hedgehogs, BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas, do inglês *Bone Morphogenetic Protein*) TGF β (Fator de Crescimento Tumoral β , do inglês *Tumor Growth Factor* β), PTH (Hormônio Paratiroideano, do inglês *Parathyroid Hormone*) e Wnts (do inglês *wingless*). As cascatas de transdução de sinal iniciadas por essas citocinas irão culminar com a diferenciação dos osteoblastos. Tanto os osteoblastos, quanto os condrócitos possuem um precursor mesenquimal comum, o precursor osteocondrogênico. Dependendo do estímulo, ocorre uma redução na proliferação celular e inicia-se o processo de diferenciação osteoblástica que pode ser dividido em vários estágios, incluindo-se deposição de matriz extracelular, maturação e mineralização dessa matriz (AUBIN ET AL., 1996; STEIN E LIAN, 1993). Assim, o estudo da diferenciação osteoblástica exige a

avaliação de marcadores distintos de diferenciação, incluindo fosfatase alcalina, colágeno tipo I, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina.

2.2.2 Os fatores de transcrição Cbfa1 (RUNX2) e OSTERIX

Um evento essencial na diferenciação osteoblástica e um ponto de convergência de muitas vias de transdução de sinal envolvidas, é a ativação do fator de transcrição RUNX2 (também conhecido como Cbfa-1) (LONG et al., 2001).

A busca por um gene específico dos osteoblastos levou à descoberta dos elementos OSEs (elementos de ação cis específicos dos osteoblastos, do inglês osteoblast-specific cis-acting elements) (DUCY E KARSENTY, 1995). Dois desses elementos foram extensivamente estudados, OSE 1 e OSE2 (DUCY E KARSENTY, 1995), sendo que este último demonstrou ligação com as proteínas Cbfa (GEOFFROY ET AL., 1995; MERRIMAN et al., 1995).

As proteínas Cbfa são os homólogos em mamíferos da proteína *runt* da *Drosophila*, um fator de transcrição com uma sequência de 128 amino ácidos altamente conservada. Semelhantemente aos seus homólogos do *C. elegans*, levam a produção de 3 proteínas Cbfa distintas, principalmente Osf2/Cbfa1.

A proteína Osf2/Cbfa1 é expressa em alto nível somente nas células osteoblásticas e são ativadores transcripcionais da diferenciação osteoblástica. Durante o desenvolvimento, é expressa em níveis altos nas células de todas as condensações mesenquimais que irão originar algum elemento do esqueleto, sendo sua expressão detectável aos E11,5 (ou seja 11,50º dia após o cruzamento) por hibridização *in situ* e E10,5 avaliando-se a expressão de um gene repórter da beta-galactosidase para o promotor endógeno de Cbfa1 (OTTO et al., 1996). Nesses estágios embrionários, ainda não existem células esqueléticas diferenciadas ou tecidos ósseos e cartilagosos definitivos, indicando que a

expressão de Cbfa1 mostra um tipo celular que é progenitor comum da linhagem osteoblástica e condroblástica (DUCY et al., 1997).

Por outro lado, a partir de E14,5 até o final do desenvolvimento embrionário e na vida pós-natal, a expressão de Osf2/Cbfa1 está restrita à linhagem osteoblástica e ausente nas células da linhagem condroblástica, sugerindo a existência de um mecanismo de inativação nos condrócitos diferenciados.

Além disso, a especificidade aos osteoblastos já foi demonstrada em experimentos mostrando que Osf2/Cbfa1 se liga aos promotores de todos os genes expressos preferencialmente em osteoblastos, como colágeno $\alpha 1$, sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina e também regula positivamente sua expressão em cultura de células e *in vivo* (DUCY et al., 1997).

Outro argumento da atuação de Osf/Cbfa1 como um fator de diferenciação da linhagem osteoblástica é que a expressão forçada dessa proteína em linhagens de células fibroblásticas ou em cultura primária de fibroblastos levou à aquisição de um fenótipo osteoblásticos por essas células (DUCY et al., 1997). Esses trabalhos foram conclusivos em mostrar que a função da proteína Osf2/Cbfa1 é dominante e não existe redundância com outros genes durante o desenvolvimento (KARSENTY et al, 1998).

Análise histológica do camundongo Cbfa^{-/-} revelou ausência de diferenciação osteoblástica (OTTO ET AL., 1997; KOMORI et al., 1997). Esse animal apresentou coloração fraca ou ausente de fosfatase alcalina e ausência de expressão de osteopontina e osteocalcina. Esses resultados demonstram que o gene Cbfa1 é essencial para a diferenciação dos osteoblastos e assim para a formação óssea durante o desenvolvimento do esqueleto.

O RUNX2 é um controlador da diferenciação osteoblástica, que pôde ser comprovada pelo fato que camundongos deficientes em RUNX2 apresentaram ausência total de osteoblastos, não formaram condrócitos hipertróficos e produziram um esqueleto cartilaginoso sem matriz mineralizada (OTTO et al., 1997). Interagindo com muitos ativadores e repressores transcricionais e outras

proteínas co-regulatórias, RUNX2 também pode regular a expressão positiva ou negativamente de uma série de genes específicos de osteoblastos, incluindo Colágeno tipo I, Fosfatase Alcalina, Osteoprotegerina, Osteonectina e Osteocalcina (LIAN et al., 2004; HARADA et al., 1999; KERN et al., 2001).

RUNX2 também regula a expressão do fator de transcrição Osterix. O promotor do gene de *Osx* (*Sp7*) (que codifica o Osterix) contém uma sequência consenso de ligação à RUNX2, sugerindo que Osterix seja um alvo direto de RUNX2 (NISHIO et al., 2006). O camundongo *knockout* para RUNX2 leva a perda de expressão de Osterix, no entanto, o animal *knockout* para Osterix não afeta a expressão de RUNX2 (NAKASHIMA et al., 2002). Da mesma forma, o animal *knockout* para Osterix é ausente em osteoblastos, mostrando que esse fator é fundamental para a formação óssea.

Uma das formas de atuação de Osterix é através de sua ligação com NFAT2 (fator nuclear para células T ativadas 2, do inglês nuclear factor for activated T cells), que coopera com Osterix no controle da transcrição de genes alvos como Osteocalcina, Osteoprotegerina, Osteonectina e Colágeno tipo I (NAKASHIMA et al., 2002; KOGA et al., 2005).

Outros fatores de transcrição que estão envolvidos na diferenciação dos osteoblastos são as proteínas homeobox como *Msx2*, *Dlx-3*, *Dlx-5*, *Dlx-5* e membros da família de proteínas ativadoras 1 (AP1) como *Fos*, *Fra* e *ATF4*. No entanto, a deficiência desses elementos não leva a perda total de osteoblastos, classificando-os como fatores facilitadores da osteoblastogênese.

2.2.3 Células de calvária em cultura

Quando mantidas sob condições adequadas, as células de calvária formam nódulos semelhante ao osso (do inglês bone-like) com a aparência histológica,

ultraestrutural e imunohistoquímica de osso esponjoso ou embrionário (AUBIN et al., 1996; BELLOWS et al., 1986; BHARGAVA et al., 1988; NEFUSSI et al., 1985).

Através da diluição em poços de microtitulação, foi possível determinar o número de células osteoprogenitoras expressando a capacidade de formar osso em uma população heterogênea isolada, além de examinar uma provável cooperação entre os tipos celulares na formação do nódulo ósseo. Para tal, as células foram plaqueadas em várias densidades baixas e a presença ou ausência de nódulos revelou uma relação linear entre o número de células plaqueadas e o número de nódulos observados. A diluição limitante completa mostrou que 1 em cada 335 células plaqueadas (0,35% da população) apresenta a capacidade de formar nódulos sob as condições normais de cultura e quando o número real de nódulos foi quantificado a partir da mesma população, a taxa de nódulos formados com relação à quantidade de células plaqueadas foi similar (BELLOWS E AUBIN, 1988). Os mesmos autores avaliaram 13 diferentes isolados de células, sendo as células plaqueadas em placas de 35mm e os números de nódulos foram determinados, sendo possível observar a presença de 1 nódulo para cada 301 ± 61 células plaqueadas, estatisticamente confirmando os achados dos experimentos da diluição limitante.

Os nódulos representam o produto final da proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras relativamente raras presentes na população celular inicial. Menos de 1% das células isoladas de calvárias de ratos são osteoprogenitoras capazes de se dividir e diferenciar para formar nódulos *in vitro* e que uma célula osteoprogenitora pode originar um nódulo ósseo sob condições padrões de cultura, ou seja, meio de cultura celular contendo glicose, aminoácidos e soro fetal bovino (BELLOWS E AUBIN, 1989).

Assim, o plaqueamento de células de calvária fetal em densidades bastante baixas possibilitam obter-se colônias isoladas de células que podem ter surgido de células individuais que se aderiram e poucas dessas colônias representam células osteoprogenitoras. Através da expansão de clones, essas células passam por uma série de divisões amplificadoras que irá culminar com uma colônia de osteoblastos

diferenciados depositando matriz mineralizada (AUBIN et al., 1990; BELLOWS E AUBIN, 1989). Outras colônias representam outras linhagens, como fibroblástica, adipocítica ou outros estágios osteoblásticos não capazes de formar nódulos *in vitro*.

Dessa maneira, culturas primárias de células de calvárias fornecem um modelo *in vitro* no qual é possível estudar experimentalmente a relação entre a proliferação de células progenitoras e a diferenciação de osteoblastos, que parece ser inversamente proporcional (ARONOW et al., 1990; AUBIN et al., 1992, 1993, 1995; AUBIN E LIU, 1996; BELLOWS E AUBIN, 1989; BELLOWS et al., 1986, 1990; BHARGAVA et al., 1988; LIU et al., 1994, 1997; MALAVAL et al., 1994; POCKWINSE et al., 1992, 1995; STEIN E LIAN, 1993; STEIN et al., 1990). Por exemplo, já está bastante estabelecido que a fosfatase alcalina seja expressa em células osteoprogenitoras e pré-osteoblastos (TRUSEN E AUBIN, 1991) e que aumente conforme os osteoblastos tornam-se maduros (RODAN E NODA, 1991). Tem sido relacionado também que osteocalcina é regulada positivamente somente no estágio pós-proliferativo do osteoblasto (ARONOW et al., 1990).

Ainda existem controvérsias sobre a quantidade mínima de divisões necessárias para que a célula progenitora possa obter o fenótipo de osteoblasto maduro, tampouco é possível precisar a relação entre o tempo de vida proliferativo e a aquisição de outros marcadores associados com o perfil de osteoblasto maduro. Parece existir uma “idade” ou seja, um número de divisões em que a probabilidade é maior para a diferenciação terminal da célula osteoprogenitora (MALAVAL et al., 1991). O número de duplicações que precede a aparência dos primeiros osteoblastos morfológicamente reconhecíveis é um parâmetro diferente, refletindo o número mínimo de mitoses através do qual as descendentes de uma progenitora precisa transitar antes de alcançar a diferenciação terminal (MALAVAL et al., 1991).

A grande vantagem desse sistema é que as células da calvária são células neonatais normais que retém, pelo menos por algum tempo, as propriedades associadas com as células embrionárias e com o fenótipo diferenciado. Além

disso, esse tipo de cultura, contem representantes de várias populações celulares que estão presentes na calvária, agindo como uma fonte pluripotencial.

Os ensaios com microarrays permitem o estudo da expressão de uma grande quantidade de genes e eventos reguladores de 27 mil genes distintos foram analisados utilizando células de calvária obtidas por digestão enzimática (GARCIA et al., 2002). O objetivo do estudo foram subgrupos de genes que foram selecionados pela sua relevância biológica na biologia osteoblástica. Como esses genes constituem um grupo que, quando avaliados em conjunto, definem virtualmente a região genômica do osteoblasto, outros genes com comportamento similar também podem estar envolvidos no mesmo processo de diferenciação (THEILHABER et al., 2002).

O efeito estimulatório do beta-glicerolphosphato (β GP) sobre a mineralização de células de calvária em cultura foi investigado com relação à atividade fosfohidrolase da enzima ecto-fosfatase alcalina na faixa de pH fisiológico. Para isso, o β GP presente no meio de cultura por 8 dias exerceu um efeito estimulatório sobre a incorporação do ^{45}Ca às camadas da matriz celular, enquanto que o nível de atividade da ecto-fosfatase alcalina medido nas células intactas, com uma concentração saturantes de pNPP (para-nitrofenilfosfato), foi similar tanto para as células cultivadas na presença quanto na ausência de β GP. Em ambos tipos celulares, a adição de β GP inibiu a hidrólise do pNPP de modo reversível e competitivo e a concentração de Pi aumentou no meio. O efeito dose dependente do β GP sobre a incorporação do ^{45}Ca (ANAGNOSTOU et al., 1996).

2.3 Fosfatases

As fosfatases ácida e alcalina das células esqueléticas já foram extensivamente estudadas (BAR-SHIRA-MAYMON et al. 1989; MORRIS et al. 1992, YAZIJI et al. 1995). A fosfatase alcalina (ALP) é uma glicoproteína de ligação do cálcio (de BERNARD et al. 1986) que desfosforila fosfatos orgânicos,

incluindo pirofosfatos, apresentando pH ótimo = 9.2. A principal Fosfatase ácida encontrada no tecido ósseo cataliza a hidrólise de fosfoproteínas e nucleotídeos em um pH ótimo = 5,0 (ANDERSON E TOVERUD 1986, HAYMAN E COX 1994; PRICE et al., 1995).

A localização relativa das fosfatases alcalina e ácida na matriz foi investigada durante o crescimento ósseo. Cabeças de fêmures de coelhos foram utilizadas por conterem além da placa de crescimento, um centro de ossificação e as células produtoras dessas enzimas (ROACH, 1999). Os animais foram fixados em formaldeído e paraformaldeído. A inibição das enzimas foi testada adicionando-se tartarato de sódio (50 e 100mM) e NaF (2, 10, 50 e 100mM). Foi verificada que uma concentração de 100mM de tartarato não foi suficiente para inibir a atividade da fosfatase ácida pelos condrócitos ou osteoclastos associados à matriz. Para sua inibição, foram adicionados 2mM NaF. Do mesmo modo, a atividade de fosfatase ácida dos osteoclastos também não foi inibida pelo ácido tartárico ou por doses baixas de NaF. Para concentrações maiores, o grau de inibição foi dependente da intensidade original da coloração da fosfatase ácida e do tipo de fixação. Quando fixados em formalina, 10mM NaF inibiram praticamente toda a atividade da TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato, do inglês *Tartrate resistant acid phosphatase* – será descrita em tópico oportuno) e quando fixados em paraformaldeído, alguns osteoclastos ainda apresentaram marcação em 50mM NaF, embora com atividade consideravelmente reduzida. A atividade de TRAP nos osteoclastos foi abolida após o tratamento com 100mM NaF.

2.3.1 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é essencial para a mineralização (WHYTE, 1989) e sua atividade catalítica sobre o fosfato orgânico está associada com o início da mineralização, mas não com seu progresso (TENENBAUM, 1987; BELLOWS et al., 1991; ANDERSON E MORRIS, 1993). Há quase cinquenta anos que o papel

da Fosfatase alcalina na etapa inicial da mineralização foi demonstrado e, assim que a matriz se torna mineralizada, a atividade da ALP não pode mais ser evidenciada imunohistoquimicamente (WERGEDAL & BAYLINK 1969; GENGE et al. 1988).

É capaz de funcionar como uma ecto-enzima (LOW, 1989; WHYTE, 1989) e seus parâmetros catalíticos que contribuem para o processo de mineralização podem ser modulados pelo ancoramento do glicosil-fosfatidil-inositol da enzima à membrana celular (HSU et al., 1993; HARRISON et al., 1995) como também pela interação com a fase mineral em desenvolvimento ou com proteínas da matriz extracelular (GENGE et al., 1988; BOSSI et al., 1993).

Acredita-se que as principais funções de ALP no processo de mineralização sejam:

- a. Localmente, fornecendo fosfato inorgânico (Pi) para a formação de hidroxiapatita (WUTHIER E REGISTER, 1985)
- b. Pela ligação de Ca_2C (WHYTE, 1994) a fosfatase alcalina ancorada na superfície dos osteoblastos é capaz de funcionar em pH fisiológico como uma p-nitrofenilfosfatase (pNPPase) cujas variações da atividade estão correlacionadas com as modificações na incorporação de ^{45}Ca nas camadas celulares (ANAGNOSTOU et al., 2010).

A enzima é produzida pelos osteoblastos junto com a matriz óssea e exportada para a matriz extracelular onde a enzima está presente antes da mineralização (BERNARD, 1978).

ALP também está associada com as etapas iniciais da calcificação na placa de crescimento pelos condrócitos hipertróficos. Assim que ela é produzida e exportada para a matriz, associa-se às vesículas de matriz para iniciar a mineralização (GENGE et al. 1988, HARRISON et al. 1995, CLAASSEN et al. 1996).

2.3.2 Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato

Essa enzima é resistente à inibição pelo ácido tartárico sendo, desse modo, chamada TRAP (Fosfatase ácida resistente ao Tartarato, do inglês *Tartrate Resistent Acid phosphatase*) (LAU et al., 1992). Foi demonstrada por Campbell e colaboradores em 1968 através do estudo em leucócitos. É uma enzima lisossomal e, desse modo, particularmente forte em células que contém grande quantidade de lisossomos, como os osteoclastos (FUKUSHIMA et al., 1991). Desse modo, a imunomarcagem da TRAP já foi utilizada como marcador para osteoclastos e seus precursores (MOSTAFA et al. 1982, MARKS & GROLMAN 1987, LINDUNGER et al. 1990, NAKAMURA et al. 1991).

TRAP também foi demonstrada em osteoblastos, osteócitos (WERGEDAL E BAYLINK, 1969, BIANCO et al. 1988, LUNDY et al. 1988) e condrócitos (SILBERMANN & FROMMER 1973). No entanto, a expressão dessa enzima no tecido ósseo ainda é motivo de controvérsia, sendo que alguns autores acreditam que a expressão dessa enzima seja resultado de artefato de técnica, ou causada por uma incubação prolongada ou difusão (BLAND & ASHHURST 1998).

2.4 Fluoretos

O Flúor é um elemento indispensável, sendo que sua deficiência ou excesso acarreta conseqüências clínicas importantes tais como atraso no desenvolvimento, esclerose esquelética e fluoroses dentária e óssea (GERRIER et al., 2008; ORUKI, 2008; SHASHI et al., 2008; KURLAN et al., 2007; SHARMA et al., 2007; RINGE et al., 2002). São assumidos na literatura que uma ingestão

“ótima” de fluoreto esteja estimada entre 0,05 e 0,07mg fluoreto/kg peso corporal/dia (BAELUM et al., 1987).

O flúor tem seu nome originado do latim *fleure*, que significa fluir. Em temperatura ambiente, é um elemento gasoso e não metálico, extremamente reativo, de cor amarela pálido, odor característico e com propriedades tóxicas. Seu símbolo é F-, número atômico 9 e peso atômico 19 (WHITFORD, 1996). Devido a suas características químicas, como pequeno raio atômico e superfície de contato bastante efetiva, o flúor apresenta-se como o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica, pertencendo ao grupo dos halógenos. Entre os halógenos, o flúor é diferente em vários aspectos, incluindo o fato de se combinar reversivelmente com íons de hidrogênio para formar o ácido fluorídrico, tendo muitos de seus comportamentos fisiológicos explicados com a base na difusibilidade deste ácido fraco (WHITFORD, 1996).

O flúor reage prontamente com suas redondezas e é raramente encontrado no estado livre ou elementar. Assim, em temperaturas apropriadas, o flúor ataca diretamente todos os elementos, exceto oxigênio e nitrogênio. O flúor é exclusivamente monovalente, o que não vale para outros halógenos (SMITH & EKSTRAND, 1996). É encontrado na natureza mais freqüentemente como flúor inorgânico. Está presente no magma e seus vapores residuais, rochas (ígneas e sedimentares) e gases vulcânicos. Na água, sua concentração é afetada por fatores como temperatura, pH e presença de outros elementos como cálcio, alumínio e ferro. Com relação ao flúor atmosférico, os gases componentes mais comuns são HF (ácido fluorídrico) e SiF₄ (tetrafluoreto de silício). Folhas de planta, em geral, contêm 2 a 20 ppm de flúor (SMITH& EKSTRAND, 1996).

O F⁻ distribui-se rapidamente pelo organismo. Do ponto de vista farmacocinético, o plasma é considerado o compartimento central de distribuição do F⁻ pois ele é o fluido no qual e pelo qual o F⁻ deve passar para sua subsequente redistribuição e eliminação (WHITFORD, 1996).

Ávido por tecidos calcificados, o flúor tem grande habilidade em estimular a formação de novo osso, assim como, utilizado com segurança em todo o mundo para o controle da cárie dentária, porém sua administração pode apresentar alguns efeitos colaterais quando utilizados em altas concentrações tanto de forma crônica como aguda. O efeito secundário, mais comum ligado a forma crônica é a fluorose dentária, que pode ocorrer se a ingestão diária de flúor for superior a 0,1 mg/kg de peso corporal durante vários meses ou anos.

Nos casos em que esta ingestão é mais elevada pode ocorrer a fluorose esquelética que causa problemas articulares, de ordem neurológica e perda na massa muscular. Doses agudas envolvendo montantes elevados de flúor podem induzir efeitos que vão desde a irritação gástrica até a morte. Normalmente, a dose provavelmente tóxica esteja na faixa de 5mg/Kg peso corporal (WHITFORD, 1996).

Aproximadamente 99% do flúor retido no organismo estão associados aos tecidos mineralizados, principalmente ao osso, mas também ao esmalte e à dentina. As concentrações de flúor presente nos osso estão, em geral, associadas à ingestão ao longo do tempo. O aumento de retenção do flúor pelo esqueleto em desenvolvimento provavelmente se deve ao rico suprimento sanguíneo que irriga aquela região, também ao menor tamanho dos cristalinós ósseos em formação, que proporcionam maior área de superfície (WHITFORD, 1994; WHITFORD, 1996). Em adição, o flúor se acumula no tecido ósseo, que pode ser considerado um biomarcador para exposição crônica (DUNIPACE et al., 1995) e aguda ao flúor (BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2005).

O “clearance” do flúor do plasma pelo esqueleto ocorre rapidamente. Aproximadamente 50% do flúor absorvido diariamente por jovens ou adultos saudáveis de meia-idade associam-se aos tecidos calcificados em 24h, enquanto que quase todo restante é excretado pela urina. Esta distribuição 50:50 se desloca a favor de maior retenção em bebês e crianças pequenas (WHITFORD, 1996), e provavelmente desloca-se a favor de uma maior excreção em indivíduos mais velhos, embora pouco se saiba sobre este assunto (WHITFORD, 1994).

O estudo da viabilidade celular é uma das ferramentas iniciais para avaliarmos o efeito de fluoretos sobre as células. Um dos ensaios empregados com essa finalidade é a análise do corante Vermelho Neutro, que relaciona indiretamente a quantidade de células viáveis pela atividade lisossomal sobre a extração do corante. Além da atividade lisossomal, a atividade mitocondrial também pode ser empregada como uma sinalização da viabilidade celular. Nesse caso, a incubação das células numa solução de MTT (DENIZOT & LANG, 1986), cujo sal possui coloração amarelada e pode ser metabolizado pelas desidrogenases mitocondriais, levando à formação do azul de formazan, que quantificado por espectrometria pode ser relacionado com a quantidade de células viáveis (DENIZOT & LANG, 1986).

2.5 Fluoretos e Tecido Ósseo

Existem várias formulações de fluoretos no mercado, mas pouco é conhecido sobre o mecanismo de atuação desses produtos e os possíveis efeitos sobre o tecido ósseo. O interesse em se analisar o papel do Flúor sobre o tecido ósseo remonta há diversas décadas (PROFITT E ACKERMAN, 1963; SOGNAES, 1965), quando primeiramente observou-se que a ingestão de água contendo altas doses de flúor, com intuito de observar as conseqüências sobre os dentes, levou a alterações na estatura dos animais participantes. Desde então, a busca pela compreensão do papel do Flúor sobre a mineralização óssea é incessante.

O sucesso com o uso do flúor como um agente terapêutico para o tratamento de doenças ósseas já foi relatado (HAGUENAUER ET AL., 2009; NEUPREZ E REGINSTER, 2008; MURRAY et al., 1996), embora um veículo adequado de administração dos fluoretos ainda não esteja disponível. Não existem mais dúvidas de que doses farmacológicas de flúor estimulem a formação óssea pelos osteoblastos e aumentem significativamente a massa óssea (PAK et al., 1995), sendo considerado como o agente mais potente para aumentar a

massa óssea em pacientes com doenças ósseas, sobretudo osteoporose (VESTERGAARD ET AL., 2008; PALÁCIOS, 2006; CANHÃO ET AL., 2004; RODAN, 2000; MURRAY et al., 1996).

Em 1983, Farley e colaboradores mostraram que o tratamento com NaF aumentou a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina de células ósseas *in vitro* e aumentou a formação óssea em calvária embrionária nas concentrações que levam à formação óssea *in vivo*. Os resultados foram obtidos observando-se: a) a incorporação de timidina tritiada, tanto em cultura de monocamadas como de organo-cultura; b) o aumento do conteúdo de ALP das células ósseas e c) a melhora no crescimento e mineralização do osso embrionário. Os autores concluíram que o efeito do tratamento com flúor sobre o balanço ósseo ocorreu principalmente pelo aumento da formação óssea sem que houvesse aumento da reabsorção óssea.

O mecanismo preciso do potencial mitôgeno específico do tecido ósseo ainda não foi totalmente desvendado. Sabe-se que o flúor necessita da presença de fatores de crescimento das células ósseas, como IGF-I ou TGF, para estimular a proliferação das células ósseas. Desse modo, ele é um favorecedor mitótico, ao invés de ser um agente mitogênico *per se* (RINGE, 2002). Primeiramente, o flúor inibe o fosfatidilinositol e a fosfatase alcalina. O conseqüente aumento da fosforilação de algumas proteínas celulares pode ser o responsável pela proliferação osteoblástica ou síntese de fatores de crescimento. Além disso, o flúor também modula a atividade de alguns fatores de crescimento presente nos osteoblastos (FARLEY et al., 1983).

Em um estudo de proliferação e diferenciação de osteoblastos obtidos de cabras, Qu e Wei (2006) observaram alterações ultraestruturais decorrentes da exposição a altas doses de NaF (5×10^{-4} a $2,5 \times 10^{-3}$ M), comprovando claramente o efeito tóxico do Flúor. Essas alterações incluíam condensação da cromatina, perda do contato célula-célula. Nos casos mais sérios, houve sinais de severa alteração celular, incluindo ausência de membrana, contração e fragmentação das protrusões celulares. Em concentrações superiores a 10^{-5} M, houve a indução de alterações morfológicas compatíveis com apoptose e as células expostas a

concentrações superiores a 10^{-4}M apresentaram atrofia das organelas, condensação desorganizada da cromatina dentro de um núcleo com alterações de forma. Além disso, corpos apoptóticos foram encontrados no citoplasma. Esses achados foram mais evidentes ainda na concentração 10^{-3}M . Através do ensaio de MTT, os autores observaram um aumento da proliferação celular na faixa de concentração de 10^{-5} a 10^{-8}M , enquanto que um efeito inibidor foi observado na concentração de 10^{-3}M para todos os tempos e na concentração de 10^{-4}M após 96 horas de cultivo.

Xu e colaboradores (2008) mostraram que uma dose excessiva de flúor pode afetar a síntese protéica em osteoblastos submetidos à análise de expressão gênica.

Outros mecanismos de ação do flúor em células ósseas foram propostos por Kawase & Susuki, 1989, os quais postularam que o flúor ativa a proteína G e a atividade da proteína quinase C que, conseqüentemente, leva a um aumento da proliferação de células.

Mounsny e colaboradores (2006) investigaram se existia influência genética sobre a susceptibilidade óssea ao flúor. Para isso, utilizaram 3 espécies de camundongos, A/J – suscetível, 129P3/J – resistente e SWR/J – intermediária, com relação às suscetibilidades genéticas a esse elemento, submetidos a diversos tratamentos com NaF (0, 25, 50 e 100 ppm F). As concentrações de flúor foram determinadas nos fêmures e corpos vertebrais. Após diversos ensaios de densidade e resistência, os autores puderam concluir que os fatores genéticos podem contribuir para a variação na resposta óssea à exposição ao flúor e que esse elemento pode afetar as propriedades ósseas sem alterar a densidade óssea.

A literatura mostrou, no trabalho de Reed et al., 1993, que o efeito mitogênico do flúor é mediado através da modelagem da sensibilidade de células ósseas para transformar o fator de crescimento B. Além disso, por causa do tratamento de flúor, as células ósseas desencadeiam um crescimento agudo do nível de cálcio intracelular, e este aumento de cálcio tem sido associado com a

proliferação celular, sugerindo, assim, seu envolvimento nos mecanismos de ação mitogênica do flúor em células ósseas.

Outros autores apresentaram evidências que 15-50 mM de flúor ativou a fosforilase D em células ósseas (osteosarcomas humanos SaOs -2) o que levou ao crescimento do cálcio intracelular. Segundo o trabalho de Lau & Baylink, 1998, a ação do flúor na formação do osso segue um modelo que envolve o flúor na inibição de uma única fosfatase fosfotirosina sensível ao flúor em osteoblastos, que resulta em um crescimento sustentável no nível de fosforilação da tirosina e na proliferação dos fatores de crescimento.

Assim, um dos benefícios deste mecanismo molecular de ação osteogênica do flúor, descrita por Lau & Baylink, 1998, é que ele contribui para o entendimento de todas as propriedades da ação do flúor na osteogênese, incluindo a menor dose efetiva de flúor, especificidade do tecido esquelético, a demanda de PTKs (fatores ativadores de crescimento), a sensibilidade para a mudança da concentração de fosfato, a preferência por osteoblastos indiferenciados e o envolvimento de MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês, *mitogen activated protein kinase*). Estes autores, também propõem outro modelo em que o flúor age em coordenação com o alumínio para formar o fluoreto de alumínio, que ativa uma toxina sensível na membrana do osso, levando a uma ativação da proteína celular tirosina quinase (PTKs), que por sua vez, lidera o aumento na fosforilação da tirosina através de uma sinalização protéica de MAPK, levando, finalmente, a uma estimulação da proliferação da célula, porém ao contrário do flúor na forma de NaF, a ação mitogênica do fluoreto de alumínio não é específica para as células ósseas. Desta forma, é provável que o modelo de flúor sensível ao PTK represente o verdadeiro mecanismo de ação do flúor na osteogênese.

O efeito do flúor quanto à formação óssea ectópica foi avaliado recentemente (CARVALHO et al., 2008). Para a realização do estudo, foram utilizados 80 ratos machos (*Wistar*) divididos em 4 grupos (20 por grupo) que se diferenciavam de acordo com a concentração de flúor na água que ingeriram (0, 5,

15 e 50 ppm). Uma matriz óssea desmineralizada (DBM) foi implantada no fêmur, em metade dos ratos aos 90 dias de vida. Os outros ratos receberam implantes de DBM com 1 ano de idade. Os animais foram sacrificados 28 dias depois dos procedimentos cirúrgicos. A concentração de flúor na superfície do fêmur, em todo o fêmur e no plasma foi analisada. O aumento da concentração do flúor no plasma, na superfície do fêmur e em todo fêmur foi observado com relação ao aumento na concentração de flúor na água. Houve, também, uma tendência para o crescimento da concentração de flúor no plasma e no fêmur com a progressão da idade. Correlações mais significantes foram encontradas entre plasma e superfície do fêmur, plasma e fêmur. A análise morfométrica indicou um crescimento na formação óssea para ratos mais novos que receberam 5 ppm de flúor na água de beber, embora não tenha havido significância. Por outro lado, houve um prejuízo significativo na formação óssea para aqueles que receberam 50 ppm F. Para os ratos mais velhos, não houve diferença significativa entre os subgrupos. A formação óssea não foi significativamente afetada pelo flúor entre os ratos mais velhos. Os resultados sugerem que as doses mais baixas de flúor, que levemente aumentam o nível de flúor no plasma, podem ter um efeito anabólico na formação óssea em ratos mais novos.

Também foi demonstrado que altas doses de fluoreto na água de beber (50ppm) pode atrasar a remissão do coágulo sanguíneo e o reparo ósseo alveolar em ratos Wistar, da mesma forma que as expressões de RANKL e OPG também sofrem alterações (FERNANDES et al., 2012).

2.6 Cultura de Células

2.6.1 Cultura Primária

Para o estudo do tecido ósseo, desde a diferenciação de suas células, mineralização e absorção do tecido são utilizados ensaios de cultura de células,

tanto as provenientes de linhagens celulares imortalizadas, como de cultura primária.

A cultura primária, caracterizada pela coleta de células ou fragmentos teciduais, é uma outra opção para a obtenção de células osteoblásticas e diversas técnicas já foram descritas na literatura (YADAV et al., 2011; IRIE et al., 1998).

As células osteoprogenitoras e osteoblastos também são rotineiramente coletados a partir da coleta de osso medular e posterior cultura primária (PEREIRA et al., 1995; COLTER et al., 2000; SEKIYA et al., 2002).

Apesar de se um excelente modelo para o estudo *in vitro* para o estudo do tecido ósseo, uma vez que a matriz extracelular mineralizada pode ser estruturada na cultura pelos osteoblastos, a cultura primária é limitada pela impossibilidade de padronização da população de células, mesmo utilizando-se camundongos com a mesma idade e com isogenia comprovada. Assim, um ensaio poderá apresentar uma certa diferença de resultados refletindo a diferença na população presente. Além disso, a cultura primária apresenta um número finito de passagens, refletido pela quantidade de divisões e permanência no ciclo celular, inerente a cada tipo de célula (KAPAH et al., 1999). Frente a essas limitações, somadas à impossibilidade de experimentos longos em cultura devido à morte celular ou alteração fenotípica (SUBRAMANIAM et al., 2002), as linhagens imortalizadas foram desenvolvidas.

2.6.2 Linhagens Celulares

Uma vez que a cultura primária seja subcultivada (ou tenha mudado a passagem), ela torna-se uma linhagem em cultura (do inglês *cell line*). Mas isso significa que existe a presença de diversas linhagens celulares tanto similares quanto com fenótipos distintos entre si (ROPER E HEMBERGER, 2009; TURNPENNY E HANLEY, 2007).

Quando ocorre a seleção de uma linhagem, seja por clonagem (HORNSBY et al., 1992) ou por separação física (HOFFMAN E HOUCK, 1997) para que certas propriedades específicas sejam caracterizadas, essa se torna uma linhagem celular (do inglês *cell strain*). É vital identificar e confirmar a identidade da célula em questão e excluir a possibilidade de contaminação cruzada com células de outras linhagens, ou células da mesma linhagem em etapas distintas. Isso posto, a célula passa a ser chamada linhagem celular estabelecida e se forem feitas alterações para que a célula escape ao controle de senescência, a linhagem será estabelecida e imortalizada.

No caso de osteoblastos, diversas linhagens já foram imortalizadas e estão disponíveis comercialmente. Dentre elas podemos citar: MC3T3-E1 (pré-osteoblastos de calvária de camundongos C57BL/6J), osteosarcoma (SAOS-2), DAN (osteosarcoma de cães) (DOUGHERTY et al., 1989), UMR-106 (osteosarcoma de ratos) (BANERJEE et al., 1996), HOS (osteosarcoma humano) (YEE et al., 1996), D-17 (osteosarcoma canino) (RIGGS et al., 1974).

2.6.3 Linhagem MC3T3-E1

A denominação 3T3 designa o tipo de regime recebido que de 3×10^5 células cultivadas em placas de Petri de 5cm cuja manutenção era feita a cada 3 dias. O termo E1 designa o subclone de onde essas células vieram (FRESHNEY, 2010, capítulo XII).

São bons modelos para estudos da diferenciação osteoblástica *in vitro*, particularmente sinalização da matriz extracelular. Apresentam comportamento similar aos osteoblastos obtidos de culturas primárias, embora apresentem morfologia de fibroblasto (ATCC, 2012).

Foi estabelecida a partir da calvária de camundongos C57BL/6J e selecionadas com base na alta atividade de fosfatase alcalina no estado em

repouso. As células tem a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, osteócitos e já demonstraram formar e calcificar a matriz óssea *in vitro*. Seus depósitos já foram identificados e classificados como hidroxapatita. Além disso, essas células também secretam o colágeno que servirá de arcabouço para o restante da produção da matriz (ATCC, 2012).

2.7 Modelos animais

O desejo de identificar genes regulatório da densidade mineral óssea tem levado à busca de ferramentas genótípicas e fenotípicas de estudo. Além de vastos estudos epidemiológicos da população mundial para varrer o genoma e buscar descobrir genes envolvidos na regulação da densidade mineral óssea, diversos laboratórios adotam linhagens isogênicas (do inglês *Inbred strains*) pois oferecem as vantagens de: a) cruzamentos controlados, b) genótipos caracterizados e definidos, c) controle sobre fatores ambientais, d) facilidade de manutenção, e) sistemas de tratamentos que ainda não estão disponíveis para humanos podem ser usados em animais.

Essas linhagens de animais são ainda mais importantes se considerarmos que as análises genômicas de populações que apresentam segregação de alelos para doenças ou situações ósseas, ou doenças e situações gerais, dependem da exatidão e precisão de medidas fenotípicas, número mínimo de sujeitos com cada característica pesquisada e marcadores específicos nas quantidades necessárias para mapear toda a população. Os animais experimentais preenchem todos esses requisitos e características e podem preencher um banco de dados com todas as informações necessárias, fazendo todas as correlações necessárias, com um custo e tempo menores.

2.7.1 Camundongos isogênicos e camundongos isogênicos recombinantes

Os animais mais amplamente utilizados para análises genéticas do genoma total para estudo de densidade óssea mineral são as linhagens isogênicas (do inglês *inbred strain*) de camundongos de laboratório. Essas linhagens são geradas pelo cruzamento de casais irmãos por mais de 20 gerações consecutivas (EPPIG, 2010). As linhagens isogênicas mais famosas incluem a C57BL/6, C57BL10, C3H, CBA e BALB/c que foram originariamente desenvolvidas para demonstrar as bases genéticas de várias formas de cânceres. Essas linhagens desempenham um papel crucial em todas as áreas da pesquisa biomédica, permitindo de pesquisadores de todos os centros de pesquisa do globo possam reproduzir experimentos ou fazer comparações devido a utilização do mesmo material genético (SILVER, 1995).

Análises genéticas clássicas foram conduzidas cruzando-se os animais C57BL/6J (C57), com baixa densidade óssea mineral, e os animais C3H/HeJ (C3H), com alta densidade mineral óssea. Desse cruzamento resultam os animais híbridos (C57C3H)F1 que foram intercruzados para obter-se (C57C3H)F2, cujas fêmeas foram utilizadas aos quatro meses de idade para a fenotipagem de seus ossos *ex vivo*. Os animais F2 segregam alelos que dirigem as diferenças nas densidades minerais ósseas das linhagens progenitoras. Observando-se as distribuições resultantes das densidades femural e lombar desses animais, foi possível perceber o envolvimento de muitos genes na regulação do pico de densidade óssea para ambos sítios ósseos. A análise estatística mostrou a detecção de 11 locos de características quantitativas (QTLs) de densidade mineral óssea para os fêmures e 5 para lombares, apresentando tanto diferenças quanto similaridades nos QTLs nesses sítios ósseos.

2.7.2 Linhagem C3H/HeJ

A linhagem C3H/HeJ foi desenvolvida por LC Strong em 1920 a partir de um cruzamento entre fêmea Bagg albina e macho DBA. Os animais resultantes foram submetidos a uma rigorosa seleção, escolhendo-se aqueles com alta incidência de tumores mamários. Essa alta incidência foi um resultado da transmissão pelo leite materno do vírus do tumor mamário de camundongos (MMTV) (Jax Mice Database, 2012). Não se trata de animal geneticamente modificado, uma vez que não foram feitas manipulações genéticas no animal, as mutações observadas foram obtidas espontaneamente através dos cruzamentos isogênicos.

2.7.3 Linhagem C57BL/6J

O camundongo C57BL/6J é o subclone mais conhecido derivado da linhagem C57BL (MEKADA et al., 2009). Essa linhagem de animais isogênicos (do inglês *inbred strain*) foi criada por CC Little pelo agrupamento de 57 fêmeas com 52 machos do estoque de Abbie Lathrop em 1920. É a linhagem de camundongos *inbred* (resultante de cruzamentos isogênicos) mais utilizada. É muito usada na produção de animais transgênicos. Esta linhagem apresenta animais de vida longa e com baixa susceptibilidade a tumores. Porém, possuem alta susceptibilidade à obesidade induzida por Diabetes e Aterosclerose, alta incidência de microftalmia e outras anormalidades oculares. Assim como o BALB/C, é muito utilizada em pesquisas do sistema imune, porém sua resposta imune tem como perfil o padrão Th1 (Jax Mice Database, 2012). Não se trata de animal geneticamente modificado, uma vez que não foram feitas manipulações genéticas no animal, as mutações observadas foram obtidas espontaneamente através dos cruzamentos isogênicos.

Isto posto, nosso intuito é melhorar o conhecimento sobre os efeitos dos fluoretos no tratamento de células osteoblásticas, contribuindo para a elucidação dos mecanismos que envolvem a diferenciação osteoblástica e a mineralização da matriz óssea.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do flúor sobre a viabilidade e perfil de fosfatases de células osteoblásticas provenientes de linhagens de camundongos com diferentes densidades ósseas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se existe diferença na viabilidade celular e no processo de mineralização de células osteoblásticas quando submetidas ao tratamento com fluoretos oriundos de duas fontes: AlF_3 (fluoreto de alumínio) e NaF (fluoreto de sódio).
2. Avaliar se existem diferenças na viabilidade celular e no processo mineralização frente ao tratamento com NaF quando as células osteoblásticas são provenientes de camundongos com densidades ósseas distintas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado em 2 etapas *in vitro* para atingir alguns objetivos distintos. Inicialmente, buscou-se avaliar a resposta de células ósseas frente ao tratamento com diferentes concentrações de fluoreto, além de verificar uma possível influência na viabilidade quando diferentes sais fluoretados foram usados.

Num segundo momento, o trabalho procurou estudar possíveis diferenças aos efeitos do tratamento com fluoreto sobre o processo de mineralização mediada pelos osteoblastos em células osteoblásticas provenientes de camundongos com densidades ósseas distintas. Assim, optamos por testar apenas com NaF uma vez que apresentou resultados bastante favoráveis na primeira etapa e por se tratar do sal mais amplamente utilizado.

4.1 Grupos Experimentais

Para esse estudo, três fontes distintas de células osteoblásticas foram utilizadas:

- a. cultura primária de células de calvária de camundongos da linhagem C57/BI (do inglês *cell line*)
- b. cultura primária de células de calvária de camundongos da linhagem C3H/HeJ (do inglês *cell line*)
- c. cultura de células estabelecidas da linhagem MC3T3-E1 (do inglês *continuous cell strain*) (FRESHNEY, 2011).

4.1.1 Animais C3H/HeJ e C57BI/6J

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FOB-USP, recebendo os protocolos de números 017/2009 e 03/2012 (Anexos).

Foram utilizados camundongos isogênicos de 2 linhagens com densidades ósseas conhecidas, a saber: C3H/HeJ (C3H) com alta densidade óssea e C57BL/6J (C57) com baixa densidade óssea (JUDEX et al., 2004) (**Figura 4**).

Figura 4: Animais com diferentes densidades ósseas usados nesse estudo. **A)** Imagens de microCT: Diferentes densidades ósseas dos camundongos C57, aqui representado como B6, e C3H. Corte transversal mostrando a diferença quantitativa e de arquitetura na metáfise (superior), epífise (meio) e região mediana da diáfise (baixo) (retirada de Judex e colaboradores, 2004). **B)** Figura mostrando alguns dos animais utilizados no experimento. Os animais C57 apresentam a coloração preta da pele, enquanto que os C3H apresentam-se com pouca pigmentação dando um aspecto rosado.

Os animais, com idades entre 2 e 5 dias, foram fornecidos pelo Biotério de nossa Instituição (FOB-USP) (**Figura 5A**). O desenvolvimento de camundongos isogênicos requer cuidados especiais, uma vez que diversos problemas são decorrentes desse tipo de cruzamento. Assim, a manutenção da linhagem previamente caracterizada é muito importante e deve ser feita pelo acasalamento adequado de fêmeas e machos isogênicos. Os animais não eram OGM (organismos geneticamente modificados), uma vez que essa terminologia aplica-

se àqueles animais cujas mutações são decorrentes de manipulação genética. Os camundongos estudados são um resultado de mutações espontânea resultantes dos acasalamentos consaguíneos.

Nesse trabalho, foram utilizados casais monogâmicos que apresentam a vantagem do aproveitamento do cio pós-parto, evitando-se erros de identificação entre os animais. Linhagens isogênicas estabelecidas, ou seja, aquelas que já passaram por pelo menos 20 gerações de acasalamentos, pedem que haja o acasalamento entre irmãos para a manutenção genotípica.

O técnico Luis Carlos da Silva ficou responsável pela coleta dos animais e manutenção dos acasalamentos, segundo King e colaboradores (1993).

No laboratório de cultura de células do Centro Integrado de Pesquisas I (CIP I) da FOB-USP, as cabeças dos filhotes foram decapitadas com lâmina nº 10 de bisturi afiada, após anestesia com Anasedan[®] e Dopalen[®] (1:1, v/v.) para que o procedimento fosse finalizado em uma única etapa e de maneira rápida e indolor.

Dentro do fluxo laminar, por meio de micropinças e microtesouras, as calvárias foram cuidadosamente manuseadas e removidas. Para isso, foi realizado um corte no sentido sagital (sobre a região da sutura sagital), sobre uma linha média imaginária na porção posterior da cabeça do animal. Esse corte foi estendido até próximo ao focinho. Partindo-se da incisão do corte, foram realizados retalhos em direção a ambas orelhas externas. Em seguida, realizamos um divulsionamento adequado do tecido para que tivéssemos amplo acesso às calvárias (**Figura 5B**).

Utilizando uma microtesoura, removemos um fragmento único da calvária a sutura coronal (que une os ossos frontal e parietais) e a sutura lambdoide (que une os ossos parietal e occipital) (**Figura 5C**). Após a coleta das calvárias, as linhas da sutura sagital (que une os ossos parietais) foram removidas (**Figura 5D**). Imediatamente após a coleta, as calvárias foram colocadas em tubos contendo 7mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Meio de transporte), até o máximo de 4 calvárias por tubo (**Figura 5E**).

Figura 5: Biotério e procedimentos cirúrgicos de coleta da calvária. **A)** Sala de acasalamento das matrizes do Biotério Central da FOB-USP. **B)** Posicionamento da cabeça após o divulsionamento dos tecidos moles e exposição da calvária. **C)** Remoção da calvária em um fragmento único. **D)** Remoção da região da sutura sagital. **E)** Fragmentos de calvárias removidos e colocados em um tubo cônico contendo meio de transporte.

Após finalizadas todas as coletas, as calvárias foram lavadas cuidadosamente com tampão DBSS (tampão de dissecação, do inglês *Dissection Buffer Salt Solution*) por 4 vezes, sendo descartado por aspiração à vácuo. Para a preparação do tampão DBSS utilizamos o tampão HBSS (tampão de Hank, do inglês *Hank's Buffer Salt Solution*) adicionado de gentamicina (Sigma®) a 50 µg/mL e anfotericina B (Sigma®) a 2,5 µg/mL. Para o preparo do HBSS utilizamos 1,3mM CaCl₂ (anidro); 5,4 mM KCl; 0,4 mM KH₂PO₄; 0,5mM MgCl₂.6H₂O; 0,4mM MgSO₄.7H₂O; 136,9 mM NaCl; 4,2 mM de NaHCO₃; 0,3mM Na₂HPO₄.7H₂O; conforme protocolo de Freshney (2010). Todos os reagentes usados eram da Merck®.

Para que fosse possível obter células individualizadas, ao invés de fragmentos de explante, realizamos digestão enzimática utilizando-se inicialmente tripsina 0,1%, 7mL por tubo, durante 15 min a 37°C e em agitação suave (80rpm). Decorrido esse período, todo o sobrenadante foi descartado e o tubo lavado com tampão PBS por 3 vezes, sendo descartado por aspiração à vácuo. Para o preparo do PBS foram utilizados 1,8mM CaCl₂ (anidro); 2,68 mM KCl; 1,47 mM KH₂PO₄; 0,5mM MgCl₂.6H₂O; 3,98mM MgSO₄.7H₂O; 136,9 mM NaCl; 8,06mM Na₂HPO₄.7H₂O (conforme protocolo de Freshney, 2010). Todos os reagentes usados eram da Merck®.

Para cada tubo, 3mL de collagenase 1mg/mL foram adicionados e mantidos novamente a 37°C e agitação suave (80rpm) por 90min. Após a digestão, a enzima foi inibida com 3mL de soro fetal bovino. Todo o conteúdo foi coletado e adicionado em novo tubo para posterior centrifugação.

O sobrenadante foi centrifugado a 800rpm por 5min, ressuspendido em meio completo e incubado por 24h (adaptado de Yadav e colaboradores, 2011). Depois da incubação foi feita uma lavagem cuidadosa em PBS para remover as células mortas. O meio completo era composto de αMEM (Sigma-Aldrich®) (**Figura 6A**) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell®), 50µg/mL de gentamicina, 25µg/mL anfotericina B (**Figura 6B**).

Figura 6: Meio (A) e antibiótico e antifúngico (B) utilizados com as linhagens C3H e C57.

Para todos os experimentos, as células coletadas das calvárias dos camundongos C3H e C57 estavam entre as passagens 1 e 3 e a expansão foi realizada em garrafas de cultura de células de 25, 75 ou 150 cm² até que atingissem a quantidade necessária para cada experimento. Para isso, utilizamos α MEM (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino (Nutricell®) e 50U/mL de penicilina, 50mg/mL estreptomicina (Sigma®), que passaremos a denominar como meio de Expansão (ME).

Os pré-osteoblastos da linhagem MC3T3 foram cultivados em meio MEM com antibióticos (Nutricell®) suplementado com 9 nucleosídeos (**Tabela 1**) (Sigma®) e soro fetal bovino a 10% (SFB) (ZAMBUZZI et al., 2008).

Tabela 1. Concentração de nucleosídeos utilizados na suplementação do meio MEM para o cultivo das células da linhagem MC3T3.

Nucleosídeo	Concentração (mg/L)
Adenosina	10
Citidina	10
2'-Desoxiadenosina·H ₂ O	10
2'-Desoxicitidina HCl	11
2'-Desoxiguanosina	10
Guanosina	10
Ácido Lipóico	0,2
Timidina	10
Uniridina	10

Independente do experimento a ser realizado, ou da origem celular, a expansão foi realizada por digestão enzimática, utilizando-se a enzima tripsina (0,25%) pelo tempo máximo de 10min e sua inativação foi feita com o dobro de volume de meio de cultura contendo soro fetal bovino (**Figura 7**).

Para a contagem das células utilizamos o método descrito por Freshney (2011), utilizando a coloração por Azul de Tripan em câmara de Neubauer (**Figura 8**). Seguindo esse protocolo, não devemos contar as células que incorporaram o corante, pois possivelmente não estejam mais viáveis. Realizamos os cálculos necessários, de acordo com a área da câmara e o volume final de onde coletamos as células para contagem e temos o total de células nesse dado volume.

4.2 Concentrações dos fluoretos

Para os ensaios com a linhagem MC3T3-E1 foram utilizadas as concentrações de NaF e AlF_3 de 0, 5 μM , 10 μM , 100 μM e 1mM. Com relação às células da calvária das linhagens C3H e C57, foram utilizadas as concentrações de 0, 5 μM , 10 μM , 100 μM e 1mM de NaF.

Figura 7: Subcultivo celular. **A)** Aspecto do fundo da garrafa de cultura durante o processo de digestão enzimática com tripsina. **B)** Todo o conteúdo da garrafa que recebeu a digestão enzimática é colocado em um tubo cônico e centrifugado. **C)** Aspecto do concentrado celular após a centrifugação. **D)** Aspecto do concentrado celular após o descarte do meio.

Figura 8: Contagem de células. **A)** Câmara de Neubauer utilizada nesse estudo. **B)** Aplicação na Câmara de Neubauer de 10 μ L contendo diluição celular e azul de tripan. **C)** Visualização de um dos quadrantes. **D)** Posicionamento da câmara de Neubauer no microscópio invertido para a contagem de células.

4.3 Etapa 1: Viabilidade celular sob diferentes concentrações de fluoretos de dois sais fluoretados

Os ensaios de Redução de MTT e Incorporação de Vermelho Neutro foram utilizados para avaliar-se a viabilidade celular das células osteoblásticas quando tratadas com sais fluoretados.

Essa etapa buscou verificar: 1) Viabilidade celular de dois fluoretos: NaF e AlF_3 ; e 2) viabilidade do NaF frente a células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto.

4.3.1 Viabilidade celular pela Redução do MTT

Este ensaio, definido na literatura como apropriado para estimativa de citotoxicidade (HANSEN ET AL., 1989; SCHWEIKL E SCHMALZ, 1996), baseia-se na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presente nas mitocôndrias de células viáveis) apresenta de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazoldifeniltetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela (**Figura 9A**), em cristais de formazana, que são de cor azul escura. Esta capacidade, que somente as células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (CARMACHIEL 1989; SLETTEN ET AL., 1999; DAHL, 2006), que pode ser comparada com um grupo não tratado e uma estimativa é feita com relação à diminuição da absorção nos grupos tratados.

No dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi removido das células, as placas foram lavadas 2x com PBS (**Figura 9B**), os respectivos tratamentos foram colocados nos poços (**Figuras 9C**) e confirmados no microscópio (**Figura 9D**).

A atividade mitocondrial foi avaliada através da incubação das células em uma solução de 0,5mg de MTT/ mL de ME, por 4h, a 37°C em incubadora de CO_2 (5%). Após a remoção da solução, o pigmento insolúvel reduzido intracelularmente foi excluído em 200µL de DMSO à temperatura ambiente (**Figura 10A**). Em seguida, a absorbância foi mensurada a 570 nm (Fluorstar Optima- BMG Labtech) (**Figura 10B**).

4.3.2 Viabilidade celular pela Incorporação do Vermelho Neutro

Figura 9: MTT e os tratamentos. **A)** Aspecto macroscópico do sal de Tetrazolium (cor amarela). **B)** Lavagem das placas de 96 poços com PBS 1X. **C)** Aplicação dos respectivos tratamentos. **D)** Observação das placas em microscópio invertido.

Este ensaio baseia-se na aplicação de um corante (vermelho neutro) que penetra a membrana celular de células viáveis, difundindo-se e concentrando-se nos lisossomos. Assim, permite a distinção entre células viáveis, danificadas e mortas, baseado na capacidade que os lisossomos celulares têm de absorver o corante (BORENFREUND & PUENER, 1984).

Utilizamos o corante na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de vermelho neutro em ME. A solução obtida permaneceu em estufa 37°C, *overnight* para haver a precipitação de cristais.

As células foram tratadas com essa solução e as placas incubadas por 3h, a 37°C, para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis (**Figura 11A**). Em seguida, foram lavadas com PBS, sendo o corante extraído numa solução de etanol 50% e ácido acético 1%, colocando-se 200 μL dessa solução/poço (**Figura 11B**). A absorbância foi determinada a 540 nm no espectrofotômetro (Fluorstar Optima- BMG Labtech).

Figura 10: Dissolução dos cristais de formazana e o espectrofotômetro. **A)** placa do experimento de MTT após a incubação e posterior dissolução dos cristais com DMSO. **B)** Espectrofotômetro com leitor de microplaca utilizado nesse ensaio.

4.3.3 Viabilidade celular de dois sais fluoretados

Nessa etapa, as células da linhagem MC3T3-E1 foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 células por poço, em placas de 96 poços poços (6,54 mm de diâmetro interno, 0,396 cm^2 de área de crescimento, TPP). Decorridos 24 horas do

plaqueamento, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e o tratamento com os fluoretos foi adicionado.

Figura 11: Aplicação do Vermelho Neutro. **A)** Aplicação do Vermelho Neutro em placa de 96 poços. **B)** Aspecto das placas após a extração do corante.

A viabilidade celular foi testada após 24, 48, 72 e 96 horas do tratamento (37°C, 5% CO₂). Os ensaios foram realizados em sextuplicatas. Utilizamos os tratamentos com os fluoretos descritos no item 4.1.4, além de um grupo Blank (apenas meio ME sem células) e um grupo controle (células sem tratamento).

4.3.4 Viabilidade de células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto

Nesse ensaio, utilizamos uma densidade celular de 5×10^3 células por poço, em placas de 96 poços poços (6,54 mm de diâmetro interno, 0,396 cm² de área de crescimento, TPP®).

Os ensaios foram realizados em sextuplicatas e avaliados 24, 48, 72, 96 e 120 horas após o plaqueamento. Utilizamos os tratamentos com NaF descritos no item 4.1.4, além de um grupo controle (células sem tratamento).

4.4 Etapa 2: Efeitos do fluoreto sobre o processo de mineralização

As células da linhagem MC3T3-E1 foram cultivadas conforme descrição do item 4.3.2 sem a indução osteogênica.

Nessa etapa, as células C3H e C57 receberam a indução osteogênica. Para isso, ao MEM foram adicionados os fatores 10 mmol/L beta-glicerofosfato e 50µg/mL de ácido ascórbico, passando a ser denominado de meio osteogênico (MO). Assim, as células receberam, além dos respectivos tratamentos com fluoretos, a indução osteogênica concomitante.

4.4.1 Análise das Fosfatases

As células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/cm² e tratadas com os grupos experimentais especificados acima por 7, 14, 21 e 28 dias para as linhagens C3H e C57 e 24, 48, 72 e 96 horas para MC3T3-E1.

Cada tratamento foi realizado em triplicata para ambas linhagens C3H e C57 (tratamento com NaF) e MC3T3-E1 (tratamento com NaF e AlF₃) em placas de 24 poços (TPP®).

Decorridos os períodos experimentais, o meio foi removido e coletado, recebendo o termo de “Sobrenadante”. Em seguida foi armazenado a -20°C em microtubos identificados.

As células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com tampão 20mM Tris HCl pH 7,5; 0,5mM de MgCl₂; 0,1% Triton X-100 em pH 7,5 adicionado de inibidor de proteases (seguindo as especificações do fabricante).

Os lisados celulares foram transferidos para um microtubo e sonicados por 3 pulsos de 10s cada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10min a

12000 rpm e armazenadas a -20°C até o momento da análise. Essas amostras foram denominadas “Lisados”.

No dia da análise, os microtubos foram descongelados em gelo. Os ensaios foram realizados utilizando-se o kit FOSFATASES da empresa Doles®, baseado na utilização de p-nitrofenilfosfato como substrato para a enzima.

Foram utilizadas placas de 96 poços e as leituras foram feitas em espectrofotômetro a $\lambda = 410\text{nm}$.

Para tanto utilizamos 10 μL de amostra, 40 μL do tampão específico para cada enzima (Alcalina: tampão pH 10,5; ácida total: tampão 4,8; ácida resistente ao tartarato: pH 4,8 contendo ácido tartárico), 50 μL de substrato (p-nitrofenilfosfato) e 200 μL de NaOH 0,1M.

Para os ensaio da fosfatase alcalina, as placas foram incubadas por 10min a 37°C e para as fosfatases ácidas por 30 min a 37°C .

Os resultados das absorbâncias foram comparados com os padrões fornecidos pelo kit e expressos em UI/L.

4.4.2 Comprovação da Mineralização por Von Kossa

A comprovação da mineralização foi feita por meio do ensaio do Von Kossa (**Figura 12A**) após 28 dias com tratamento com MO para a linhagem C57, conforme descrito no item **4.3**.

As células foram plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^4$ células por cm^2 em placas de 12 poços e divididas em 5 grupos experimentais: Controle (apenas com meio ME), Controle MO (apenas com meio MO), I (meio MO + 10^{-3}M NaF), II (meio MO + 10^{-4}M NaF) e III (meio MO + 10^{-5}M NaF).

Decorridos o período experimental, os meios foram removidos dos poços e lavados 2 vezes com PBS. As culturas foram fixadas com etanol 100% por 10 min. Todo o etanol foi removido, sendo os poços lavados 3 vezes com PBS e cobertos com nitrato de prata a 5% e mantidas sob luz ultravioleta por 30 min. Após três novas lavagens com PBS, a solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos e

lavados novamente (**Figuras 12B e C**). As imagens foram capturadas em um microscópio invertido (**Figura 12D**).

Figura 12: Reagentes e ensaio Von Kossa. **A)** Reagentes utilizados no ensaio Von Kossa. **B)** Placa sendo lavada com tiossulfato de sódio. **C)** Aspecto final da placa. **D)** Microscópio utilizado para captura das imagens.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do Excel para o cálculo da média e desvio-padrão. Foi realizado a ANOVA a três critérios, utilizando o Software STATISTICA 11.0. Manteve-se o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados utilizando-se a mesma sequência da descrição em Material e Métodos.

5.1 Viabilidade celular testando diferentes concentrações de fluoreto e de sais fluoretados

5.1.1 Viabilidade celular testando dois sais fluoretados

5.1.1.1 Redução do MTT

Todos os valores das absorvâncias obtidas com o ensaio da redução do MTT estão apresentados na **Figura 13 e Apêndice A**. Pudemos observar, para o ensaio de redução do MTT, que houve diferença estatisticamente significativa entre os dois fluoretos observados, NaF e AlF_3 ($p < 0,001$). Também é possível afirmar que os tempos experimentais mostraram grandes diferenças entre si ($p < 0,001$). O efeito tipo de fluoreto e sua concentração vai depender do período experimental considerado, sendo que nos períodos 24h e 96h foram registrados os maiores valores de absorvância, tanto para ambos fluoretos avaliados, apesar de mais acentuado para NaF.

Houve diferença estatística significativa entre o período de 48h e 72h para ambos fluoretos e é possível observar uma diminuição na absorvância para todos os grupos nesse período ($p < 0,001$).

Figura 13. Ensaio da Redução do MTT. Média e desvio-padrão dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

5.1.1.2 Incorporação do Vermelho Neutro.

As médias $\pm$ desvios padrões das absorbâncias obtidas com o ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro estão ilustrados na **Figura 14 e Apêndice B**.

O teste de Tukey nos mostra que houve diferenças entre os fluoretos ($p < 0,001$). Quando foram consideradas apenas as concentrações para o Vermelho Neutro não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. O período de 72h foi considerado significativo quando comparado com os demais períodos. Observamos uma homogeneidade nos valores de absorbância entre os períodos para os dois fluoretos estudados.

5.1.2 Viabilidade de células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto

5.1.2.1 Redução do MTT

A viabilidade das linhagens C3H e C57 obtida pela redução do MTT está ilustrada na **Figura 15 e Apêndice C** na forma de média $\pm$ desvio padrão das absorbâncias obtidas após os tratamentos com NaF. Nesse ensaio observamos uma homogeneidade nos valores obtidos pela linhagem C57 ao longo dos períodos experimentais. Por outro lado, observamos que, para todos os grupos experimentais da linhagem C3H houve picos nas absorbâncias encontradas nos períodos de 72 e 120h. Os outros períodos experimentais apresentaram valores estatisticamente inferiores nas absorbâncias da linhagem C3H.

Esse ensaio nos permitiu perceber uma diferença estatística significativa entre as linhagens ($p < 0,001$) sendo que C57 apresentou maior viabilidade nos períodos de 24, 48 e 96h, enquanto que C3H apresentou maiores valores em 72 e

120h, para todos os grupos experimentais. Esses resultados comprovam o comportamento distinto das linhagens frente ao tratamento com o fluoreto.

5.1.2.2 Incorporação do Vermelho Neutro

Em semelhança ao MTT, as duas linhagens apresentaram comportamentos distintos frente a esse ensaio ($p < 0,001$). Na **Figura 16 e Apêndice D** observamos as diferenças nas absorbâncias para as duas linhagens pesquisadas após o ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. De um modo geral, para a linhagem C3H observamos os valores variando de 0 (grupo $10^{-5}M$) no período de 72h até valores altos de absorbância (0,717) para o grupo $10^{-5}M$ no período de 24h. Da mesma forma, não houve uma homogeneidade para esse ensaio para C57, variando de 0,647 para o grupo $10^{-5}M$ no período de 120h até valor 0 no período de 24h para os grupos Controle, 10^{-3} e $10^{-5}M$.

O período de 24h para a linhagem C57 não foi conclusivo pois todos os valores apresentaram-se nulos, inclusive o grupo controle. A partir de 48h, observamos que o grupo de $10^{-3}M$ (48, 96 e 120h) e controle (72h) apresentaram os menores valores de absorbância. Por outro lado, o grupo de $10^{-5}M$ apresentou os maiores valores de absorbância, embora esse aumento não tenha sido estatisticamente diferente do grupo controle para o período de 48h ($p = 0,070$).

O período de 72h também não foi conclusivo para essa linhagem, uma vez que poucos valores diferiram de zero. Para a linhagem C3H observamos que os menores valores de absorbância predominaram na concentração $10^{-3}M$, com exceção de 24h que o grupo controle apresentou a menor absorbância, contudo sem diferença estatisticamente significativa com o grupo $10^{-3}M$. Esses menores valores para o grupo $10^{-3}M$ foram estatisticamente significantes na comparação com 10^{-4} ($p = 0,015$) e $10^{-5}M$ ($p < 0,001$) para 48h e na comparação com controle e $10^{-4}M$ no período de 120h.

Com relação aos maiores valores de absorvância, podemos dizer que o grupo tratado com 10^{-5} M de NaF da linhagem C3H apresentou maiores valores de absorvância para 24h (0,717) e 48h (0,714), com diferenças estatisticamente significantes quando comparado com os demais grupos nos dois períodos experimentais ($p < 0,001$). Para os períodos de 96 e 120h verificamos que a concentração 10^{-4} M apresentou os maiores valores de absorvância (0,043 e 0,441), diferindo estatisticamente de 10^{-3} e 10^{-5} M em 120h (0,049 e 0,163) ($p < 0,001$).

5.2. Efeitos do fluoreto sobre o processo de mineralização

5.2.1 Ensaio das Fosfatases

5.2.1.1 Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina nas células tratadas com diferentes concentrações de sais fluoretados

Os dados referentes à fosfatase alcalina encontram-se na **Figura 17 e Apêndice E** e estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorvância convertidos em UI/L. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os 2 fluoretos testados com $p=0,109$, embora diferenças pontuais tenham sido encontradas.

O período de 24h apresentou diferença estatística significativa entre os fluoretos para as concentrações de 10^{-5} M, 5×10^{-6} M e 10^{-3} M ($p=0,043$, $0,491$ e $p=0,043$, respectivamente). Observamos que o período de 48h apresentou diferença estatisticamente significativa quando fazemos uma avaliação geral do AlF_3 . Pela avaliação das multiplicas comparações de Tukey verificamos diferenças estatísticas significantes no fluoreto de alumínio após 48h apenas nas

comparações do controle com as demais concentrações de fluoreto, apresentando $p < 0,001$ para todas as comparações. Com relação ao NaF, nesse mesmo período, não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p = 0,171$).

O período de 72h não demonstrou diferenças estatísticas significantes para nenhum dos grupos fluoretados, considerando-se os dois tipos de fluoretos estudados e os grupos fluoretados. As comparações com os tipos de fluoretos e as diversas concentrações para o período de tratamento de 96h, também não demonstrou diferenças significantes ($p = 0,062$). O grupo Controle do AlF_3 diferiu dos grupos fluoretados, apresentando valores bastante superiores aos demais grupos nos períodos de 24, 48 e 72h.

Figura 14. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Média e desvio-padrão dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Figura 15. Ensaio da Redução do MTT. Média e desvio-padrão das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 16. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Média e desvio-padrão das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 17. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

5.2.1.2 Atividade enzimática da Fosfatase Ácida Total nas células tratadas com diferentes concentrações de sais fluoretados

Os dados referentes a fosfatase ácida total encontram-se na **Figura 18 e Apêndice F** e estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância convertidos em UI/L.

O teste de ANOVA a três critérios nos mostrou que os tipos de fluoretos diferiram entre si, com significância estatística ($p < 0,001$). Em geral, o AlF_3 apresentou valores maiores de fosfatase ácida quando comparado com NaF, embora em diversos grupos as diferenças não fossem estatisticamente significantes.

Quando o fator de comparação considerado foi o tempo, pudemos verificar que 24h apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com os demais períodos experimentais, com $p < 0,001$.

O fluoreto de alumínio mostrou diferenças estatísticas bastante significantes, quando comparamos os valores de fosfatase ácida após 24h de tratamento com relação aos demais períodos ($p < 0,001$). No caso do NaF, apenas os períodos de 48 e 96h diferiram entre si. Para 48h e NaF, os valores estiveram na faixa de 0,10 a 0,24 UI/L e para 96h na faixa de 0,06 a 0,19 UI/L.

Figura 18. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

5.2.1.3 Atividade enzimática da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato nas células tratadas nas diferentes concentrações de sais fluoretados

Os dados referentes à fosfatase ácida resistente ao tartarato encontram-se na **Figura 19 e Apêndice G** e estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão dos valores de absorbância convertidos em UI/L.

A análise da variância a 3 critérios mostrou que houve diferença estatisticamente significativa para a fosfatase ácida resistente ao tartarato com a linhagem MC3T3, nos tipos de fluoretos pesquisados para o período de 24h ($p < 0,001$).

Para 48h, considerando-se apenas o tratamento com NaF, não observamos diferenças estatísticas entre as concentrações nesse período. Da mesma forma podemos afirmar para o AlF_3 .

No período de 72h podemos verificar que as concentrações 10^{-5} e $5 \times 10^{-6}\text{M}$ não apresentaram diferenças entre NaF e AlF_3 , com $p = 0,821$ e $p = 0,007$.

O período de 96h não apresentou diferenças estatísticas entre os fluoretos para nenhum dos grupos. Também não foram encontradas diferenças entre as concentrações, dentro do mesmo fluoreto.

5.2.1.4 Fosfatase Alcalina nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto

5.2.1.4.1 Lisados

Os valores da fosfatase alcalina estão na **Figura 20 e Apêndice H** demonstrados na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L.

Foi possível observar uma interação significativa entre a linhagem celular, a concentração e o tempo, de forma estatisticamente significativa ($p=0,007$). Considerando-se apenas a linhagem estudada, verificamos que houve diferença estatística significativa entre C3H e C57 com $p<0,001$, sendo que no geral, a primeira linhagem apresentou os maiores valores de atividade da enzima.

O período de 7 dias apresentou os maiores valores para C3H e por outro lado, para C57, esse período representou as menores médias de atividade da enzima. Nesse período ainda observamos que com relação às linhagens celulares comparadas com as concentrações de fluoreto, houve diferença estatística com $p<0,001$, uma vez que os valores de absorbância foram significativamente maiores para a linhagem C3H. Apesar desses valores menores e maiores nesse período, não pudemos observar diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações para ambas linhagens ($p=0,052$).

Da mesma forma, o período de 14 dias apresentou diferenças estatísticas ($p<0,001$) quando foram consideradas as linhagens com relação às diferentes concentrações de fluoreto.

Seguindo o padrão dos períodos anteriores, após 21 dias de tratamento, a análise da relação das diferentes linhagens com diferentes concentrações demonstrou grande diferença estatística, com $p<0,001$, novamente com C3H apresentando valores superiores a C57.

Da mesma forma, o período de 28 dias mostrou grande diferença estatística entre a comparação das linhagens com as diferentes concentrações de fluoreto ($p < 0,001$), apresentando C3H os maiores valores novamente.

5.2.1.4.2 Sobrenadantes

Os valores da fosfatase alcalina obtida dos Sobrenadantes estão expressos na **Figura 21 e Apêndice I** na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L.

A ANOVA a três critérios das absorbâncias da fosfatase alcalina obtidas a partir dos sobrenadantes mostra uma grande diferença estatística quando consideramos as linhagens estudadas, os períodos experimentais e as concentrações de fluoretos utilizadas ($p < 0,001$). As linhagens celulares diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,001$). Além disso, o grupo Controle demonstrou comportamento distinto dos demais grupos experimentais para quase todas as comparações ($p < 0,001$).

Quando nos reportamos aos períodos experimentais, observamos que o período de 7 dias foi diferente dos demais períodos ($p < 0,001$), apresentando os maiores valores para ambas linhagens. Da mesma forma, observamos que o período de 28 dias também diferiu dos períodos 14 e 21 dias ($p < 0,001$).

Não observamos diferenças estatisticamente significantes nas comparações entre linhagem e concentração nos períodos de 7 dias ($p < 0,001$) e 21 dias ($p < 0,009$), embora tenham havido diferenças individuais, quando comparamos cada concentração com o tipo de linhagem.

Da mesma forma, observamos diferenças estatísticas significantes ($p < 0,001$) entre as linhagens no período de 14 dias, com C57 apresentando maiores valores.

Para o período de 21 dias, observamos que as linhagens apresentaram diferenças entre si ($p < 0,001$). O período de 28 dias demonstrou novamente diferenças entre as linhagens estudadas ($p < 0,001$). Novamente os controles para ambas linhagens apresentaram os maiores valores de atividade da enzima. Porém os valores aos 28 dias foram inferiores aos valores aos 21 dias, para quase todas as comparações das duas linhagens.

5.2.1.5 Fosfatase Ácida Total nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto

5.2.1.5.1 Lisados

Os valores dos Lisados da fosfatase ácida total estão expressos na **Figura 22 e Apêndice J** na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L.

De um modo geral, houve diferenças estatísticas significantes entre as linhagens de camundongos pesquisadas ($p < 0,001$). No entanto, considerando-se apenas as concentrações ou apenas os períodos experimentais, não pudemos observar diferenças estatísticas entre os grupos, dentro da mesma linhagem.

A linhagem C57 apresentou quantidades de fosfatase ácida muito superiores aos valores observados para C3H, considerando-se todas as concentrações e todos os tempos experimentais ($p < 0,001$). Os valores para C57 variaram de 10,44 UI/L para MO no período de 28 dias até 13,74 UI/L também para MO, porém no período de 14 dias e 13,74 para o controle de 21 dias. No caso de C3H, as variações foram de 6,95 UI/L para CO e após 28 dias de tratamento até 8,33 UI/L para 10^{-4} M no período de 14 dias.

Após 7 dias de tratamento, as linhagens apresentaram-se diferentes mas não houve diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações,

dentro da mesma linhagem celular. Para C57, os valores variaram de 10,53 UI/L (CO) a 12,38 UI/L (10^{-5} M) e para C3H variaram de 7,30 UI/L (10^{-4} M) a 8,18 UI/L (10^{-5} M).

Após 14 dias de tratamento, também verificamos que houve diferenças entre as linhagens ($p < 0,001$), embora não tenhamos observado diferenças nas absorbâncias dos grupos dentro da mesma linhagem. Enquanto na linhagem C3H, o grupo 10^{-4} M (8,33 UI/L) apresentou os maiores valores, para a linhagem C57, esse mesmo grupo representou os menores valores, nesse período (11,20 UI/L). Assim, os valores para C3H variaram de 7,62 UI/L (10^{-3} M) a 8,33 UI/L, enquanto que para C57 variaram de 11,20 a 13,74 UI/L para MO.

O período seguinte, 21 dias, não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos da linhagem C3H, embora os grupos 10^{-5} M (7,60 UI/L) e 10^{-4} M (8,02 UI/L) tenham representado os menores e maiores valores, respectivamente. Para a linhagem C57, o menor valor de absorbância foi encontrado pelo grupo 10^{-4} M (10,95 UI/L), que se apresentou diferente do grupo Controle (13,74 UI/L) ($p = 0,006$), MO (13,69 UI/L) ($p = 0,007$) e 10^{-5} M (13,86 UI/L) ($p = 0,004$). Esse grupo foi o que apresentou menores valores de absorbância, mas não se apresentou diferente do grupo 10^{-3} M (11,05 UI/L).

No período de 28 dias também percebemos que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos da linhagem C3H, com valores variando de 6,95 UI/L para o Controle a 7,81 UI/L para o grupo 10^{-5} M. Porém na linhagem C57 algumas diferenças foram notadas. O grupo controle apresentou os maiores valores de atividade da enzima (13,55 UI/L) e o grupo MO apresentou os menores valores (10,44 UI/L), com diferenças estatísticas entre eles ($p = 0,002$). O grupo 10^{-5} M (12,01 UI/L) não apresentou diferenças com nenhum dos demais grupos.

Figura 19. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Figura 20. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 21. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

5.2.1.5.2 Sobrenadantes

Os valores da fosfatase ácida total dos sobrenadantes estão expressos na **Figura 23 e Apêndice K** na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L.

De um modo geral, a linhagem C3H apresentou valores de fosfatase ácida total coletada dos Sobrenadantes superiores à linhagem C57, com exceção ao grupo MO após 28 dias de tratamento, na qual observamos que os valores para C3H foram ligeiramente inferiores. No geral, os valores dessa fosfatase para C3H variaram de 6,40 no grupo MO (28 dias) a 13,42 UI/L para controle (28 dias). Para C57, os valores foram inferiores, variando de 4,77 UI/L no grupo controle (21 dias) a 8,64 UI/L no grupo 10^{-5} M (28 dias).

Verificamos que após 7 dias de tratamento, as diferenças observadas entre as linhagens não foram estatisticamente significantes ($p=0,457$). Nos demais períodos, houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de absorbância das linhagens ($p\leq 0,039$).

Os períodos experimentais também foram significantes quando consideramos os valores das fosfatases. Para C3H, o período de 28 dias apresentou diferença estatística quando comparado com 7 ($p<0,001$) e 14 dias ($p=0,021$), pois alguns grupos apresentaram valores bastante superiores. Por outro lado, a linhagem C57 não apresentou diferenças com relação aos períodos experimentais.

No período de 7 dias verificamos que para ambas linhagens, o grupo 10^{-5} M apresentou os menores valores de absorbância, com valores 7,52 UI/L (C3H) e 6,95 UI/L (C57). Para o mesmo período, os maiores valores foram obtidos pelo grupo MO (C3H) (8,16 UI/L) e 10^{-3} M (C57) (7,66 UI/L).

Após 14 dias de tratamento, observamos que o grupo controle (9,45 UI/L) e o grupo 10^{-4} M (7,78 UI/L) representaram o maior e menor valores para a linhagem C3H e os grupos 10^{-3} M (7,98 UI/L) e MO (5,22 UI/L) para a linhagem C57.

De forma diversa, percebemos que os grupos MO (10,18 UI/L) e 10^{-5} M (8,64 UI/L) foram os maiores valores e o grupo controle (7,19 e 4,77 UI/L) os menores valores, respectivamente para C3H e C57 após 21 dias de tratamento.

Observamos que o grupo MO apresentou os menores valores após 28 dias de tratamento, para ambas linhagens, com valores de 6,65 UI/L para C57 e 6,395 UI/L para C3H. Para C3H os grupos controle (13,42 UI/L) apresentaram os maiores valores e para C57, os maiores valores foram obtidos também por 10^{-5} M (8,64 UI/L).

5.2.1.6 Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato nas células com diferentes susceptibilidades ao fluoreto

5.2.1.6.1 Lisados

Os valores dos Lisados da fosfatase ácida resistente ao tartarato estão expressos na **Figura 24 e Apêndice L** na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L. Embora com valores próximos, verificamos que houve diferença estatística entre as linhagens celulares ($p < 0,001$). Numa visão geral, verificamos que os valores de C57 variaram de 8,52 UI/L (10^{-4} M) no período de 7 dias a 10,04 UI/L (10^{-5} M) no período de 14 dias e para C3H variaram de 7,62 UI/L para CO (28 dias) a 8,92 UI/L para 10^{-4} M (14 dias).

Comparando-se as concentrações dentro de um mesmo período experimental, apenas foi possível observar diferenças estatísticas significantes após 14 dias de tratamento, entre as concentrações 10^{-3} M e 10^{-5} M ($p = 0,029$).

A linhagem C3H apresentou valores variando de 8,00 para o grupo 10^{-4} M até 8,78 UI/L para o grupo 10^{-5} M para o período de 7 dias. Nesse mesmo período

verificamos que os valores de C57 ficaram entre 8,52 UI/L também para o grupo 10^{-4} M e 9,30 UI/L para o grupo 10^{-3} M.

Aos 14 dias o grupo 10^{-3} M (8,09 UI/L) apresentou os menores valores para C3H e o grupo 10^{-4} M os maiores valores (8,92 UI/L). Para C57 os menores valores foram observados no grupo 10^{-4} M (9,09 UI/L) e os maiores 10^{-5} M (10,04 UI/L).

No período de 21 dias as médias de absorbâncias para C3H ficaram entre 8,19 UI/L (10^{-5} M) e 8,69 UI/L (10^{-4} M) e para C57 entre 8,97 UI/L (10^{-5} M) e 9,63 UI/L (10^{-3} M).

No período de 28 dias, os menores valores para C3H foram do grupo Controle (7,62 UI/L) e os maiores para 10^{-3} M (8,52 UI/L). De forma oposta, o grupo 10^{-3} M (8,54 UI/L) representou os menores valores para C57 e o grupo 10^{-5} M representou os maiores valores (8,94 UI/L).

5.2.1.6.2 Sobrenadantes

Os valores dos Sobrenadantes da fosfatase ácida total estão expressos na **Figura 25 e Apêndice M** na forma de média $\pm$ desvio padrão convertidos em UI/L. De um modo geral, podemos dizer que a linhagem C3H apresentou valores maiores de fosfatase ácida resistente ao tartarato, obtidos das absorbâncias dos sobrenadantes, quando comparada com a linhagem C57 ($p < 0,001$). Para C3H, os valores variaram de 13,31 UI/L para 10^{-5} M e período de 28 dias até 35,81 UI/L para 10^{-4} M no período de 14 dias. Por outro lado, a variação para C57 foi de 6,98 UI/L para MO no período de 7 dias até 20,77 UI/L também para MO, porém no período de 28 dias.

Para o período de 7 dias verificamos que o grupo 10^{-5} M de C3H apresentou os maiores valores de absorbância (29,57 UI/L) apresentando diferença estatística com MO (14,18 UI/L), 10^{-3} M (16,59) e 10^{-4} M (14,14) ($p < 0,001$). Da mesma forma,

o grupo controle (24,80 UI/L) diferenciou-se de MO, 10^{-3} e 10^{-4} M ($p<0,001$). Para C57 não observamos diferenças entre os grupos nesse período ($p=0,970$). Os valores de C57 variaram de 6,98 UI/L (MO) a 8,02 UI/L (10^{-5} M).

Novamente não observamos diferenças para C57 após 14 dias de tratamento ($p=0,984$), com valores variando de 7,67 UI/L (MO) a 8,62 UI/L (10^{-5} M). Para C3H verificamos que a concentração 10^{-4} M (35,81 UI/L) e 10^{-5} M (22,90 UI/L) diferenciaram dos demais grupos, que apresentaram valores inferiores de absorbância ($p\leq 0,001$). Para essa linhagem, os menores valores foram de 15,35 UI/L para o Controle.

Após 21 dias de tratamento, as células da linhagem C57 continuaram sem diferenças estatísticas entre si ($p=0,234$), porém algumas diferenças encontramos para a linhagem C3H ($p\leq 0,032$). Os valores de C57 variaram de 7,22 UI/L (Controle) a 11,11 UI/L (10^{-3} M). Para C3H observamos que o grupo 10^{-3} M (28,26) diferenciou-se de 10^{-4} M (23,11 UI/L), de 10^{-5} M (19,63 UI/L), de MO (16,87 UI/L) e do controle (15,35 UI/L). Da mesma forma, notamos diferenças quando comparamos 10^{-4} M com 10^{-5} M, MO e Controle.

No período seguinte, 28 dias, observamos que o grupo MO não demonstrou diferenças estatísticas significantes entre as linhagens celulares ($p=0,281$). Nesse período verificamos que o grupo MO (20,77 UI/L) de C57 apresentou valores superiores aos demais grupos, com diferença estatística bastante significativa entre eles ($p<0,001$). A linhagem C3H apresentou o grupo 10^{-5} M (13,31 UI/L) com os menores valores de absorbância, diferenciando-se estatisticamente dos grupos MO (18,89 UI/L) (maiores valores), controle (18,55 UI/L) e 10^{-4} M (18,41 UI/L).

Figura 22. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidas dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 23. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidas dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 24. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Figura 25. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

5.2.2 *Von Kossa*

Foi realizada a confirmação osteogênica para a linhagem C57 no período de 21 dias, conforme podemos confirmar nas **Figuras 26-29**. As figuras são representativas dos grupos analisados. O tratamento com 10^{-3}M não foi capturado uma vez que as células descolaram durante o processamento para essa técnica.

A observação das placas coradas com *Von Kossa* (VK) mostra que o grupo controle praticamente não produziu áreas características de matriz mineralizada. Por outro lado, os demais grupos analisados, MO, 10^{-4}M e 10^{-5}M mostraram regiões coradas, sendo que houve uma diferença visual bastante significativa no grupo com menor concentração de fluoreto, 10^{-5}M , que pareceu estar muito mais corado que os demais, para os 3 poços observados nesse período.

O grupo MO e 10^{-4}M também apresentaram incorporação do corante, mostrando sinais de tecidos mineralizados.

Figura 26: Fotomicrografia das placas coradas com *Von Kossa* para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo Controle (**A** e **B**). Observamos raríssimas áreas de incorporação do corante. As setas amarelas indicam áreas de mineralização e as setas vermelhas núcleos celulares. **A** e **B**: objetiva de 40X.

Figura 27: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo MO (A e B). Observamos algumas áreas de incorporação do corante. As setas amarelas indicam áreas de mineralização e as setas vermelhas núcleos celulares. Objetiva de 40X.

Figura 28: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo 10^{-4}M de NaF (**A** e **B**). Observamos áreas pequenas e difusas de incorporação do corante. As setas amarelas indicam áreas de mineralização e as setas vermelhas núcleos celulares. Objetiva de 40X.

Figura 29: Fotomicrografia das placas coradas com Von Kossa para a linhagem C57 após 21 dias experimentais. Grupo 10^{-4}M de NaF (A e B). Observamos áreas pequenas e difusas de incorporação do corante. As setas amarelas indicam áreas de mineralização e as setas vermelhas núcleos celulares. Objetiva de 40X.

6 DISCUSSÃO

Os mecanismos celulares e moleculares da toxicidade dos fluoretos sobre os osteoblastos, embora exaustivamente estudados, ainda não foram totalmente elucidados. Muitos trabalhos são realizados com diversos tipos de células osteoblásticas, sejam elas de cultura primária ou linhagem imortalizada, nas mais diversas concentrações de NaF e em variados tempos experimentais (EVERETT, 2010; MOUSNY ET AL., 2008; MORH E KRAGSTRUP, 1991; FARLEY et al., 1983). Assim, a quantidade de trabalhos e resultados usando diferentes metodologias impede maiores comparações entre efeitos e mecanismos moleculares. Tentamos delimitar alguns pontos e dividir o projeto para poder relacionar os achados e responder os objetivos.

Nosso trabalho foi dividido em duas etapas, pois achamos oportuno investigar num primeiro momento a influência de dois sais fluoretados sobre uma linhagem imortalizada de camundongos, com poucas variações entre as células e posteriormente investigarmos a viabilidade do NaF sobre duas linhagens de camundongos com densidades ósseas distintas coletadas de uma cultura primária de calvária, dessa forma, uma população heterogênea.

Nessa discussão, abordamos os resultados obtidos e sua relação com as informações pertinentes da literatura histórica e atual na área. De forma a termos uma discussão mais profícua, dividimos em 2 tópicos: **1) Efeito do F na viabilidade celular e 2) Efeito do F nas fosfatases.**

6.1 Efeito do F na viabilidade celular

A ação anabólica do fluoreto sobre o tecido ósseo já foi bastante estudado. O flúor altera a composição e estado cristalino da matriz mineral, estimulando a síntese de matriz e a formação óssea (PAK et al., 1995). *In vivo*, o fluoreto participa da formação do fosfato de cálcio e apresenta um grande efeito sobre o processo, a natureza e as propriedades do mineral formado, mesmo nos demais tecidos mineralizados. O efeito melhor documentado é na substituição da hidroxila na estrutura

da apatita na formação do esmalte dentário, diminuindo o volume do cristal e aumentando, dessa forma, a estabilidade estrutural (AOBA, 1997).

Uma variação na resposta óssea ao fluoreto já foi atribuída a fatores genéticos. Doses crescentes de fluoreto NaF (0 , $2,5 \times 10^{-5}$, 5×10^{-5} e 10^{-4} M) administradas a três linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades de desenvolvimento de fluorose de esmalte dentário (A/J “suscetível”, SWR/J “intermediária” e 129P3/J “resistente”) levaram a efeitos diferentes nas propriedades mecânicas do osso trabecular e cortical. O tratamento do fluoreto não teve efeito significativo sobre a microarquitetura das três linhagens e todas elas apresentaram aumento significativo na formação de osteóide em grandes doses de fluoreto. O osso trabecular do corpo vertebral revelou heterogeneidade da mineralização que foi significativamente diminuída na linhagem SWR/J nas doses 5×10^{-5} e 10^{-4} M. Os perfis de mineralização do osso cortical e trabeculado mostraram uma tendência para uma mineralização aumentada, sem diferença estatística, conforme as doses de fluoreto eram aumentadas, para as três linhagens. Os cristais apresentaram-se menores para 129P3/J e aumentados para as outras linhagens, conforme as doses de fluoreto aumentaram. A microdureza do osso cortical e trabeculado não se alterou com os tratamentos com flúor (MOUSNY et al., 2008). Também nesse sentido nossos resultados não deixam dúvidas sobre o comportamento distinto das linhagens pesquisadas, sobretudo considerando-se as culturas primárias de C3H e C57. Os valores de viabilidade demonstrados por essas linhagens foi bastante distinto em todos os períodos experimentais, tanto para o ensaio de MTT, quanto de Vermelho Neutro.

Em osteoblastos de aves foi demonstrado que o fluoreto de sódio (NaF) levou ao aumento da taxa de proliferação quando foram administradas doses inferiores a 10^{-5} M, além de aumentar de maneira dose dependente a atividade de fosfatase alcalina. Esse estudo também confirmou o padrão bimodal do fluoreto, uma vez que na concentração superior a 10^{-5} M causou um efeito inibitório sobre a proliferação osteoblástica. Em nosso trabalho, no ensaio de MTT com a linhagem MC3T3, também observamos um aumento na proliferação após 24 e 96 para as concentrações 10^{-5} e 5×10^{-6} M tanto para NaF quanto para AlF_3 , embora para o fluoreto de alumínio não tenha sido estatisticamente significativo. Para o Vermelho Neutro com essa linhagem, verificamos

ligeiro aumento de viabilidade na concentração de 10^{-5}M , porém sem diferença estatística. Considerando-se as linhagens C3H e C57 também verificamos que a concentração de 10^{-5}M também estimulou a proliferação celular para todos os períodos estudados, com diferença estatisticamente significativa nos períodos de 72h e 120h para ambas linhagens, quando comparado com o grupo controle.

Osteoblastos caprinos também já foram estudados com relação à ação do fluoreto e mostraram que concentrações de 10^{-8} a 10^{-5}M promoveram a proliferação celular, sendo de 10^{-4} a 10^{-3}M ocorreu um efeito inibitório.

Osteoblastos de ratos recém-nascidos foram cultivados na presença de diversas concentrações de NaF, variando de 10^{-5} a $7 \times 10^{-4}\text{M}$ e os efeitos desses modo dose-dependente e os efeitos foram máximos após 120h de incubação. Dose altas de fluoreto, 5 a $7 \times 10^{-4}\text{M}$ suprimiram a proliferação no período de 72h. Doses inferiores a 10^{-5}M não tiveram efeito sobre a proliferação e os períodos de 96 e 120 horas causaram diminuição na proliferação para todos os grupos (YAN et al., 2008). Células ósseas obtidas de fêmures de ratos foram avaliadas após o tratamento com 2 concentrações de fluoreto, 10^{-5}M ou 10^{-7}M , apresentando efeito insignificante sobre a viabilidade celular (WADDINGTON E LANGLEY, 1998).

Em nosso estudo observamos uma semelhança para a linhagem MC3T3 que também teve no período de 72 horas seus menores valores de viabilidade celular. No entanto, como o grupo controle também apresentou menores valores de viabilidade, podemos sugerir que isso deve ser uma decorrência da confluência celular e não diretamente relacionada ao tratamento com NaF. Mesmo no caso do AlF_3 , embora com viabilidade menor quando comparada ao NaF, os menores valores de viabilidade ocorreram no período de 72h. Com relação às células das linhagens C3H e C57, observamos um efeito diverso na viabilidade celular. A linhagem C3H apresentou uma viabilidade relativamente menor à linhagem C57, para todos os grupos experimentais e em todos os períodos estudados. Também observamos que a viabilidade de C3H foi bastante aumentada no período de 72 horas em oposição ao estudo com os osteoblastos de rato, provavelmente por diferenças na susceptibilidade das células ao fluoreto. Para a concentração de 10^{-3}M , o período de 72 horas também foi crítico para C57, observando os menores valores de viabilidade, que aumentaram bastante em 96

horas, voltando a diminuir após 120 horas de tratamento. Para C3H, o período de 96 horas foi o que causou a maior diminuição da viabilidade, confirmando o comportamento distinto dessas duas linhagens de camundongos em cultura. Para os pré-osteoblastos em cultura, o período de 72h também apresentou os menores valores de viabilidade.

O significativo declínio na cárie dentária observada em diversos países é atribuído, em grande parte, ao uso efetivo dos fluoretos tópicos e sistêmicos (BASTOS ET AL., 2005; BARDAL ET AL., 2005; BUZALAF ET AL., 2009). Além dessa redução nas cáries, a prevalência de fluorose tem sido observada (BUZALAF E LEVY, 2011; LEVY ET AL., 2010; WONG ET AL., 2010). A fluorose pode se manifestar tanto na forma dentária, quanto na forma esquelética e ocorre quando o fluoreto interage com os tecidos em mineralização, levando a alterações nesse processo (DENBESTEN, 1999). Como já descrito previamente, a ação do fluor sobre os tecidos mineralizados depende sobremaneira da genética, pois diferentes populações apresentam diferentes susceptibilidade aos fluoretos.

O grau de sítio-especificidade na qual um gene influencia a quantidade e arquitetura óssea foi investigada em fêmures de três linhagens de camundongos, incluindo-se duas linhagens utilizadas por nós, C57, com baixa massa óssea, BALB-c, média massa e C3H com alta massa. Comparando-se as propriedades morfológicas de diferentes regiões da cortical e do trabeculado do fêmur das três linhagens, aparentemente sugere que valores alto ou baixos de parâmetros específicos da morfologia óssea não podem ser consistentemente atribuídos ao mesmo grupo genético. Por exemplo, o volume ósseo da porção trabecular da metáfise foi 385% maior em C3H que em C57, sendo que as duas linhagens apresentam volumes ósseos similares nas epífises. Da mesma forma, BALB-c tiveram 48% mais osso trabecular nas epífises que C3H, mas nenhuma diferença foi encontrada na área cortical das diáfises pelas linhagens. Assim, os resultados sugerem que um controle genético da massa e morfologia óssea, mesmo num determinado osso, apresenta uma alta especificidade de local e não é possível extrapolar as avaliações de um local para outro, mesmo dentro de um único osso (JUDEX et al., 2004). Observamos um comportamento distinto entre as três linhagens estudadas para praticamente todos os ensaios realizados,

principalmente no que se refere às diferenças nos valores das fosfatases, que além das diferenças atribuídas aos experimentos, sobretudo na comparação dos ensaios de C3H-C57 com MC3T3, podemos atribuir às diferenças genéticas entre as células derivadas dessas três linhagens de camundongos.

6.2 Efeito do F nas fosfatases

Nossos resultados não deixam dúvidas sobre o comportamento distinto das linhagens pesquisadas, também com relação ao estudo das fosfatases. Quando consideramos diretamente essas diferenças com relação à responsividade ao fluoreto, podemos nos reportar a estudos prévios que demonstraram essas diferenças em diversas populações, inclusive humanas (DEQUEKER ET AL., 1962; RUSSEL ET AL., 1962; MOUSNY ET AL., 2008; YAN et al., 2011).

Além disso, nas comparações da fosfatase alcalina, com exceção de poucos grupos, a grande maioria demonstrou diferença estatisticamente significativa quando as duas linhagens foram comparadas.

Buscando verificar se a maior densidade óssea de C3H seria um resultado da maior formação óssea, a fosfatase alcalina foi quantificada no soro, ossos e células ósseas desses camundongos e de C57. Os camundongos C3H mostraram maiores valores de fosfatase alcalina no soro às 6 e 32 semanas de idade. As tíbias coletadas também apresentaram maiores níveis de fosfatase para C3H, assim como as células cultivadas a partir de explantes ósseos. Células cultivadas a partir da digestão enzimática da calvária, semelhante ao nosso estudo, mostraram as mesmas diferenças entre as linhagens. Os autores correlacionaram esses níveis mais elevados de fosfatase alcalina em C3H com uma maior formação óssea. Embora pareçam contraditórios, nossos resultados podem ser correlacionados. Partindo-se de um plaqueamento com o mesmo número de células, observamos que o flúor estimulou mais a proliferação na linhagem C57, comprovada por maior redução do MTT para todos os períodos. No entanto, a fosfatase alcalina apresentou-se menor em C57 quando comparada com C3H para quase todos os períodos. Correlacionando-se que a taxa proliferativa de C57 foi maior que C3H, podemos extrapolar que no final dos

tempos experimentais tínhamos maior número de células C57. Ainda assim, observamos quantidade menor de C57 nos lisados e moderadamente maior nos sobrenadantes. Assim, pensando na célula individualmente, podemos afirmar que cada célula expressou menos fosfatase em C57, quando comparada com C3H, corroborando o ensaio anterior (DIMAL et al., 1998). Além disso, já foi demonstrado que a maior densidade óssea de C3H, quando comparada com C57, pode ser um resultado de um menor taxa de apoptose das células de C3H, avaliada através da administração de estimulados e inibidores conhecidos da apoptose às células derivadas de culturas primárias dessas linhagens (SHENG et al., 2006).

Para a fosfatase ácida verificamos que no caso das comparações dos lisados celulares também houve diferenças estatísticas em todas as comparações, para todos os períodos. Nos sobrenadantes, com exceção do período de 7 dias, os demais períodos mostraram distinção entre todos os grupos das duas linhagens, de modo estatisticamente significante. A fosfatase ácida resistente ao tartarato demonstrou diferenças entre todas as concentrações das duas linhagens, demonstrando que as diferenças encontradas aos 7 dias pelas fosfatases ácidas totais referem-se a outras fosfatases ácidas (provavelmente a fosfatase ácida lisossomal). Assim, nossos achados corroboram a literatura ao mostrar as diferenças entre essas duas linhagens frente ao tratamento com fluoreto.

Já foi demonstrado que aos 4 dias, os valores de fosfatase alcalina variaram de 0,050 a 0,150 em diversos tratamentos de fluoreto, de 5×10^{-6} a 3×10^{-5} M (RODRIGUEZ E ROSSELOT, 2001). No mesmo período, as absorbâncias da linhagem MC3T3 apresentaram valores parecidos, variando de 0,078 a 0,082 para as concentrações em questão. A mesma comparação torna-se incompatível com o estudo das linhagens C57 e C3H pois foram utilizados períodos superiores a 7 dias.

A atividade da fosfatase alcalina aumentou a habilidade mineralizadora de osteoblastos de caprinos tratados com as concentrações de 10^{-5} a 10^{-7} M de NaF. As atividades enzimáticas da fosfatase alcalina também não se apresentaram lineares e as concentrações de 10^{-7} a 10^{-5} M apresentaram os maiores valores (0,380 a 0,430) no período de 48 horas (QU et al., 2008). No mesmo período, em nosso estudo, as células da linhagem MC3T3 apresentaram menor valor de atividade enzimática, variando de

0,100 a 0,385. Embora pareçam discrepantes, os resultados apresentam similaridade se considerarmos que são células de origem distintas e realizados em momentos distintos.

A importância das fosfatases, sobretudo a família das fosfatases alcalinas já foi bastante estudada. Camundongos sem o gene da fosfatase alcalina óssea apresentam hipomineralização do esqueleto causada pela inabilidade que os cristais imaturos dentro das vesículas de mineralização apresentam de se autonuclearem e se proliferarem além dos limites das membranas da vesícula, na ausência das fosfatases alcalinas (ANDERSON et al., 2004).

Para que essas enzimas possam trabalhar de forma efetiva, há a necessidade de um balanço de íons. A adição de 50µg/mL de ascorbato de sódio às culturas confluentes de células ósseas isoladas de calvária de ratos resultou em um aumento de 21% na produção de DNA, de 50% na incorporação de [¹⁴C] prolina às proteínas colagênicas e não colagênicas e um aumento de 200% na atividade da fosfatase alcalina, demonstrando a importância desse elemento para a manutenção ou até estimulação de um fenótipo ósseo normal (SPINDLER et al., 1989). Nosso estudo, porém, não demonstrou esse aumento na atividade da fosfatase alcalina, tanto dos lisados quanto dos sobrenadantes, com relação ao grupo controle não tratado. Sabe-se que a adição desses elementos tem um efeito inibitório da proliferação celular e que muitas células em cultura poderiam estar em um estado de indiferenciação que não permitiu que houvesse o aumento da atividade dessa enzima. Para a linhagem C3H, verificamos que o grupo MO apresentou valores inferiores ao controle em todos os períodos para os sobrenadantes e lisados, com exceção de 14 dias lisado em que o MO apresentou-se superior, embora sem diferenças estatísticas. Com relação à linhagem C57, observamos a mesma linearidade de comparação para os sobrenadantes, quando verificamos valores de MO inferiores ao Controle em todos os períodos e para os sobrenadantes, apenas o período de 28 dias apresentou valores ligeiramente superiores ao controle, sem diferença estatística. Por se tratar de uma linhagem caracterizada, verificamos as fosfatases dos pré-osteoblastos de MC3T3 em períodos curtos e sem a adição desses elementos.

O transporte de Pi para o interior das vesículas de matriz liberadas pelos osteoblastos, que é uma etapa fundamental no processo de mineralização óssea mostrou não ter relação com a atividade da fosfatase alcalina, sobretudo o transporte mediado por Sódio. Isso foi demonstrado utilizando-se um inibidor conhecido dessa enzima, Levamisol, que inibiu a atividade da fosfatase alcalina, sem alterar o transporte de Pi (MONTESSUIT et al., 1991). Essa pode ser uma das explicações do porque da atividade das fosfatases ter parecido inferior no grupo MO, pois provavelmente outras enzimas podem ter sido ativadas quando foi adicionado fluoreto de sódio ao meio de cultura.

A linhagem MC3T3, que células são derivadas de calvárias de camundongos, produz vesículas de matriz e uma matriz extracelular colagenosa que se calcifica *in vitro* (QUARLES et al., 1992). Sabendo-se que as vesículas de matriz contém grandes quantidades de fosfatase alcalina (ANDERSON et al., 1985) acreditamos que os baixos valores de fosfatase alcalina encontrados para o experimento com MC3T3 são um reflexo do tempo experimental curto, que não possibilitou a ativação da enzima, mesmo em uma cultura com células pré-osteoblásticas, embora tenhamos observado atividade enzimática. Acreditamos que o mesmo motivo possa ser aplicado aos baixos valores de fosfatase ácida total e resistente ao tartarato observados nesse estudo para essa linhagem. Outro ponto a ser considerado para a linhagem MC3T3 é que não houve a adição de íons Ca^{+2} e Pi ao meio de cultura e é necessária essa acumulação inicial de íons para que o processo de mineralização da matriz óssea prossiga mais rapidamente (CAVERSAZIO E BONJOUR, 1996).

Células de culturas primárias de lavados de fêmures foram avaliadas para a atividade da fosfatase alcalina no décimo quarto dia de isolamento, período no qual foi observada alta fase mineralizadora. Com o intuito de investigar o padrão de expressão das proteínas ósseas durante a diferenciação dos osteoblastos, cultura primária de tecido ósseo esponjoso de adultos saudáveis foi realizada para comparar com o sistema de diferenciação de ratos. Uma das proteínas investigadas foi a fosfatase alcalina, sob condições basais e com a influência do ácido ascórbico. Foram analisadas células na segunda passagem em diferentes tempos experimentais, do dia 1 ao 32, comparando-se o grupo controle com aquele que recebeu o estímulo do ácido

ascórbico. Durante o período de maturação de matriz, os autores encontraram a continuidade da proliferação, apesar da expressão aumentada da fosfatase alcalina (SIGGELKOW et al., 1999).

Considerando-se os ensaios com a Linhagem MC3T3, verificamos que o mesmo não ocorreu. Os períodos para o ensaio de viabilidade MTT e VN e das fosfatases são coincidentes e podemos afirmar que o fluoreto de sódio diminuiu a atividade das fosfatases alcalinas, uma vez que o grupo controle apresentou uma viabilidade bastante elevada, quando comparado aos demais grupos. Ao mesmo tempo, o tratamento com fluoreto de alumínio pareceu não interferir com a atividade da fosfatase alcalina.

Nesses períodos experimentais, a viabilidade de ambos tratamentos com fluoretos foi alta, embora tenha havido uma inibição na atividade da fosfatase alcalina para o mesmo período. Esses resultados estão de acordo com a literatura que mostram que a proliferação atua como um fator inibidor da maturação osteoblástica e da matriz e da mesma forma a maturação da matriz atua como inibidor da proliferação e isso é comprovado pois ocorrem alterações drásticas nos padrões protéicos dessas etapas, principalmente nos momentos de transição entre a maturação e a proliferação, sendo a fosfatase alcalina uma das proteínas mais importantes na etapa inicial da mineralização (DWORETZKY et al., 1990).

Com relação ao ensaio com as linhagens C3H e C57, não é possível fazer o mesmo tipo de analogia, uma vez que os tempos experimentais dos ensaios de viabilidade e das fosfatases são distintos. Como a linhagem MC3T3 foi caracterizada como pré-osteoblastos, um período curto em cultura é suficiente para que possamos verificar o início do processo de mineralização, no entanto culturas primárias são populações heterogêneas podendo ser compostas de células fibroblásticas, células tronco, células da linhagem osteoblástica, osteoblastos em diversas etapas de diferenciação (BELOWS E AUBIN, 1989) necessitando de um período maior para que possamos verificar a atividade de enzimas, mesmo aquelas produzidas desde os momentos iniciais da mineralização, como é o caso das fosfatases alcalinas. Seguindo o mesmo raciocínio da presença de uma população heterogênea na qual apenas aproximadamente 0,30% das células coletadas de calvárias são osteoprogenitoras

(BELLOWS E AUBIN, 1989), entendemos o motivo pelo qual observamos a expressão das fosfatases, tanto ácida quanto alcalina, em ambas linhagens, embora com padrões diferentes de produção em alguns grupos e durante todos os períodos experimentais.

A incorporação de cálcio por células coletadas de fêmures de ratos e tratadas com fluoreto de sódio nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-7} M foi avaliada por Von Kossa e mostrou que a deposição de cálcio pareceu ser tanto pericelular quanto intracelular após 12 dias de tratamento, sendo visível a partir do sétimo dia e que a concentração de 10^{-5} M pareceu aumentar essa deposição (WADDINGTON E LANGLEY, 1998). Nosso trabalho demonstrou resultados similares de deposição de mineral para a mesma concentração para a linhagem C57. No entanto, nossa avaliação ocorreu em período maior, aos 21 dias de tratamento com fluoreto de sódio.

A presença de fosfatases ácidas em osteoblastos já foi demonstrada há décadas (BURNSTORM, 1959; WERGEDAL E BAYLINK, 1969; HAMMARSTROM, 1971; HAMMARSTROM E, HASSELGREN, 1974; NISSEN E MAGNUSSON, 1981). A enzima TRAP é geralmente utilizada como um marcador de osteoclastos. Ainda assim, outras células ósseas, como osteoblastos e osteócitos também podem expressar a atividade dessa enzima. Há algumas décadas já foi demonstrada sua marcação em osteoblastos e osteócitos coletados de costelas e tíbias de ratos (BIANCO et al., 1988). Os osteoblastos contendo TRAP são vistos particularmente em contato com as áreas de absorção, sugerindo que de alguma forma os osteoclastos podem estar induzindo a atividade dessa enzima nos osteoblastos (PEREZ-AMODIO et al., 2006). A cultura de osteoblastos humanos com ou sem um meio de cultura condicionado, coletado de monócitos sanguíneos humanos (usado como fonte de precursores de osteoclastos) foi realizada e observou-se que altos níveis de TRAP foi encontrados nas células osteoblásticas cultivadas com o meio condicionado. Os osteoblastos cultivados em meio não-condicionado também apresentaram expressão de TRAP, porém em níveis muito menores (PEREZ-AMODIO et al., 2005).

Um estudo histoquímico e imunohistoquímico, a partir de células de metáfise com fosfatase alcalina e TRAP em osteoblastos, mostrou que a TRAP é um marcador típico, porém não específico, dos osteoclastos. Ambas as enzimas podem ser usadas para identificar os precursores de osteoblastos e osteoclasto, respectivamente e foram

encontradas nos osteócitos. Tanto a alcalina, quanto a TRAP são expressas por células osteoblásticas (BONUCCI E NINCI, 2001).

Um subtipo de TRAP, a TRAP-5, já foi purificada de osteoblastos, tanto de matrizes humanas quanto de cortical óssea bovina. Uma comparação das propriedades bioquímicas dessa enzima com a TRAP-5 osteoclástica sugere que tratam-se de isoenzimas distintas. No entanto, parece que a TRAP-5 atua como uma fosfatase tirosina, além disso é sensível à inibição por altas concentrações de fluoreto. Como já demonstramos a importância do fluoreto como estimulador osteoblástico e um potente agente osteogênico e sabendo-se que a fosforilação da proteína tirosina exerce um importante papel regulatório na proliferação e diferenciação celular, já foi proposto que a essa ação osteogênica do fluoreto seja mediada, pelo menos em parte, por uma inibição da TRAP-5 osteoblástica, mediada pelo fluoreto, levando a uma estimulação da proliferação e diferenciação osteoblástica (LAU E BAYLINK, 2003).

Também já foi demonstrado que as mesmas concentrações de Fluoreto capazes de aumentar a proliferação de osteoblastos, leva a inibição da atividade da fosfatase ácida osteoblástica (10^{-6} a 10^{-4} M) (LAU ET AL., 1988; LAU et al., 1989). Essa alta sensibilidade da fosfatase ácida ao fluoreto parece ser específica dos tecidos esqueléticos, de modo que pode ocorrer estímulo de fosforilação, provalvemente nos resíduos de tirosina, em células da calvária intacta ou de membranas isoladas da calvária. Também ficou demonstrado que o uso dos agentes ortovanato ou molibdato, potentes inibidores da atividade da fosfatase ácida, também estimularam a proliferação celular, demonstrando que a inibição da fosfatase ácida óssea leva à estimulação da proliferação celular. Esses achados propõem um model para o mecanismo bioquímico da ação osteogênica do fluoreto pela inibição direta da atividade de uma fostase ácida osteoblástica que, por sua vez, aumenta a fosforilação geral do resíduo tirosil da célula, resultante em uma subsequente estimulação da proliferação óssea (LAU et al., 1989).

Também buscamos associar essa ação inibitória do fluoreto sobre as fosfatases ácidas produzidas pelos osteoblastos quando observamos os baixos valores dessas enzimas, tanto a ácida total, quanto a resistente ao tartarato, para a linhagem MC3T3. Sem esquecer que utilizamos períodos experimentais curtos, acreditamos que tenha ocorrido esse efeito inibitório do fluoreto sobre as fosfatases ácidas, uma vez que

utilizamos nesse estudo concentrações de fluoreto que já demonstraram esse papel inibidor ($< 10^{-3}\text{M}$). Verificamos que isso ocorreu tanto para o NaF quanto para o AlF_3 , indicando que a ação deva ser inerente ao fluoreto, independente da composição da molécula.

No entanto, essa mesma analogia obtida dos estudos prévios com nossos resultados para a linhagem MC3T3 não puderam ser observados para as linhagens C3H e C57, nas quais praticamente não observamos diferenças entre os tratamentos com fluoreto, nas diversas concentrações, quando comparados ao grupo controle. Os valores foram extremamente maiores que aqueles obtidos com MC3T3. Novamente ressaltamos que os períodos experimentais para as linhagens C3H e C57 foram maiores, 7-28 dias, enquanto que para MC3T3 foram curtos, 24-96h. Além disso, as células obtidas com a coleta da calvária das linhagens C3H e C57 tratavam-se de uma população heterogênea, sendo assim, a interferência do fluoreto não ocorre de forma tão direta quanto em culturas de osteoblastos ou de pré-osteoblastos, como é o caso da MC3T3.

Com relação ao NaF, podemos ainda afirmar que, aumentou a atividade das fosfatases ácidas totais para todos os tempos experimentais, apesar de não apresentar diferenças estatisticamente significantes com o grupo controle para quase todas as comparações. A mesma correlação não pode ser feita com relação ao fluoreto de alumínio, uma vez que o mesmo aumentou em alguns períodos e algumas concentrações, enquanto que em outros períodos e outras concentrações, houve uma inibição. Nesse caso também podemos dizer que muitas dessas diferenças em relação ao controle não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas. A ação mitogênica do alumínio parece estar relacionada com o aumento na produção de IGFs e a incorporação de timidina tritiada (indicador de proliferação celular) em células TE85 de osteosarcoma humano. Esse resultados obtidos com o tratamento com alumínio mostraram que a ação mitogênica do alumínio ocorreu de forma bifásica e dose-dependente (LAU et al., 1993).

O alumínio é capaz de aumentar a formação óssea, através de osteoesclerose em minerais expostos ao fluoreto sódico de alumínio (Na_3AlF_6) (PAK et al., 1998). Além disso, o fluorossilicato estimula a fosforilação da proteína tirosina mediada pela

proteína G em células MC3T3 (SUSA et al., 1997). Os mesmos autores também demonstraram que o fluoraluminato induz a proteína tirosina fosforilada de 110kDa (PyK2) que é uma quinase citoplasmática relacionada a Fak (quinase de adesão focal, do inglês *focal adhesion kinase*). A influência do fluoraluminato sobre PyK2 ocorreu de modo tempo e dose dependentes. Esses resultados demonstram a importância do fluoraluminato na osteogênese (JESCHKE et al., 1998).

O alumínio apresenta um efeito colateral em animais com falência renal crônica e de forma oposta, um efeito osteogênico em animais com função renal normal (COBURN, 1990). O efeito do alumínio sobre o metabolismo ósseo de ratos osteopênicos foi estudado por meio da adição de NH_4Cl (2%) à água de beber, durante 6 meses. Um grupo de animais recebeu o alumínio intraperitonealmente, na forma de AlCl_3 (10 mg/kg/5 dias/semana) e um grupo não recebeu nenhum tratamento após a administração do NH_4Cl . Foram avaliados marcadores bioquímicos para Ca, P, Cr, Al, osteocalcina e hidroxiprolina, como também marcadores de densidade mineral e histomorfometria óssea. Não foram encontradas diferenças entre os marcadores bioquímicos, mas a histomorfometria apresentou diferenças significantes entre os grupos, indicando que em ratos com função renal normal, o alumínio foi capaz de induzir formação óssea, mesmo na presença de osteopenia (GOMEZ-ALONSO et al., 1999).

Assim como nossos achados parecem mostrar resultados contrastantes para o fluoreto de alumínio, estudos com o Alumínio também apresentam. Em animais com função renal normal, o depósito de alumínio no osso não irá necessariamente produzir alterações na mineralização. Dois efeitos distintos já foram demonstrados: um defeito na mineralização levando a osteomalacia, podendo ser reversível quando da administração de vitamina D (OTT ET AL., 1987) e um estímulo da formação óssea (GOMES et al., 1991; QUARLES et al., 1988), que mostrou-se proporcional ao tempo de exposição e à dose administrada, resultando em novo trabeculado, diminuição da reabsorção óssea, aumento no número de osteoblastos e alguns defeitos de mineralização (QUARLES et al., 1990).

O alumínio também foi estudado em cães beagle normais para verificar os efeitos principais sobre o osso e aprofundar os estudos sobre a dose e tempo

dependência desse elemento. Doses baixas de alumínio (0.75 mg/kg) aumentaram consideravelmente seu nível no soro ($151,7 \pm 19,9$), mas não causou alterações nos níveis de cálcio, creatinina ou hormônio paratireoideano. Também apresentou uma absorção óssea reduzida e superfícies ósseas cobertas com osteoblastos, indicativas de um baixo *turnover* ósseo após 8 semanas de tratamento. Os tratamentos prolongados resultaram em aumento do volume ósseo e da quantidade de osso trabecular. Tratamentos prolongados com altas doses apresentaram resultados similares ao tratamento longo com baixa dose, indicando que os tratamentos longos podem induzir a um balanço ósseo positivo (QUARLES et al., 1988).

Não existem trabalhos utilizando o AlF_3 e o tecido ósseo, dificultando a comparação de nossos resultados com os trabalhos citados anteriormente, que utilizaram outras formas de administração do alumínio. Nosso enfoque, por outro lado, foi mostrar outra forma de administração do fluoreto, além da *gold standard* NaF, buscando uma maneira de potencializarmos os efeitos benéficos do fluoreto sobre o tecido ósseo.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Entre os sais de fluoreto, apenas o NaF promove alterações na viabilidade celular das células MC3T3;
- O trifluoreto de alumínio (AlF_3) não exerce efeito na atividade enzimática da fosfatase alcalina, no entanto, o efeito desse fluoreto sobre a atividade das fosfatases ácidas totais e ácida resistente ao tartarato ocorre de modo dicotômico;
- Quando consideramos uma população celular heterogênea, coletada de calvária, como foi o caso das linhagens C3H e C57, verificamos que o fluoreto (NaF) interfere tanto sobre a proliferação, quanto com relação ao perfil das fosfatases de modo bastante distinto para ambas linhagens celulares.

Em vista do descrito acima, o NaF é capaz de exercer efeitos mais diversificados em diferentes tipos celulares, alterando viabilidade celular e atividade de enzimas; em contrapartida o AlF_3 produz efeitos mais específicos e delimitados em pré-osteoblastos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anagnostou F, Plas C, Forest N. Ecto-alkaline phosphatase considered as levamisole sensitive phosphohydrolase at physiological pH range during mineralization in cultured fetal calvaria cells. *J Cell Biochem* 1996; 60: 484-494.
2. Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundis GR, Martin, TJ. *Handbook of Experimental Pharmacology*. v. 107. Heidelberg: Springer. 1993; 267-288.
3. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, Dhamyamaraju R, Atti E, Camacho NP, Millan JL. Impaired Calcification Around Matrix Vesicles of Growth Plate and Bone in Alkaline Phosphatase- Deficient Mice *Am J of Pathol*, 2004 Mar; 164(3).
4. Anderson HC: Matrix vesicle calcification: Review and update. In: *Bone and Mineral Research* PECK WA, Amsterdam, Elsevier Science 1985; 3:109-150.
5. Anderson TR, Toverud SU. Purification and characterization of purple acid phosphatase from developing rat bone. *Arch Biochem Biophys*. 1986 Mai 15; 247(1): 131-9.
6. Aoba T. The Effect Of Fluoride On Apatite Structure And Growth *Crit Rev Oral Biol Med* 1997; 8(2): 136-153.
7. Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV. Proteínas Tirosina Fosfatases: Propriedades e Funções Biológicas Revisão. *Quim. Nova* 2003; 26(6), 896-900, 2003.
8. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tasinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell Physiol*. 1990; 143: 213-221.
9. Ashton BA, Eaglesom CC, Bab I, Owen ME (1984): Distribution of fibroblastic colony-forming cells in rabbit bone marrow and assay of their osteogenic potential by an in vivo diffusion chamber method. *Calcif Tissue Int* 36:83.
10. Askmyr M, Sims NA, Martin TJ, Purton LE. What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? Review *Trends in Endonc Metabol*. 2009; 20(6): 303-309.
11. ATCC:<http://www.atcc.org/ATCCAdvanc%20edCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2593&Template=cellBiology>) Revised: September

2012.

12. Aubin JE, Gupta AK, Bhargava U, Turksen K. Expression and regulation of galectin 3 in rat osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 1996 Dez; 169(3): 468-80.
13. Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In *Principles of Bone Biology* (ed. J. P. Bilezikian L. G. Raisz and G. A. Rodan) 1996; 51-67.
14. Aubin JE. Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes. *J Bone Miner Res.* 1992 Abr; 7(4): 365-8.
15. Aubin, F, Blane, D, Manteaux, A, Agache, P: UV-induced erythema and photocarcinogenesis. *J Dermatol Sci* 1: 465–466, 1990.
16. Baelum V, Fejerskov O, Manji F, Larsen MJ. Daily dose of fluoride and dental fluorosis. *Tandlaegebladet.* 1987 Jun; 91(10): 452-6.
17. Banerjee C, et al. An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteoclastin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 4968-4973.
18. Bardal PAP, Olympio KPK, Buzalaf MAR, Bastos JRM Dental caries and dental fluorosis in 7-12-year-old schoolchildren in Catalão, Goiás, Brazil *J. Appl. Oral Sci.* 2005; 13(1): 35-40.
19. Bar-Shira-Maymon B, Coleman R, Steinhagen-Thiessen E, Silbermann M. Correlation between alkaline and acid phosphatase activities and age-related osteopenia in murine vertebrae. *Calcif Tissue Int.* 1989 Feb; 44(2): 99-107.
20. Bastos JL, Nomura LH, Peres MA. Dental caries and associated factors among young male adults between 1999 and 2003 in Southern Brazil. *Community Dent Health.* 2007 Jun; 24(2): 122-7.
21. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 1991; 14:27-40.
22. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif. Tissue Int.* 1986a; 38:143.
23. Bellows CG, Heersche JNM, Aubin JE. Inorganic phosphate added exogenously or released from P-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules invitro.

Bone Miner. 1992; 17:15-29.

24. Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev Biol.* 1989 Mai; 133(1): 8-13.
25. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE. Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells. *Bone.* 1988;9 (3): 155-63.
26. Bianco P, Ballanti P, Bonucci E. Tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts and osteocytes. *Calcif Tissue Int.* 1988 Set; 43(3): 167-71.
27. Bland YS, Ashhurst DE. Is acid phosphatase activity present in bone matrix at sites of endochondral ossification in rabbit fracture callus? *Histochem J.* 1998 Jun; 30(6): 405-11.
28. Bonucci E, Nanci A. Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. *Ital J Anat Embryol.* 2001; 106(2 Suppl1): 129-33.
29. Borenfreund E, Puerner JA. Short-term quantitative in vitro cytotoxicity assay involving an S-9 activating system. *Cancer Lett.* 1987 Mar; 34(3): 243-8.
30. Boskey AL, Roy R. Cell culture systems for studies of bone and tooth mineralization. *Chem Rev.* 2008 Nov; 108(11): 4716-33.
31. Bossi M, Hoylaerts MF, Millán JL. Modifications in a flexible surface loop modulate the isozyme-specific properties of mammalian alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 1993 Dez 5; 268(34): 25409-16.
32. Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. *Mol Pathol.* 2002 Abr; 55(2): 65-72.
33. Buzalaf MA, Caroselli EE, de Carvalho JG, de Oliveira RC, da Silva Cardoso VE, Whitford GM. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. *J Anal Toxicol.* 2005 Nov-Dez; 29(8): 810-3.
34. Buzalaf MA, Damante CA, Trevizani LM, Granjeiro JM. Risk of fluorosis associated with infant formulas prepared with bottled water. *J Dent Child.* 2004 Mai-Ago; 71(2): 110-3.
35. Buzalaf MA, Levy SM. Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22: 1-19.

36. Buzalaf MA, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. Review. *Monogr Oral Sci.* 2011 Jun; 22:97-114.
37. Buzalaf MA, Vilhena FV, Iano FG, Grizzo L, Pessan JP, Sampaio FC, Oliveira RC. The effect of different fluoride concentrations and pH of dentifrices on plaque and nail fluoride levels in young children. *Caries Res.* 2009; 43(2): 142-6.
38. Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. Review. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:20-36. Epub 2011 Jun 23.
39. Cancedda R, Descalzi F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 1995; 159: 265-358.
40. Canhão H, Fonseca JE, Queiroz MV. Diagnóstico E Terapêutica Da Osteoporose Na Idade Pediátrica *Acta Méd Port* 2004; 17: 385-390.
41. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Review. *Trends Mol Med.* 2001 Jun; 7(6): 259-64.
42. Carmichael DF, Stricklin GP, Stuart JM. Systemic administration of TIMP in the treatment of collagen-induced arthritis in mice. *Agents Actions.* 1989 Jun; 27(3-4): 378-9.
43. Caverzasio J, Bonjour JP. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism. Structural Analysis of Proteoglycans Synthesized By Mineralizing Bone Cells In Vitro in the Presence of Fluoride. *Kidney Int*, 1996; 49: 975-980.
44. Charles Y.C. Pak, Joseph E. Zerwekh, Antich P. Anabolic Effects of Fluoride on Bone *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6: 229-234.
45. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, Bierling P, Hernigou P, Layrolle P, Rouard H. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. *Biomaterials.* 2010; 2: 270-278.
46. Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, Bierling B, Hernigou P, Layrolle P, Rouard H. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate *Biomat.* 2010; 31(2): 270-278.
47. Claassen H, Kampen WU, Kirsch T. Localization of collagens and alkaline phosphatase activity during mineralization and ossification of human first rib cartilage. *Histochem Cell Biol.* 1996 Mar; 105(3): 213-9.

48. Coburn JW. Aluminio y enfermedad ósea. In: Llach F, Valderrábano F. *Insuficiencia Renal Crónica. Diálisis y Transplante Renal*. Norma:Madrid, 1990. 257-281.
49. Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, Nicolas V, Boy-Lefevre ML, Fleisch H, Forest N. Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif. Tissue Int.* 1992; 50: 175-183.
50. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 96: 7294-7299.
51. Comar LP, Wiegand A, Moron BM, Rios D, Buzalaf MA, Buchalla W, Magalhães AC. In situ effect of sodium fluoride or titanium tetrafluoride varnish and solution on carious demineralization of enamel. *Eur J Oral Sci.* 2012 Ago; 120(4): 342-8.
52. Dahl SL, Chen Z, Solan AK, Brockbank KG, Niklason LE, Song YC. Feasibility of vitrification as a storage method for tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng.* 2006 Feb; 12(2): 291-300.
53. de Bernard B, Bianco P, Bonucci E, Costantini M, Lunazzi GC, Martinuzzi P, Modricky C, Moro L, Panfili E, Pollesello P. Biochemical and Immuno histochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca²⁺-binding glycoprotein. *J Cell Biol.* 1986 Out; 103(4): 1615-23.
54. de Carvalho JG, Cestari TM, de Oliveira RC, Buzalaf MA. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008 Mai; 30(4): 287-94.
55. Den Besten PK. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999; 27: 41-47.
56. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986 Mai; 89(2): 271-7.
57. Dequeker J, Declerck K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. *Schweiz Med Wochenschr/ JSuisse Med* 1993; 123: 2228-34.
58. Dimai HP, Porta S, Wirnsberger G, Lindschinger M, Pamperl I, Dobnig H, Wilders-Truschnig M, Lau KH. Daily oral magnesium supplementation suppresses bone turnover in young adult males. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Ago; 83(8): 2742-8.

59. Dougherty JP, et al. New retrovirus helper cells with almost no nucleotide sequence homology to retrovirus vectors. *J. Virol.* 1989; 63: 3209-3212.
60. Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15: 1858-69.
61. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000; 289: 1501.
62. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall A, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997; 89: 747-54.
63. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice *Nature.* 1996; 382: 448.
64. Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, Warrick JM, Stookey GK. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res.* 1995 Jan; 74(1): 358-68.
65. Dworetzky S, Fey EG, Penman S, Lian JB, Stein JL, Stein GS. Progressive changes in the protein composition of the nuclear matrix during rat osteoblast differentiation *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1990; 87: 4605-4609.
66. Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G. Osteoblast isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96: 639-643.
67. Everett ET. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res.* 2011 Mai; 90(5): 552-60.
68. Faller RV, Eversole SL, Yan J. Anticaries potential of a stabilized stannous-containing sodium fluoride dentifrice. *Am J Dent.* 2010 Set; 23(B): 32B-38B.
69. Farley JR, Hall SL, Tanner MA, Wergedal JE. Specific activity of skeletal alkaline phosphatase in human osteoblast-line cells regulated by phosphate, phosphate esters, and phosphate analogs and release of alkaline phosphatase activity inversely regulated by calcium. *J. Bone Miner Res.* 1994; 9: 497-508.
70. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science* 1983; 222: 330-332.
71. Fernandes MD, Yanai MM, Martins GM, Iano FG, Leite AL, Cestari TM, Taga R, Buzalaf MA, de Oliveira RC. Effects of fluoride in bone repair: an evaluation of

RANKL, OPG and TRAP expression. *Odontol.* 2012 Ago 10.

72. Freshney RI, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, 6^a ed, 2010.
73. Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. Culture of Human Stem Cells, Wiley-Liss, Jun 2007.
74. Fukushima O, Bekker PJ, Gay CV. Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. *Am J Anat.* 1991 Jul; 191(3): 228-36.
75. García JF, Camacho FI, Morente M, Fraga M, Montalbán C, Alvaro T, Bellas C, Castaño A, Díez A, Flores T, Martín C, Martínez MA, Mazorra F, Menárguez J, Mestre MJ, Mollejo M, Sáez AI, Sánchez L, Piris MA; Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood.* 2003 Jan 15; 101(2): 681-9.
76. Genge BR, Sauer GR, Wu LNY, McLean FM, Wuthier RE. Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 18513-18519.
77. Geoffroy V, Ducyand P, Karsenty G. A PEBP2/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 30973-30979.
78. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev. Biol.* 1987; 122: 49-60.
79. Goltzman D. Discoveries, drugs and skeletal disorders *Nature Rev Drug Disc* 2002 Out; 1: 784-796.
80. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop* 2007; 18: 444–448.
81. Gomez Alonso C, Menendez Rodriguez P, Fernandez Martín JL, Diaz Lopez JB, Cannata-Andía JB May aluminum be implicated in nutritional aspects related with osteoporosis? In: Burckhardt P, Heaney RP (eds) *Nutritional aspects of osteoporosis*. Sero Symposium, 1991; 85: 235–243.
82. Gomez-Alonso C, Menendez-Rodriguez P, Virgos-Soriano MJ, Fernandez-Martin JL, Fernandez-Coto MT, Cannata-Andi JA. Aluminum-Induced Osteogenesis in

Osteopenic Rats with Normal Renal Function. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 534–541.

83. Gronowicz G, Woodiel FN, McCarthy M-B, Raisz LG. In vitro mineralization of fetal rat parietal bones in defined serum-free medium: Effect of P-glycerol phosphate. *J Bone Miner Res.* 1989; 4: 313-324.
84. Guicheux J, Palmer G, Shukumani C, Hirak Y, Bonjour JP, Cacerzasio J. A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone.* 2000; 27: 69-74
85. Haguenaue D, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Welch V. Fluoride for treating postmenopausal osteoporosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2000, Issue 4. Art. No.: CD002825
86. Hall BK, Dickson R. The effects of parathyroid hormone on osteoblast-like cells from embryonic chick calvaria. *Acta Endocrinol.* 1985; 108: 2-17.
87. Hammarström L. Distribution in developing rat enamel of simultaneously injected fluoride and calcium. *Eur J Oral Sci* 1971; 79: 369–376
88. Hammarström LE, Hasselgren G. Acid phosphatase in developing teeth and bone of man and Macaque monkey. *Eur J Oral Sci* 1974; 2: 381–395.
89. Hansen T, Bratlie A, Johansen B, Hannestad K. Two cytotoxic human-human hybridoma antibodies to HLA: TrAH10 (anti A3.1) and TrAG2 (anti B7, Bw42). *Tissue Antigens.* 1989 Mai; 33(5): 520-30.
90. Harada H , Tagashira S , Fujiwara M , Ogawa S , Katsumata T , Yamaguchi A , Komori T , Nakatsuka M .Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 1999 Mar 12; 274 (11): 6972-78.
91. Harrison G, Shapiro IM, Golub EE. The phosphatidylinositol-glycolipid anchor on alkaline phosphatase facilitates mineralization initiation in vitro. *J. Bone Min. Res.* 1995; 10: 568-573.
92. Hayman AR, Cox TM. Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect *The J Biol Chem.* 1994; 269: 1294-1300.
93. Hazenberg JG, Lee TC, Taylor D. Studying osteocyte function using the cell lines MLO-Y4 and MLO-A5 the role of osteocytes in functional bone adaptation. *Bone*

KEy-Osteo vision. 2006; 3: 10-16.

94. He T, Barker ML, Goyal CR, Biesbrock AR. Anti-gingivitis effects of a novel 0.454% stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a positive control. *Am J Dent*. 2012 Jun; 25(3): 136-40.
95. Helmtrud I. Roach association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *The Histochemical Journal*. 1999; 31: 53-61.
96. Hoffman RA, Houck DW. Cell separation using flowcytometric cell sorting. In: Recktenwald D, Radbruch A. *Cell separation methods and applications*. New York: Dekker, 1997; 237-270.
97. Hornsby PJ, Yang L, Lala DS, Cheng CY, Salmons BA. Modified procedure for replica plating of mammalian cells allowing selection of clones based on gene expression. *Biotech*. 1992; 12: 244-251.
98. Horton WA, Wiley L, Chichester UK. Connective Tissue and Its Heritable Disorders. 1993; 73-84.
99. Hsu HHT, Morris DC, Davis L, Moylan P, Anderson CH. In vitro Ca deposition by rat matrix vesicles: Is the membrane association of alkaline phosphatase essential for matrix vesicle-mediated calcium deposition? *Int. J. Biochem*. 1993; 25: 1737-1742.
100. Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec*. 1998 Dez; 252(4): 554-67.
101. Janan TE. Guide lines for nomenclature of mouse and rat strains international committee on standardized Genetic Nomenclature for Mice (<http://rgd.mcw.edu/nomen/rules-for-nomen.shtml>) Revised: September 2010.
102. Jax Mice Database, 2012. Disponível em 03 de outubro de 2012: <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>
103. Jeschke M, Standke GJR, Susa M Fluoroaluminate Induces Activation and Association of Src and Pyk2 Tyrosine Kinases in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells *J Biol Chem*. 1998 Mai; 273(18): 11354–11361.
104. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived

- from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4; 418(6893): 41-9.
105. Judex S, Garman R, Squire M, Donahue L, Rubin C. Genetically Based Influences on the Site-Specific Regulation of Trabecular and Cortical Bone Morphology *J Bone Min Res*. 2004; 19(4): 600-606.
 106. Kapahi P, Boulton ME, Kirkwood TB. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radic Biol Med*. 1999 Mar; 26(5-6): 495-500.
 107. Karsenty G. Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. *Frontiers in Bioscience*. 1998; 3: 834-837.
 108. Katagiri, T. Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 2002; 8: 147–159.
 109. Kawase T, Suzuki A. Phosphatidic acid-induced calcium mobilization in osteoblasts. *J Biochem*. 1988 Apr; 103(4): 581–582.
 110. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 2001; 276: 7101-7.
 111. King TS, Canez MS, Gaskill S, Javors MA, Schenken RS Chronic cocaine disruption of estrous cyclicity in the rat: dose-dependent effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264(1): 29-34.
 112. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrughe B, Nakashima K, Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med*. 2005 Ago; 11(8): 880-5.
 113. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89: 755-64.
 114. Kurland, E. S., Schulman, R. C., Zerwekh, J. E., Reinus, W. R., Dempster, D. W. and Whyte, M. P. Recovery From Skeletal Fluorosis (an Enigmatic, American Case). *J Bone Miner Res*. 2007; 22: 163–170.
 115. Kuroda S, Sumner DR, Virdi AS. Effects of TGF- β 1 and VEGF-A transgenes on the osteogenic potential of bone marrow stromal cells in vitro and in vivo. *J. Tissue Eng*. 2012; 3(1).

116. Kurt P. Spindler, David B. Shapiro, Stephen B. Gross, Carl T. Brighton, Charles C. Clark The Effect of Ascorbic Acid on the Metabolism of Rat Calvarial Bone Cells In Vitro *J Orthop Res* 1989; 7: 696-701.
117. Lau KH, Farley JR, Freeman TK, Baylink DJ. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. *Metab.* 1989 Set; 38(9): 858-68.
118. Lau KH, Tanimoto H, Baylink DJ. Vanadate stimulates bone cell proliferation and bone collagen synthesis in vitro. *Endocrinol.* 1988 Dez; 123(6): 2858-67.
119. Lau KHW, Baylink DJ. Osteoblastic Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Its Potential Role in the Molecular Mechanism of Osteogenic Action of Fluoride. *J Bone Miner Res*, 2003; 18: 1897–1900.
120. Lau WKH, Baylink DJ. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1660–1667.
121. Lau KH, Utrapiromsuk S, Yoo A, Mohan S, Strong DD, Baylink DJ. Mechanism of mitogenic action of aluminum ion on human bone cells: potential involvement of the insulin-like growth factor regulatory system. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Jun; 303(2): 267-73.
122. Lee KL, Aubin JE, Heershe JNM. P-Glycerophosphate-induced mineralization of osteoid does not alter expression of extracellular matrix components in fetal rat calvarial cell cultures. *J. Bone Miner Res.* 1992; 7: 1211-1219.
123. Levy SM, Broffitt B, Marshall TA, Eichenberger-Gilmore JM, Warren JJ. Associations between fluorosis of permanent incisors and fluoride intake from infant formula, other dietary sources and dentifrice during early childhood. *J Am Dent Assoc.* 2010 Out; 141(10): 1190-201.
124. Li Y, Zhang Y, Shibahara S, Takahashi K. Adrenomedullin in adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Nov 24; 350(3): 616-22.
125. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2004; 14(1-2): 1-41.
126. Lindunger A, MacKay CA, Ek-Rylander B, Andersson G, Marks SC Jr. Histochemistry and biochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and tartrate-resistant acid adenosine triphosphatase (TrATPase) in bone, bone marrow and

- spleen: implications for osteoclast ontogeny. *Bone Miner.* 1990 Ago; 10(2): 109-19.
127. Liu F, Malaval L, Gupta A, Aubin JE. Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev. Biol.* 1994; 166: 220-234.
 128. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells, Molec Dis.* 2001; 27(3): 677-690.
 129. Low MG. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J.* 1987 Mai 15; 244(1): 1-13.
 130. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J. Cell. Biochem.* 1999; 74: 616 -627.
 131. Malaval L, Modrowski D, Gupta AK, Aubin JE Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 1994; 158: 555-572.
 132. Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Brown M, Finkelman RD, Butler WT. A comparative immunocytochemical study on the subcellular distribution of 44kDa bone phosphoprotein and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein in osteoblasts. *J. Bone Mineral Res.* 1987; 2: 337.
 133. Marks SC Jr, Grolman ML. Tartrate-resistant acid phosphatase in mononuclear and multinuclear cells during the bone resorption of tooth eruption. *Histochem Cytochem.* 1987 Nov; 35(11): 1227-30.
 134. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim.* 2009; 2: 141-149.
 135. Merriman HL, van Wijnen AJ, Hiebert S, Bidwell JP, Fey E, Lian J, Stein J, Stein GS. The tissue specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/CBF/PEBP2/*Runt* domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter. *Biochemistry.* 1995; 34: 13125-13132.
 136. Mohr H, Kragstrup J. A histomorphometric analysis of the effects of fluoride on experimental ectopic bone formation in the rat. *J Dent Res.* 1991 Jun; 70(6): 957-60.
 137. Mohr H, Kragstrup JA Histomorphometric analysis of the effects of fluoride on

- experimental ectopic bone formation in the rat. *J Dent Res*. 1991 Jun; 70(6): 957-60.
138. Montessuit C, Caverzasio J, Bonjour JP. Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process. *J Biol Chem* 1991; 266: 17791-17797.
 139. Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner*. 1992 Dez; 19(3): 287-98.
 140. Mostafa YA., Meyer RA Jr, Latorraca RA. A simple and rapid method for osteoclast identification using a histochemical method for acid phosphatase. *Histochem J*. 1982 Mai; 14(3): 409-13.
 141. Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, Banse X, Devogelaer JP, Grynpas MD. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone* 2008 Dez; 43(6): 1067–1074.
 142. Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, Devogelaer JP, Grynpas MD. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone*. 2006 Dez; 39(6): 1283-9.
 143. Murray JJ. Appropriate use of fluorides for human health. *World Health Organization*, Geneva, 1996.
 144. Nakamura Y, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S. Acid phosphatase activity is detected preferentially in the osteoclastic lineage by pre-treatment with cyanuric chloride. *J Histochem Cytochem*. 1991 Out; 39(10): 1415-20.
 145. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002 Jan 11; 108(1): 17-29.
 146. Nefussi JR, Boy-Lefevre ML, Boulekbache H, Forest N. Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation*. 1985; 29: 160-168.
 147. Nefussi JR, Pouchelet M, Collin P, Sautier JM, Develay G, Forest N. Microcinematographic and autoradiographic kinetics studies of bone cell differentiation in vitro: matrix formation and mineralization. *Bone* 1989; 10: 345–352.

148. Neuprez A, Reginster JY. Bone-forming agents in the management of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 869-83.
149. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7. *Gene* 2006 May; 372(10): 62–70
150. Nissen MS, Magnuson JA (1986) Metal ion binding to tetrameric lima bean lectin. *J Biol Chem* 261: 2514-2519
151. Okte Z, Bayrak S, Fidanci UR, Sel T. Fluoride and aluminum release from restorative materials using ion chromatography. *J Appl Oral Sci.* 2012 Feb; 20(1): 27-31.
152. Ott SM, Feist E, Anderss DL, Liu CC, Sherrard DJ, Alfrey AC, Slatopolsky E, Howard GA. Development and reversibility of aluminum-induced bone lesion in the rat. *J Lab Clin Med* 1987; 109: 40–47.
153. Otto F, Thormell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GWH, Beddington RSP, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for the Cleidocranial Dysplasia syndrome, is essential for osteoblast formation and bone development. *Cell*, 1997; 89(5): 765-71.
154. Otto SM, Feist E, Anderss DL, Liu CC, Sherrard DJ, Alfrey AC, Slatopolsky E, Howard GA. Development and reversibility of aluminum-induced bone lesion in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 1987; 109: 40-47.
155. Pak CY, Zerwekh JE, Antich P. Anabolic effects of fluoride on bone. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6: 229-234
156. Pak CY. Fluoride and osteoporose. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1989; 191: 278–286.
157. Palacios C The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 621–628
158. Pankaj K, Michael E, Boulton TBL. Kirkwood Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999; 26: 495–500.
159. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultures of adherent cells from marrow can serve as long lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92: 4857-4861.

160. Perez-Amodio S, Jansen DC, Schoenmaker T, Vogels IM, Reinheckel T, et al. (2006) Calvarial osteoclasts express a higher level of tartrate-resistant acid phosphatase than long bone osteoclasts and activation does not depend on cathepsin K or L activity. *Calcif Tissue Int* 79(4): 245–54.
161. Perez-Amodio S, Vogels IMC, Schoenmaker T, Jansen DC, Alatalo SL, Halleen JM, Beertsen W, Everts V: Endogenous expression and endocytosis *Bone* 2005, 36(6):1065-1077
162. Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MA. Topical use of fluorides for caries control. Review. *Monogr Oral Sci.* 2011 Jun; 22: 115-32.
163. Pessan JP, Buzalaf MR. Historical and recent biological markers of exposure to fluoride. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22: 52-65.
164. Pittenger MF. et al. Multi lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-147.
165. Pockwinse S, Wilming L, Conlon D, Stein GS, Lian JB Expression of cell growth and bone specific genes at single cell resolution during development of bone tissue-like organization in primary osteoblast cultures. *J Cell Biochem* 1992; 49: 310-323.
166. Price CP, Kirwan A, Vader C. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. *Clin Chem.* 1995 Mai; 41(5): 641-3
167. Pritchard JJ. A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J. Anat.* 1952; 86: 259.
168. Proffit WR, Ackerman JL. Fluoride: Its Effects On 2 Parameters Of Bone Growth In Organ Culture. *Science.* 1964 Ago; 145(3635): 932–934.
169. Qu H, Wei M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. *Acta Biomater.* 2006 Jan; 2(1): 113-9.
170. Qu WJ, Zhong DB, Wu PF, Wang JF, Han B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(4): 328-34.
171. Quarles LD, Gitelman HJ, Drezner MK. Induction of bone formation in the beagle. A novel effect of aluminum. *J. Clin. Invest.* 1988; 81: 1056-1066.
172. Quarles LD, Murphy G, Vogler JB, Drezner MK. Aluminum-induced neoosteogenesis: a generalized process affecting trabecular networking in the axial skeleton. *J. Bone*

Miner Res. 1990; 5: 625-635.

173. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RI. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 683-692.
174. Reed AM, Haugen M, Pachman LM, Langman CB. Repair of osteopenia in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr.* 1993 May; 122(5 Pt 1): 693-6.
175. Riggs JL, et al. Immunofluorescent studies of RD-114 virus replication in cell culture. *J. Gen. Virol.* 1974; 25: 21-29.
176. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften.* 2002 Ago; 89(8): 338-51.
177. Roach HI. Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J.* 1999 Jan; 31(1): 53-61.
178. Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* 1991; 1: 85-98.
179. Rodriguez JP, Rosselot G. Sodium Fluoride Induces Changes on Proteoglycans Synthesized by Avian Osteoblasts in Culture. *J Cel Bioch* 2001; 83: 607-616.
180. Roper S, Hemberger M. Defining pathways that enforce cell lineage specification in early development and stem cells. *Cell Cycle.* 2009; 8:1515-1525.
181. Rosser J, Bonewald LF. Studying osteocyte function using the cell lines MLO-Y4 and MLO-A5. *Methods Mol Biol.* 2012; 816: 67-81.
182. Schweikl H, Schmalz G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci.* 1996 Jun; 104(3): 292-9.
183. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells.* 2002; 20: 530-541.
184. Sharma NC, Galustians HJ, Qaqish J, Galustians A, Rustogi K, Petrone ME, Chaknis P, García L, Volpe AR, Proskin HM. Clinical effectiveness of a dentifrice containing triclosan and a copolymer for controlling breath odor. *Am J Dent.* 2007 Abr; 20(2): 79-

82.

185. Shashi A, Bhardwaj M. Study on blood biochemical diagnostic indices for hepatic function biomarkers in endemic skeletal fluorosis. *Biol Trace Elem Res*. 2011 Nov; 143(2): 803-14.
186. Sheng MH, Lau KH, Beamer WG, Baylink DJ, Wergedal JE. In vivo and in vitro evidence that the high osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is intrinsic to bone cells. *Bone* 2004; 35: 711–9.
187. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hufner M. Development of the Osteoblast Phenotype in Primary Human Osteoblasts in Culture: Comparison With Rat Calvarial Cells in Osteoblast Differentiation. *J Cel Bioch* 1999; 75: 22–35.
188. Silbermann M, Frommer J. Heterogeneity among chondrocytes of the mandibular condyle in foetal and postnatal mice. *Arch Oral Biol*. 1973 Dez; 18(12): 1549-54.
189. Silver LM. Mouse genetics: concepts and applications. 1995; Oxford University Press, New York. 13:362.
190. Sletten GB, Dahl JE. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odontol Scand*. 1999 Dez; 57(6): 316-22.
191. Smith FA, Ekstrand J. The occurrence and the chemistry of fluoride. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, eds. Fluoride in dentistry, 2^a ed. Copenhagen: Munksgaard, 1996: 20-21.
192. Sognnaes, RF. Introduction to the problem of caries. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1965; 131: 687–689.
193. Speck NA, Tracy T. A new transcription factor family associated with human leukemias. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 1995; 5:337.
194. Spindler, K. P., Shapiro, D. B., Gross, S. B., Brighton, C. T. and Clark, C. C. The effect of ascorbic acid on the metabolism of rat calvarial bone cells in vitro. 1989; *J. Orthop. Res.*, 7: 696–701.
195. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblasts differentiation. *FASEB J*. 1990; 4: 3111-3123.

196. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation in differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.* 1993; 14:424-442.
197. Strunecka A, Patocka J, Russell LB, Niloufer JC. Fluoride interactions: From Molecules to disease. *Curr. Signal Transduct Ther.* 2007; 2: 190-213.
198. Subramanian SV, Kelm RJ, Polikandriotis JA, Orosz CG, Strauch AR. Reprogramming of vascular smooth muscle alpha-actin gene expression as an early indicator of dysfunctional remodeling following heart transplant. *Cardiovasc. Res.* 2002; 54: 539–548.
199. Susa M, Standke GJR, Jeschke M, Rohner D. Fluoroaluminate induces pertussis toxin-sensitive protein phosphorylation: Differences in MC₃T₃-E₁ osteoblastic and NIH3T3 fibroblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 235, 680–684.
200. Susa M, Standke GJR, Jeschke M, Rohner D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 235:680-684.
201. Susa M, Standke GJR, Jeschke M. Fluoroaluminate induces activation and association of Src and Pyk2 tyrosine kinases in osteoblastic MC3T3-E1 cell. *The J Biol Chem.* 1998; 273: 11354-11361.
202. Takada I, Kouzmenko AP, Kato S. Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis *Nature Rev Rheumat* 2009 Ago; 5: 442-447.
203. Takahashi T, Kurihara N, Takahashi K, Kumegawa M. An ultrastructural study of phagocytosis in bone by osteoblastic cells from fetal mouse calvaria in vitro. *Arch. Oral Biol.* 1986a; 31: 703.
204. Takahashi T, Kurihara N, Takahashi K, Kurihara, Kumegawa M. Phagocytosis of different matrix components by different cell types at bone-forming sites in cultured mouse calvaria. *Cell Tissue Res.* 1986b; 245: 9.
205. Tenenbaum HC. Levamisole and inorganic pyrophosphate inhibit p-glycerophosphate induced mineralization of bone formed in vitro. *Bone Miner.* 1987; 3:13-26.
206. Theilhaber J, Connolly T, Roman-Roman S, Bushnell S, Jackson A, Call K, Garcia T, Baron R. Finding genes in the C2C12 osteogenic pathway by k-nearest-neighbor classification of expression data. *Genome Res.* 2002 Jan; 12(1): 165-76.

207. Turksen K, Aubin JE Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol* 1991; 114: 373–384.
208. Turnpenny L, Hanley N. Culture of the human germ cell lineage. In: Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. *Culture of human stem cells*. NJ: Wiley, pp.107–132, 2007.
209. Varner JA, Horvath WJ, Huie CW, Naslund HR, Isaacson RL. Chronic aluminum fluoride administration. I. Behavioral observations. *Behav Neural Biol*. 1994 May; 61(3): 233-41.
210. Varner JA, Jensen KF, Horvath W, Isaacson RL. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res*. 1998 Feb; 784(1-2): 284-98.
211. Vaughan J. The influence of bone cells on the formation and mineralization of bone matrix. *Philos. Trans. R. Soc. Lond*. 1984; 304:453.
212. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk in very young women using combined oral contraceptives. *Contraception*. 2008 Nov;78(5):358-64.
213. Waddington R, Langley MS. Structural analysis of proteoglycans synthesized by mineralizing bone cells *in vitro* in the presence of fluoride. *Matrix Biology* 1998; 17: 255-268.
214. Wahengbam P, Tikku AP, Lee WB. Role of titanium tetrafluoride (TiF(4)) in conservative dentistry: A systematic review. *J Conserv Dent*. 2011 Apr; 14(2): 98-102.
215. Weigner JM, Holtrop ME. An ultrastructural study of bone cells: The occurrence of microtubules, microfilaments and tight junctions. *Calcif. Tissue Res*. 1974; 14:15.
216. Wergedal JE, Baylink DJ. Distribution of acid and alkaline phosphatase activity in undemineralized sections of the rat tibial diaphysis. *J Histochem Cytochem*. 1969 Dec;17(12):799-806.
217. Whitford GM. Intake And Metabolism Of Fluoride *Adv Dent Res* 8(1): 5-14, Jun, 1994.
218. Whitford GM. The Metabolism and Toxicity of Fluoride, 2nd ed (Ed: Myers H M). S Karger, Basel. 1996 25–29.

219. Whitson SW, Whitson MA, Bowers DE Jr, Falk MC. Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine bone cells grown in vitro. *J. Bone Miner Res.* 1992; 7:727-741.
220. Whyte MP. Alkaline phosphatase: Physiological role explored in hypophosphatasia. *Bone Miner Res.* 1989; 6:175-218.
221. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev.* 1994 Ago; 15(4): 439-61.
222. Wong MC, Glenny AM, Tsang BW, Lo EC, Worthington HV, Marinho VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jan 20;(1):CD007693.
223. Wuthier RE, Chin JE, Hale JE, Register TC, Hale LV, Ishikawa Y. Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:15972-15979.
224. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Strength and fluoride release characteristics of a calcium fluoride based dental nanocomposite. *Biomater.* 2008 Nov; 29(32): 4261-7.
225. Yadav MC, Lemire I, Leonard P, Boileau G, Blond L, Beliveau M, Cory E, Sah RL, Whyte MP, Crine P, Millán JL. Dose response of bone-targeted enzyme replacement for murine hypophosphatasia. *Bone.* 2011 Aug; 49(2): 250-6
226. Yan X, Feng C, Chen Q, Li W, Wang H, Lv L, Smith GW, Wang J. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts *Arch Toxicol.* 2009 Mai; 83(5): 451-8.
227. Yan D, Willett TL, Gu XM, Martinez-Mier EA, Sardone L, McShane L, Grynpas M, Everett ET. Phenotypic variation of fluoride responses between inbred strains of mice. *Cells Tissues Organs.* 2011; 194(2-4): 261-7.
228. Yan S, Joo Cho S, Joo Lee S, Kang S, Paek K, Yong Lee J. Molecular recognition of a fluoride anion receptor: the importance of C-H (N-H)F(-) and "electropositive field space"F(-) interactions. *Phys Chem Chem Phys.* 2008 Dez 21; 10(47): 7079-84.
229. Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW, Yam LT. Immuno histochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol.* 1995 Oct; 104(4): 397-402.

230. Yee A, et al. Biochemical characterization of the humancy clin-dependent protein kinase activating kinase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:471-477.
231. Zambuzzi W, Granjeiro JM, Kaushal P, Saravanan Y, Maikel P; Ferreira C. Modulation of Src Activity by Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase During Osteoblast Differentiation. *Cell Phys Bioch.* 2008; 22: 497-506.
232. Zimmermann B, Wachtel HC, Vormann J. Kinetics of P-glycerophosphate-induced endochondral mineralization in vitro. Calcium accumulation, alkaline phosphatase activity and effects of levamisole. *Calcif. Tissue Int.* 1992; 51:54-61.
233. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of stromal progenitor cells enriched by flow cytometry. *Blood.* 1997; 90:3471-3481.

ANEXOS

Apêndice A. Ensaio da Redução do MTT. Média e desvio-padrão dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Fluoreto	Períodos (horas)																			
	24 A					48 B					72 C					96 D				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO
AlF_3	0,847 (0,054) a,A	0,858 (0,039) a,A	0,755 (0,045) a,A	0,814 (0,042) a,A	0,782 (0,018) a,A	0,629 (0,138) a,A	0,597 (0,038) a,A	0,600 (0,038) a,A	0,611 (0,027) a,A	0,603 (0,027) a,A	0,413 (0,065) a,A	0,407 (0,092) a,A	0,463 (0,076) a,A	0,418 (0,073) a,A	0,356 (0,037) a,A	1,007 (0,043) A	1,020 (0,048) A	1,028 (0,073) A	0,999 (0,025) A	0,935 (0,065) A
NaF	1,242 (0,203) a,B	1,229 (0,142) ae,B	0,992 (0,116) b,B	0,865 (0,063) c,A	0,719 (0,049) d,A	0,616 (0,029) a,A	0,608 (0,011) a,A	0,608 (0,012) a,A	0,577 (0,017) a,A	0,621 (0,032) a,A	0,332 (0,028) a,A	0,354 (0,057) a,A	0,327 (0,016) a,A	0,350 (0,044) a,A	0,333 (0,010) a,A	1,184 (0,070) a,B	1,156 (0,068) abd,B	1,151 (0,092) abd,A	1,054 (0,078) b,A	0,897 (0,093) c,A

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de F e controle.

Apêndice B. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Média e desvio-padrão dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Fluoreto	Períodos (horas)																			
	24					48					72					96				
	A					α					β					α				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO
AlF_3	0,349 (0,030) a,A	0,356 (0,02) a,A	0,370 (0,078) a,A	0,346 (0,012) ab,A	0,355 (0,033) b,A	0,325 (0,030) a,A	0,308 (0,043) a,A	0,315 (0,054) a,A	0,322 (0,043) a,A	0,496 (0,049) b,A	0,413 (0,065) a,A	0,407 (0,092) a,A	0,463 (0,076) a,A	0,418 (0,073) a,A	0,356 (0,037) a,A	0,348 (0,026) a,A	0,371 (0,032) a,A	0,381 (0,037) a,A	0,349 (0,018) a,A	0,335 (0,022) a,A
NaF	0,403 (0,032) a,A	0,370 (0,016) a,A	0,351 (0,019) a,A	0,341 (0,018) a,A	0,258 (0,056) a,B	0,326 (0,037) a,A	0,329 (0,013) a,A	0,298 (0,024) a,A	0,296 (0,014) a,A	0,445 (0,130) b,A	0,332 (0,028) a,A	0,354 (0,057) a,A	0,327 (0,016) a,A	0,350 (0,044) a,A	0,333 (0,010) a,A	0,312 (0,012) a,A	0,346 (0,006) a,A	0,330 (0,028) a,A	0,357 (0,017) a,A	0,339 (0,027) a,A

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de F e controle.

Apêndice C. Ensaio da Redução do MTT. Média e desvio-padrão das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (horas)																			
	24				48				72				96				120			
	10 ⁻³ α	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ α	CO A	10 ⁻³ A	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ α	CO αλ	10 ⁻³ β	10 ⁻⁴ β	10 ⁻⁵ β	CO β	10 ⁻³ α	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ α	CO α	10 ⁻³ β	10 ⁻⁴ β	10 ⁻⁵ λ	CO βλ
C57	0,425 (0,052) a,A	0,430 (0,018) a,A	0,416 (0,027) a,A	0,397 (0,55) a,A	0,454 (0,206) a,A	0,518 (0,149) a,A	0,368 (0,114) a,A	0,434 (0,153) a,A	0,378 (0,065) a	0,503 (0,104) b	0,493 (0,081) b	0,358 (0,061) ca	0,451 (0,066) a,A	0,495 (0,043) a,A	0,471 (0,076) a,A	0,397 (0,027) a,A	0,362 (0,057) a,A	0,522 (0,062) b,A	0,611 (0,048) c,A	0,338 (0,035) a,A
C3H	0,155 (0,043) a,B	0,203 (0,030) a,B	0,191 (0,027) a,B	0,179 (0,021) a,B	0,199 (0,050) a,B	0,258 (0,097) a,B	0,293 (0,056) a,B	0,226 (0,075) a,B	0,562 (0,088) a,B	0,669 (0,091) b,B	0,756 (0,061) b,B	0,453 (0,071) ca,B	0,161 (0,040) a,B	0,214 (0,028) a,B	0,187 (0,019) a,B	0,170 (0,041) a,B	0,656 (0,062) a,B	0,810 (0,138) b,B	0,959 (0,084) b,B	0,530 (0,068) a,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes representam diferenças estatísticas entre os períodos dentro de uma dada concentração. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵M de F e controle.

Apêndice D. Ensaio da Incorporação do Vermelho Neutro. Média e desvio-padrão das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (horas)																			
	24				48				72				96				120			
	A				λ				β				B				α			
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	CO
C57	0 (0) a,A	0,010 (0,023) a,A	0 (0) a,A	0 (0) a,A	0,267 (0,068) c,A	0,399 (0,067) b,A	0,558 (0,169) a,A	0,556 (0,089) a,A	0,028 (0,013) a,A	0,038 (0,012) a,A	0,04 (0,015) a,A	0,022 (0,007) a,A	0 (0) a,A	0,044 (0,010) a,A	0,062 (0,022) a,A	0 (0) a,A	0(0) a,A	0,054 (0,081) a,A	0,647 (0,233) b,A	0,012 (0,028) a,A
C3H	0,433 (0,084) a,B	0,278 (0,117) b,B	0,717 (0,204) c,B	0,135 (0,023) d,B	0,157 (0,038) b,A	0,308 (0,083) c,A	0,714 (0,085) a,B	0,212 (0,070) bc,B	0,001 (0,002) a,A	0,018 (0,009) a,A	0 (0) a,A	0,001 (0,002) a,A	0,008 (0,003) a,A	0,043 (0,010) a,A	0,035 (0,015) a,A	0,026 (0,004) a,A	0,049 (0,076) a,A	0,441 (0,217) b,B	0,163 (0,185) a,B	0,357 (0,160) b,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras do alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴M, 10⁻⁵M de F e controle.

Apêndice E. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Fluoreto	Períodos (horas)																			
	24					48					72					96				
	A					α					β					β				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO
AlF_3	2,40 (0,054) a,A	1,94 (0,040) ab,A	0,99 (0,053) b,A	0,97 (0,072) b,A	0,255 (0,072) a,A	1,44 (0,003) b,A	1,59 (0,070) b,A	1,06 (0,048) b,A	1,00 (0,021) b,A	3,87 (0,011) a,A	1,15 (0,068) a,A	1,26 (0,019) a,A	0,65 (0,06) a,A	0,97 (0,053) a,A	3,90 (0,08) b,A	1,29 (0,019) a,A	1,44 (0,012) a,A	0,788 (0,004) a,A	0,82 (0,016) a,A	1,24 (0,014) a,A
NaF	1,95 (0,040) a,A	2,40 (0,054) a,A	2,55 (0,021) a,B	1,95 (0,045) a,B	1,95 (0,056) a,A	2,21 (0,014) a,B	1,86 (0,028) a,A	2,47 (0,019) a,B	1,80 (0,050) a,B	1,59 (0,128) a,B	1,67 (0,048) a,A	1,24 (0,025) a,A	1,24 (0,015) a,A	1,07 (0,002) a,A	0,94 (0,128) a,B	1,46 (0,048) a,A	1,72 (0,014) a,A	0,96 (0,019) a,A	1,32 (0,022) a,A	1,72 (0,043) a,A

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de F e Controle.

Apêndice F. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Fluoreto	Períodos (horas)																			
	24					48					72					96				
	AlF_3 - α NaF - $\alpha\beta$					β α					β $\alpha\beta$					β β				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO
AlF_3	0,17 (0,024) ab,B	0,72 (0,128) b,B	0,41 (0,037) b,B	0,30 (0,061) ab,B	0,28 (0,027) a,B	0,36 (0,072) ab,B	0,40 (0,021) b,B	0,48 (0,042) b,B	0,27 (0,020) ab,B	0,29 (0,017) a,B	0,27 (0,045) ab,B	0,23 (0,025) ab,B	0,29 (0,021) ab,B	0,48 (0,053) b,B	0,29 (0,017) a,B	0,21 (0,023) b,B	0,23 (0,006) b,B	0,38 (0,030) ab,B	0,29 (0,018) b,B	0,45 (0,040) a,B
NaF	0,20 (0,091) a,A	0,24 (0,052) a,A	0,10 (0,024) a,A	0,12 (0,028) a,A	0,03 (0,016) b,A	0,24 (0,032) a,A	0,19 (0,035) a,A	0,10 (0,005) a,A	0,15 (0,034) a,A	0,10 (0,005) b,A	0,07 (0,028) a,A	0,12 (0,053) a,A	0,19 (0,033) a,A	0,18 (0,047) a,A	0,04 (0,013) b,A	0,11 (0,022) a,A	0,09 (0,017) a,A	0,14 (0,037) a,A	0,06 (0,005) a,A	0,19 (0,057) b,A

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si, dentro de cada linhagem de camundongo. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de F e Controle.

Apêndice G. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L dos grupos tratados com diferentes concentrações de fluoretos AlF_3 e NaF na linhagem MC3T3.

Períodos (horas)																				
Fluoreto	24					48					72					96				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	5×10^{-6}	CO
	α	α	α	α	α	α	β	β	β	α	β	λ	λ	β	β	β	δ	$\alpha\delta$	β	β
NaF	0,47 (0,013) a,A	0,06 (0,014) a,A	0,53 (0,004) b,A	0,52 (0,014) a,A	0,48 (0,012) a,A	0,46 (0,012) b,A	0,47 (0,017) a,A	0,25 (0,002) a,A	0,22 (0,050) b,A	0,49 (0,027) a,A	0,11 (0,019) b,A	0,72 (0,011) b,A	0,72 (0,121) a,A	0,17 (0,078) a,A	0,24 (0,012) b,A	0,20 (0,019) a,A	0,30 (0,011) a,A	0,40 (0,071) a,A	0,23 (0,048) b,A	0,24 (0,017) a,A
AlF_3	0,61 (0,13) a,A	0,46 (0,02) a,A	0,61 (0,17) b,A	0,47 (0,03) a,A	0,80 (0,13) a,A	0,29 (0,03) b,A	0,44 (0,01) a,A	0,45 (0,01) a,A	0,29 (0,05) b,A	0,44 (0,06) a,A	0,28 (0,08) b,A	0,45 (0,12) b,A	0,69 (0,15) a,A	0,26 (0,05) a,A	0,27 (0,07) b,A	0,33 (0,03) a,A	0,32 (0,05) a,A	0,45 (0,06) a,A	0,32 (0,03) b,A	0,25 (0,03) a,A

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes dentro de uma mesma concentração indicam diferenças estatisticamente significantes para essa concentração ao longo dos períodos experimentais. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de F e Controle.

Apêndice H. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	A					β					A β					β				
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	MO	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	MO	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	MO	CO	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	MO	CO
C3H	5,52 (0,010) a,A	4,42 (0,003) a,A	5,26 (0,020) a,A	5,60 (0,012) a,A	5,70 (0,011) a,A	3,84 (0,009) a,A	3,86 (0,003) a,A	4,02 (0,009) a,A	4,02 (0,019) a,A	5,24 (0,001) a,A	4,96 (0,018) a,A	5,13 (0,020) a,A	3,65 (0,009) a,A	4,26 (0,008) a,A	4,60 (0,020) a,A	3,37 (0,021) a,A	4,40 (0,002) a,A	3,72 (0,006) a,A	6,04 (0,011) a,A	4,88 (0,008) a,A
C57	3,39 (0,065) a,B	2,99 (0,22) a,B	3,19 (0,015) a,B	3,10 (0,033) a,A	3,26 (0,015) a,B	3,37 (0,003) a,B	3,32 (0,025) a,B	3,46 (0,001) a,B	3,47 (0) a,B	3,40 (0,060) a,B	3,38 (0,047) a,B	3,53 (0,052) a,B	3,21 (0,010) a,B	3,21 (0,039) a,B	3,30 (0,054) a,B	3,244 (0,022) b,B	3,18 (0,047) bc,B	3,33 (0,006) b,B	3,17 (0,050) a,B	3,15 (0,073) c,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M de F, Meio Osteogênico e Controle.

Apêndice I. Ensaio da Fosfatase Alcalina. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	A					B					Λ					λ				
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO
C57	6,70 (0,014) bA	6,66 (0,022) bA	6,89 (0,024) bA	7,40 (0,030) bA	9,45 (0,022) Aa	6,10 (0,013) bcA	6,72 (0,008) bcA	6,78 (0,016) cA	5,95 (0,031) bA	9,24 (0,061) aA	6,19 (0,033) aA	5,93 (0,012) aA	5,73 (0,015) aA	5,97 (0,018) aA	9,24 (0,014) aA	4,37 (0,009) bA	4,40 (0,009) bA	4,30 (0,011) bA	6,06 (0,005) aA	5,99 (0,016) aA
C3H	5,52 (0,049) bB	5,27 (0,018) bB	5,16 (0,007) bB	5,90 (0,038) aB	10,81 (0,063) aB	4,84 (0,040) bcB	4,71 (0,018) bcB	6,13 (0,006) cA	4,49 (0,019) bB	7,85 (0,081) aB	4,49 (0,029) bB	6,98 (0,033) cB	5,28 (0,098) abA	5,70 (0,02) abcA	6,22 (0,037) aA	4,19 (0,043) aA	3,49 (0,037) aB	3,68 (0,019) aB	4,14 (0,064) abB	5,24 (0,031) bA

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵M de F, Meio Osteogênico e Controle.

Apêndice J. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidas dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	A					α					A					α				
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO
C57	11,82 (0,003) a,A	11,67 (0,026) a,A	12,37 (0,047) a,A	11,42 (0,006) a,A	10,53 (0,017) a,A	12,76 (0,027) a,A	11,20 (0,009) a,A	11,49 (0,009) a,A	13,74 (0,013) a,A	11,63 (0,010) a,A	11,01 (0,014) b,A	10,96 (0,013) b,A	13,86 (0,045) c,A	13,69 (0,056) ac,A	13,74 (0,033) a,A	11,15 (0,003) b,A	12,67 (0,028) ca,A	12,01 (0,006) abc,A	10,44 (0,007) b,A	13,55 (0,019) a,A
C3H	7,52 (0,004) a,B	7,29 (0,005) a,B	8,17 (0,006) a,B	7,90 (0,002) a,B	8,05 (0,005) a,B	7,62 (0,005) a,B	8,33 (0,006) a,B	8,17 (0,009) a,B	7,69 (0,001) a,B	7,93 (0,003) a,B	7,88 (0,004) a,B	8,02 (0,005) a,B	7,60 (0,007) a,B	7,85 (0,005) a,B	7,93 (0,008) a,B	7,79 (0,006) a,B	7,71 (0,007) a,B	7,81 (0,001) a,B	7,73 (0,009) a,B	6,95 (0,030) a,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes entre os períodos experimentais representam diferenças estatisticamente significante entre si. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵M de F, Meio Osteogênico e Controle.

Apêndice K. Ensaio da Fosfatase Ácida Total. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidas dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	10 ⁻³ α	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ α	MO α	CO α	10 ⁻³ α	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ α	MO α	CO αβ	10 ⁻³ α	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ B	MO β	CO A	10 ⁻³ A	10 ⁻⁴ α	10 ⁻⁵ β	MO β	CO β
C57	7,66 (0,010) a,A	7,50 (0,002) a,A	6,95 (0,005) a,A	7,47 (0,004) a,A	7,60 (0,009) a,A	7,99 (0,010) a,A	7,24 (0,004) a,A	7,19 (0,005) a,A	5,22 (0,032) a,A	7,07 (0,005) a,A	7,19 (0,008) a,A	6,79 (0,002) a,A	8,14 (0,016) a,A	8,07 (0,012) a,A	4,77 (0,031) a,A	6,93 (0,006) ab,A	7,62 (0,009) ab,A	8,64 (0,011) a,A	6,65 (0,006) b,A	7,45 (0,008) a,A
C3H	8,02 (0,041) a,A	7,88 (0,026) a,A	7,52 (0,042) a,A	8,16 (0,025) a,A	7,79 (0,026) a,A	8,17 (0,0011) a,B	7,78 (0,031) a,B	9,21 (0,041) a,B	8,04 (0,043) a,B	9,45 (0,033) a,B	8,75 (0,059) a,B	10,08 (0,011) a,B	8,81 (0,040) a,B	10,18 (0,005) a,B	7,19 (0,010) a,B	8,88 (0,028) ab,B	9,28 (0,068) ab,B	13,39 (0,082) a,B	6,39 (0,004) b,B	13,41 (0,082) a,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes nas diferentes concentrações indicam diferenças estatisticamente significante dentro de cada concentração ao longo dos períodos experimentais. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵M de F, Meio Osteogênico e Controle.

Apêndice L. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Lisados das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	10^{-3} α	10^{-4} α	10^{-5} $\alpha\beta$	MO A	CO $\alpha\beta$	10^{-3} A	10^{-4} B	10^{-5} α	MO A	CO α	10^{-3} α	10^{-4} β	10^{-5} B	MO α	CO $\alpha\beta$	10^{-3} A	10^{-4} $\alpha\beta$	10^{-5} β	MO α	CO α
C57	9,30 (0,006) a,A	8,52 (0,002) a,A	9,04 (0,013) a,A	9,13 (0,002) a,A	9,19 (0,007) a,A	9,13 (0,013) b,A	9,09 (0,009) ab,A	10,04 (0,005) a,A	9,63 (0,013) ab,A	9,42 (0,009) ab,A	9,63 (0,009) a,A	9,59 (0,004) a,A	8,97 (0,005) a,A	9,18 (0,011) a,A	9,47 (0,012) a,A	8,54 (0,013) a,A	8,94 (0,012) a,A	8,94 (0,004) a,A	8,62 (0,003) a,A	8,76 (0,011) a,A
C3H	8,16 (0,007) a,B	8,00 (0,006) a,B	8,78 (0,005) a,B	8,54 (0,001) a,B	8,64 (0,004) a,B	8,09 (0,010) b,B	8,92 (0,006) ab,B	8,76 (0,010) a,B	8,36 (0,002) ab,B	8,61 (0,004) ab,B	8,55 (0,004) a,B	8,69 (0,007) a,B	8,19 (0,005) a,B	8,45 (0,004) a,B	8,36 (0,008) a,B	8,52 (0,007) a,B	8,37 (0,006) a,B	8,36 (0,001) a,B	8,42 (0,008) a,B	7,62 (0,029) a,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes nas diferentes concentrações indicam diferenças estatisticamente significante dentro de cada concentração ao longo dos períodos experimentais. Abreviações 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M de F, Meio Osteogênico e Controle.

Apêndice M. Ensaio da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato. Média e desvio-padrão da atividade enzimática expressa em UI/L obtidos dos Sobrenadantes das duas linhagens de camundongos C3H e C57 tratadas com diferentes concentrações de NaF.

Linhagens	Períodos (dias)																			
	7					14					21					28				
	A					α					A					α				
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	MO	CO
C3H	16,59 (0,015) a,A	15,14 (0,007) a,A	29,57 (0,014) a,A	14,18 (0,006) a,A	24,80 (0,002) a,A	15,37 (0,010) a,A	35,81 (0,003) a,A	22,90 (0,017) a,A	15,80 (0,016) a,A	15,04 (0,008) a,A	28,26 (0,057) a,A	23,11 (0,024) a,A	19,63 (0,020) a,A	16,87 (0,012) a,A	15,35 (0,014) a,A	15,64 (0,011) a,A	18,41 (0,031) a,A	13,31 (0,007) a,A	18,89 (0,053) b,A	18,55 (0,004) a,A
C57	7,22 (0,046) b,B	7,76 (0,063) b,B	8,02 (0,049) a,B	6,99 (0,023) b,B	7,10 (0,012) a,B	7,78 (0,048) b,B	8,12 (0,054) c,B	8,62 (0,077) a,B	7,67 (0,041) b,B	8,16 (0,052) b,B	11,11 (0,093) a,B	8,59 (0,054) b,B	8,00 (0,041) bc,B	8,42 (0,047) c,B	7,22 (0,059) c,B	8,00 (0,045) ab,B	8,37 (0,095) b,B	8,49 (0,005) a,A	20,78 (0,071) b,A	8,12 (0,02) b,B

Resultados apresentados na primeira linha referem-se às médias e os valores entre parênteses referem-se aos respectivos desvios padrões. Letras minúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas dentro da linha para o mesmo período experimental e letras maiúsculas diferentes referem-se às diferenças encontradas nas colunas. Letras dos alfabeto grego diferentes nos diferentes tempos experimentais indicam diferenças estatisticamente significantes entre si. Abreviações 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, MO e CO referem-se aos grupos experimentais 10⁻³M, 10⁻⁴ M, 10⁻⁵M de F, Meio Osteogênico e Controle.