UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

**Marcadores da diferenciação osteoblástica em
culturas de células crescidas sobre titânio e
expostas a coquetel de fatores de crescimento e
proteínas**

MARIANA SALES DE MELO SOARES

PG.PERIO
FORP-USP

RIBEIRÃO PRETO

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

**Marcadores da diferenciação osteoblástica em
culturas de células crescidas sobre titânio e
expostas a coquetel de fatores de crescimento e
proteínas**

MARIANA SALES DE MELO SOARES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada esta fonte.

Catálogo da Publicação

Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Soares, Mariana Sales de Melo

Marcadores da diferenciação osteoblástica em culturas de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas. Ribeirão Preto, 2014.

64 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco

1. Cultura de células 2. Fatores de crescimento 3. Marcadores
4. Osteoblastos 5. Fosfatase Alcalina 6. Mineralização.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SOARES, M.S.M.

Marcadores da diferenciação osteoblástica em culturas de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos Meus Pais **Gilberto** e **Vera**, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

Agradecimentos

A Deus, por iluminar minhas escolhas e por me proporcionar saúde para que eu pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.

Aos meus Pais Gilberto e Vera, por todo amor conferido a mim e incentivo ao meu crescimento profissional, sempre me proporcionando o melhor.

Aos meus irmãos Nathália e Joca, que mesmo longe e precisando do meu apoio torceram para que eu concluísse com êxito mais uma etapa. E a todos da minha família, pelo carinho e apoio incondicional. Amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por toda contribuição com seu conhecimento científico. Uma pessoa de sabedoria admirável e incentivadora, muito obrigada.

Ao William Marcatti Amaru Maximiano, pela dedicação e participação integral neste trabalho. Obrigada pela disponibilidade em todas as horas que precisei.

A todos os membros do Laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, especialmente aos pesquisadores Maitê Bolean, Ana Maria Sper Simão e Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pela importante colaboração para a realização deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Adalberto Luiz Rosa e Márcio Mateus Beloti, por enriquecerem este trabalho com seus conhecimentos científicos.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Periodontia, na pessoa do Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Jr., pela oportunidade, confiança e incentivo. Sou muito grata por tudo.

Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Periodontia, Michel Reis Messoria, Daniela Bazan Palioto Bulle, Mário Taba Jr., Sérgio Luís Scombatti de Souza e Márcio Fernando de Moraes Grisi, por incentivarem e contribuírem para minha formação acadêmica. Obrigada por todo o conhecimento transmitido.

À Dra. Patrícia Adachi, por me guiar nos primeiros passos no Laboratório de Cultura de Células e por toda paciência e contribuição para o meu crescimento.

A Milla Sprone Tavares, Fabíola Singaretti de Oliveira e Roger Rodrigo Fernandes, pela cooperação indispensável durante a execução deste trabalho. Obrigada pela paciência e atenção.

Aos meus amigos Paula, Cris, Delmondes, Mandetta, Kelly, Túlio, Felipe, André, Umberto, Gustavo, Luciana, Lívia, Paty e Danilo, que compartilharam dessa caminhada ao meu lado, sempre com palavras de conforto para que eu continuasse seguindo em frente, e a todos os amigos de Ribeirão Preto, que me acolheram com carinho e por isso posso dizer que aqui também é minha casa.

Aos amigos de Maceió, que mesmo distante, sempre incentivaram o meu sucesso profissional.

A todos os colegas dos Laboratórios de Cultura de Células e Biologia Molecular, Larissa, Lucas, Rodrigo, Manu, Thiago e Gabriela, pela companhia e disponibilidade para me ajudar e tirar dúvidas.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, Dulce, Tati e Dani, pela atenção e disposição.

Aos funcionários Sueli, Dani, Zilda, Zé, Verinha e Roberta, que sempre estavam disponíveis para colaboração nas disciplinas clínicas.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, por proporcionar a estrutura necessária para minha formação profissional durante todos esses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo importante apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

SOARES, M.S.M. **Marcadores da diferenciação osteoblástica em culturas de células crescidas sobre titânio e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas**. 2014. 64p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2014.

Os efeitos de preparações de plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a atividade osteogênica *in vitro* e *in vivo* em contato com biomateriais são divergentes na literatura. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão e/ou atividade de marcadores iniciais da diferenciação osteoblástica em culturas de células osteogênicas crescidas sobre titânio (Ti) e expostas a coquetel de fatores de crescimento e proteínas PRP-símile (coquetel de FCs). Células osteoblásticas primárias derivadas de calvárias de ratos recém-nascidos foram cultivadas em meio osteogênico e expostas, nos 7 primeiros dias, a coquetel de FCs nas diluições 1:1 (FCs), 1:10 (FCs/10), 1:100 (FCs/100) e 1:1000 (FCs/1000). Foram avaliados, nos tempos de 7, 10 e 14 dias: 1) os aspectos morfológicos e a imunomarcação de sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN), por epifluorescência; 2) a proliferação celular, por ensaio de MTT; 3) a expressão de RNAm para o fator de transcrição Runx2, BSP e fosfatase alcalina (ALP), por PCR em tempo real; 4) a atividade de ALP, clivada da fração de membrana; 5) quantificação da mineralização, por extração do vermelho de Alizarina. Os resultados mostraram inibição da formação dos nódulos de matriz mineralizada em culturas FCs e atraso em seu desenvolvimento em FCs/10 e FCs/100, em comparação a FCs/1000 e controle. A expressão de Runx2, BSP e ALP era menor em todas as culturas expostas ao coquetel de FCs em 7 dias, sendo que para Runx2 e BSP notava-se o efeito concentração-dependente em 10 dias. Menores valores de atividade de ALP foram observados nas culturas FCs e FCs/10, com efeito concentração-dependente e correlação positiva com a mineralização em 7 dias, mas não em 10 e 14. Os resultados permitem concluir que a exposição ao coquetel de FCs inibe e/ou atrasa a diferenciação osteogênica de culturas primárias sobre Ti. Adicionalmente, a atividade de ALP de membrana pode ser considerada também um marcador inicial de diferenciação osteoblástica, indicativo do potencial osteogênico no modelo *in vitro* utilizado.

ABSTRACT

SOARES, M.S.M. **Osteoblast differentiation markers in cultured cells grown on titanium and exposed to a cocktail of growth factors and proteins**. 2014. 64p. Thesis (Master) – Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2014.

The effects of platelet-rich plasma (PRP) preparations on the *in vitro* and *in vivo* osteogenic activity in contact with biomaterials have been subject of debate and controversy in the literature. The aim of the present study was to evaluate the expression and/or activity of early markers of osteoblast differentiation in cultured osteogenic cells grown on titanium (Ti) and exposed to a PRP-like cocktail of growth factors and proteins (GFs cocktail). Primary osteoblastic cells derived from newborn rat calvarial bone were cultured in an osteogenic medium (control group) and exposed during the first 7 days of culture to the following dilutions of GFs cocktail: 1:1 (GFs), 1:10 (GFs/10), 1:100 (GFs/100) and 1:1000 (GFs/1000). At days 7, 10 and 14 of culture, the following parameters were assessed: 1) morphology and immunolabeling for bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) by epifluorescence microscopy; 2) cell proliferation by MTT assay; 3) mRNA expression for the osteoblast markers Runx2, BSP and alkaline phosphatase (ALP) by real time PCR; 4) ALP activity following ALP cleavage from cell membrane; 5) mineralization by Alizarin red extraction. The results showed no mineralized nodules for the GFs group and a delayed nodule formation for GFs/10 and GFs/100 compared with GFs/1000 and control. Whereas Runx2, BSP and ALP mRNA levels were lower for all cultures exposed to the GFs cocktail at day 7, a concentration-dependent effect was noticed only for Runx2 and BSP at day 10. The GFs cocktail showed a concentration-dependent effect on ALP activity, with the lowest values for GFs and GFs/10 cultures and a positive correlation with mineralization at day 7 but not at day 10 or 14. In conclusion, inhibited and/or delayed osteogenic differentiation take place in primary cultures grown on Ti and exposed to the GFs cocktail. In addition, membrane ALP activity can also be considered an early marker of osteoblast differentiation, indicative of the *in vitro* osteogenic potential in the model used.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Observação: No texto, as siglas aparecem em inglês como citadas na literatura, mas com significado, em sua maioria, em português.

µg/mL: micrograma/mililitro

µg: micrograma

µL: microlitro

ALP: fosfatase alcalina

BSP: sialoproteína óssea

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂: gás carbônico

Ct: *cycle threshold*/ciclo limiar

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*

DEPC: água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: deoxinucleotídeo

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

FCs: fatores de crescimento e proteínas

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h: hora

HCl: ácido clorídrico

M: molar

mg/mL: miligrama/mililitro

MgCl₂: cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

ng/ml: nanograma/mililitro

ng: nanograma

NH₄OH: hidróxido de amônio

nmol: nanomolar

°C: grau Celsius

PB: *phosphate buffered*/solução tampão fosfato

PBS: *phosphate buffered saline*/solução tampão salina de fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGF-BB: fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B

Pi: fosfato inorgânico

PIPLC: *phosphatidylinositol-specific phospholipase C*

PNF⁻: *ion -nitrophenolate*

pNPP: para-nitrofenil-fosfato

pNPPase: para-nitrofenil-fosfatase

PPi: pirofosfato inorgânico

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

Rpm: rotação por minuto

Runx2: fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2

s: segundo

TA: temperatura ambiente

TGF- β : fator de crescimento transformador β

Ti: titânio

TNAP: fosfatase alcalina não-específica de tecido

Tris-HCl: Tampão contendo como base o composto Tris (hidroxilamina) aminometano e como ácido, o ácido clorídrico

α -MEM: meio essencial mínimo, modificação α

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epifluorescência de culturas primárias de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos recém-nascidos.....	35
Figura 2. Proliferação celular pelo ensaio colorimétrico MTT de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias, crescidas sobre Ti.....	36
Figura 3. Expressão de Runx2 em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti	37
Figura 4. Expressão de BSP em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Normalização por GAPDH e atribuição de valor 1 para controle em 7 dias.....	38
Figura 5. Expressão de ALP em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Normalização por GAPDH e atribuição de valor 1 para controle em 7 dias.....	38
Figura 6. Atividade de ALP da fração de membrana (em U/mg) de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti.....	39
Figura 7. Aspectos macroscópicos e quantificação do acúmulo de cálcio por extração de vermelho de s no 14 ^o dia de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	40
Figura 8. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	41
Figura 9. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	41
Figura 10. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	42

Figura 11. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti	42
Figura 12. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de Runx2 em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	43
Figura 13. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de BSP em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti	44
Figura 14. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de ALP em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti	44
APÊNDICE – Figura 1. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	62
APÊNDICE – Figura 2. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	62
APÊNDICE – Figura 3. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	62
APÊNDICE – Figura 4. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	63
APÊNDICE – Figura 5. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	63
APÊNDICE – Figura 6. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	63

APÊNDICE – Figura 7. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	64
--	----

APÊNDICE – Figura 8. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti.....	64
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Cultura primária de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos	26
3.2 Composição do coquetel de FCs	26
3.3 Epifluorescência das culturas primárias	27
3.4 Avaliação da proliferação celular por MTT	28
3.5 Análise da expressão gênica de Runx2, ALP e BSP por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	28
3.6 Avaliação da atividade de ALP da fração de membrana	30
3.7 Detecção e quantificação dos nódulos de matriz mineralizada	31
3.8 Análise estatística	32
4 RESULTADOS	34
4.1 Epifluorescência das culturas primárias	34
4.2 Proliferação celular	36
4.3 Expressão dos marcadores relacionados à osteogênese, Runx2, BSP e ALP ...	36
4.4 Atividade de ALP da fração de membrana	39
4.5 Formação de matriz mineralizada	39
4.6 Correlação entre marcadores de osteoblastos e mineralização	40
4.7 Correlação entre a atividade de ALP de membrana e a expressão de RNAm dos marcadores de osteoblastos, Runx2, BSP e ALP	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	51
7 REFERÊNCIAS	53
8 APÊNDICE	62

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O reparo e a regeneração tecidual são processos biológicos complexos, controlados por uma variedade de citocinas pró- e anti-inflamatórias e fatores de crescimento (FCs) que atuam como moléculas reguladoras de funções celulares básicas (Anitua et al., 2006; Barrientos et al., 2008). A busca por solucionar problemas médicos e biológicos tem levado pesquisadores a testar essas moléculas em estratégias terapêuticas que visam à recuperação de tecidos e órgãos, o que resulta no desenvolvimento de materiais e preparações para potencial aplicação no tratamento de um amplo espectro de doenças (Slavkin, Bartold, 2006; Laurencin et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que a utilização de FCs pode estimular os processos de reparo e regeneração tecidual, induzindo ao recrutamento, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (Anitua et al., 2013). Os FCs são proteínas naturais que, quando ligadas a receptores específicos da membrana celular, iniciam vias de sinalização que podem resultar na ativação e/ou repressão de genes, com impacto no fenótipo e atividades celulares e, consequentemente, nas características estruturais e funcionais de tecidos e órgãos. Os efeitos da ação simultânea de diferentes FCs no reparo e regeneração tecidual podem variar na dependência de suas proporções relativas no meio extracelular e da expressão de receptores de membrana nas células envolvidas nesses processos (Lieberman et al., 2002; Javed et al., 2011).

O plasma rico em plaquetas (PRP), que consiste em preparações de plaquetas autógenas em um menor volume de plasma (Marx, 2004), vem sendo utilizado na área da medicina regenerativa com base na capacidade das plaquetas de secretar FCs e proteínas com efeitos biológicos de reconhecida importância nas fases iniciais dos processos de reparo e regeneração teciduais, especialmente relacionados ao tecido ósseo (Anitua et al., 2006). Com a ativação do concentrado de plaquetas por ação da trombina e/ou íons cálcio, forma-se um arcabouço tridimensional de fibrina nos sítios de reparo e liberam-se, progressivamente, FCs e proteínas para o meio extracelular (Anitua et al., 2004; Anitua et al., 2006; Foster et al., 2009).

Diferentes métodos de obtenção e disponibilização do PRP contribuem para as divergências de resultados de seus efeitos biológicos, levando ao

questionamento de seus potenciais benefícios em procedimentos terapêuticos e também à necessidade de padronização de protocolos para as diferentes aplicações e que tornem os resultados mais previsíveis (Aghaloo et al., 2002; Froum et al., 2002; Raghoobar et al., 2005; Borzini et al., 2006; Nikolidakis et al., 2008; Foster et al., 2009; Weibrich et al., 2012). Para aplicações ósseas, embora existam estudos que tenham demonstrado benefícios do uso do PRP (Marx et al., 1998; Anitua, 1999; Sammartino et al., 2005), há evidências que indicam que sua eficácia é limitada ou mesmo inexistente (Ranly et al., 2005; Ranly et al., 2007; Brogginini et al., 2011). Mesmo assim, estudos *in vivo* buscam avaliar os efeitos da associação de PRP a biomateriais para aplicação em defeitos ósseos e a superfícies de implantes de titânio (Ti), com resultados também controversos, indicando que a presença de PRP pode não estimular a neoformação óssea (Nikolidakis et al., 2008; Giovanini et al., 2010; Giovanini et al., 2011; Streckbein et al., 2013). Em modelos experimentais *in vitro*, avaliações dos efeitos de diferentes concentrações de PRP, ou de preparações com FCs que simulem PRP, na atividade osteogênica sobre diferentes substratos, incluindo Ti, permitiram se concluir que a formação de matriz mineralizada é um fenômeno concentração-dependente, com as maiores concentrações exibindo efeitos inibidores sobre esse processo (Lucarelli et al., 2003; Uggeri et al., 2007; de Oliva et al., 2009).

Em estudos prévios de nosso grupo (de Oliveira et al., 2008; de Oliva et al., 2009), a disponibilização de um coquetel de FCs e proteínas, de composição semelhante à de preparações de PRP de suínos (Venne et al., 1999) e humanos (Lacoste et al., 2003; Martineau et al., 2004), durante os 7 primeiros dias de culturas primárias de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos, resultou na inibição da formação de nódulos de mineralização (de Oliveira et al., 2008). A estratégia de diluições progressivas desse coquetel permitiu o resgate do potencial osteogênico das culturas para os níveis controles, com benefício(s) ao processo, se algum (ns), ainda não esclarecido(s) (de Oliva et al., 2009). A inibição da mineralização nesse modelo poderia ser atribuída à alteração na diferenciação osteoblástica *in vitro*, a julgar 1) pela redução nos níveis de atividade de fosfatase alcalina (ALP), o que manteria elevada a concentração extracelular de pirofosfato (PPi), um inibidor potente da mineralização, e 2) pelo aumento da atividade proliferativa (de Oliveira et al., 2008; de Oliva et al., 2009), efeitos decorrentes, possivelmente, da exposição das células ao fator de crescimento transformador β

(TGF- β), ativado pela trombospondina, e/ou ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), constituintes do coquetel que apresentam efeitos inibidores sobre a diferenciação osteoblástica (Hsieh, Graves, 1998; Lee et al., 2003; de Oliveira et al., 2008; de Oliva et al., 2009; Bailey Dubose et al., 2012).

O processo de mineralização da matriz colágena mediado por osteoblastos está relacionado à expressão diferencial de genes que ocorre durante sua sequência de diferenciação, partindo de células osteoprogenitoras, proliferativas, até sua diferenciação terminal em osteoblastos e osteócitos, cada qual com características morfofuncionais distintas (Lian, Stein, 1995). Em estudos de fatores que afetam a sequência de diferenciação osteoblástica, como FCs e hormônios, uma estratégia interessante é avaliar a expressão de moléculas consideradas marcadores iniciais de osteoblastos, o que inclui o fator de transcrição Runx2, a proteína matricelular sialoproteína óssea (BSP) e a ectoenzima fosfatase alcalina (ALP) (Huang et al., 2007). A aceleração, o retardamento ou a interrupção desse processo seria detectável por alterações temporais nos picos de expressão dessas proteínas.

O Runx2 é considerado um importante regulador na formação óssea, com função de mediar a ativação e/ou repressão temporal do crescimento celular e de outros genes que participam no processo de diferenciação celular (Lian et al., 2004; Komori, 2011). Durante o desenvolvimento ósseo, para a formação do osso imaturo, o Runx2 induz a diferenciação celular e aumenta o número de osteoblastos imaturos. No entanto, é necessário que sua expressão seja reduzida para que ocorra diferenciação de osteoblastos que formam o osso maduro. Além disso, o Runx2 desencadeia a expressão de genes importantes da matriz óssea durante os estágios iniciais da diferenciação osteoblástica, mas não é essencial para a manutenção desse processo em osteoblastos terminalmente diferenciados (Komori, 2010).

A BSP é uma proteína da matriz óssea não colágena, matricelular e multifuncional, cuja deposição temporoespacial na matriz extracelular e sua habilidade de nucleação dos cristais de hidroxiapatita nas fibrilas colágenas indica um papel crucial nos estágios iniciais da mineralização (Ogata, 2008; Tye et al., 2003; Tye et al., 2005; Paz et al., 2005).

A ALP é uma ectoenzima ligada à camada externa da membrana celular por meio de uma âncora de glicosil fosfatidilinositol (GPI) que proporciona às fosfatases a capacidade de interagir com substratos presentes no meio extracelular (Ciancaglini

et al., 1990). Uma de suas isoformas, a TNAP (da sigla em inglês para *tissue non-specific alkaline phosphatase*), relacionada a tecidos mineralizados, é expressa na membrana celular e na membrana de vesículas de matriz de odontoblastos, condrócitos hipertróficos e osteoblastos (Hotton et al., 1999; Miao, Scutt, 2002). Para o tecido ósseo, a expressão, localização e atividade da TNAP são essenciais para o início da mineralização da matriz colágena, além de serem consideradas importantes para o diagnóstico de doenças ósseas (Van Hoof, De Broe, 1994; Miao, Scutt, 2002). Ancorada na unidade de membrana, a TNAP tem capacidade de hidrolisar o PPi, cujo subproduto, o fosfato inorgânico (Pi), participa da formação de cristais de hidroxiapatita (Addison et al., 2007). Nesse contexto, essa enzima desempenha uma função fundamental na restrição da concentração extracelular de PPi, mantendo a proporção Pi/PPi que permite a mineralização fisiológica da matriz óssea (Hessle et al., 2002). Mutações no gene que codifica a ALP levam ao desenvolvimento de um fenótipo caracterizado pela não mineralização óssea (Whyte, 1994; Whyte, 2010).

Assim, dada a importância da ALP para o início do processo de mineralização, sua expressão, atividade e localização têm sido amplamente utilizadas como marcadores de atividade osteoblástica (Sabokbar et al., 1994; Dimai et al., 1998; de Assis et al., 2009; Kim et al., 2014). Entretanto, resultados de diferentes estudos *in vitro* mostram que não há, necessariamente, uma correlação positiva entre os níveis de atividade de ALP e a diferenciação osteogênica de tecidos conjuntivos (Hoemann et al., 2009). Enquanto que uma quantidade mínima específica de atividade de TNAP deve ser atingida para iniciar a nucleação de apatita na matriz colágena, moderada redução da expressão e da atividade enzimática poderiam ser suficientes para afetar negativamente a mineralização (Wennberg et al., 2000). Pelo menos em parte, esses dados aparentemente conflitantes poderiam ser explicados pelo fato de os mecanismos de ação da ALP na mineralização de matrizes colágenas não estarem completamente elucidados, apesar de décadas de estudos (Bonucci, 2007). Além disso, modificações nos métodos de extração e purificação da TNAP resultariam em especificidades distintas para a quantificação da atividade da enzima (Simão et al., 2010). De fato, picos de atividade de ALP podem ocorrer em 7 ou 14 dias de culturas de células osteoblásticas humanas controles, em mesmas condições experimentais, na dependência do método aplicado para sua quantificação, de maior ou menor

especificidade (de Oliveira et al., 2008; de Oliva et al., 2009). Já em culturas de células osteogênicas primárias derivadas de calvárias de ratos, níveis baixos de atividade de ALP em 7 dias não correspondem à observação por epifluorescência de subpopulações de osteoblastos terminalmente diferenciados *in vitro*, BSP-positivos e com marcação intensa para Fast red, que revela a atividade de ALP *in situ* (de Oliva et al., 2009).

Com o desenvolvimento do presente estudo, a nossa hipótese é que a aplicação de um método que proporcione quantificações específicas de atividade da TNAP, obtida da fração de membrana e clivada (Ciancaglini et al., 2006; Simão et al., 2010), resulte em valores mais refinados que, efetivamente, correspondam à sua reconhecida importância no início da diferenciação osteoblástica e da mineralização da matriz colágena e que, com isso, se correlacionem positivamente com o potencial osteogênico *in vitro*. Nesse contexto, o modelo experimental de avaliação dos efeitos de diluições progressivas do coquetel de FCs e proteínas sobre a progressão de culturas primárias proporcionaria grupos experimentais com diferentes perfis de atividade de ALP, permitindo correlacioná-los com os níveis de mineralização. Por fim, as avaliações realizadas em superfície clássica de Ti, usinada, ainda que *in vitro*, devem contribuir para a melhor compreensão dos efeitos de preparações de PRP ou PRP-símbles em modelos *in vivo* de reparo ósseo adjacente a implantes osseointegráveis de Ti.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma mistura de FCs e proteínas, de composição semelhante a preparações de PRP e em diferentes diluições, sobre o desenvolvimento de cultura primária de células osteogênicas sobre superfície de Ti.

2.2 Objetivos específicos

Analisar a expressão temporal dos marcadores de diferenciação osteoblástica Runx2, BSP e ALP e a atividade de ALP da fração de membrana em culturas primárias de células osteogênicas expostas ao coquetel de FCs e proteínas nas diluições 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000.

Correlacionar a expressão de RNAm para Runx2, BSP e ALP e a atividade de ALP da fração de membrana com a mineralização das culturas primárias.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura primária de células osteogênicas derivadas de calvária de ratos

As células foram isoladas por digestão enzimática, com solução de tripsina e colagenase, de fragmentos de calvárias de ratos Wistar recém-nascidos, com três dias de vida (Bellows, Aubin, 1989; Bellows et al., 1990; Nanci et al., 1996; Irie et al., 1998; de Oliveira, Nanci, 2004; de Oliveira et al., 2007). Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo 10.1.375.53.7). As células foram plaqueadas sobre discos de Ti usinados, de dimensões de 13 mm x 2 mm, em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço e cultivadas por até 14 dias. Durante os primeiros sete dias de cultura as células foram expostas a quatro diferentes diluições do coquetel de FCs e proteínas (descrito em 3.2), 1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000, cujos grupos experimentais correspondentes estão referidos no texto, a partir deste ponto, como coquetel de FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, respectivamente. Nesse período, uma troca de meio com as mesmas composições foi realizada no 3º dia. A partir do 7º dia de cultura a troca de meio foi realizada a cada 2 ou 3 dias com meio osteogênico constituído de Meio Essencial Mínimo, modificação α , com L-glutamina (α -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O grupo controle foi exposto apenas ao meio osteogênico por todo o período da cultura. As placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. A progressão das culturas foi avaliada por microscopia de fase em culturas crescidas sobre poliestireno.

3.2 Composição do coquetel de FCs

O coquetel FCs foi obtido dos principais componentes encontrados nas preparações de plaquetas em suínos (Venne et al., 1999) e humanos (Lacoste et al., 2003; Martineau et al., 2004). O coquetel de FCs foi diluído em meio osteogênico

(descrito em 3.1) nas seguintes concentrações: 27 ng/mL de PDGF-BB, 22 ng/mL de TGF- β 1, 15 ng/mL TGF- β 2, sendo todos recombinantes humanos, 3,7 μ g/mL de albumina derivada de soro humano, 2 μ g/mL de fibronectina derivada de plasma humano e 0,5 μ g/mL de trombospondina derivada de plaquetas, todos adquiridos junto à Sigma. O tempo total de exposição do coquetel de FCs às culturas foi definido considerando o tempo de vida das plaquetas e o período de influência direta dos FCs no processo de reparo tecidual, que é menor do que 7 dias (Marx et al., 1998; Marx, 2004).

3.3 Epifluorescência das culturas primárias

Nos dias 7, 10 e 14 de cultura, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) a 0,1 M, em pH 7,2, por 10 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida, foram processadas para imunofluorescência indireta e fluorescência direta (de Oliveira, Nanci, 2004; de Oliveira et al., 2007; Schwartz Fo et al., 2007). A permeabilização foi realizada com solução de Triton x-100 a 0,5% em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Para marcação das células osteoblásticas, utilizou-se anticorpo primário monoclonal, de camundongo, anti-BSP de rato, na diluição de 1:200 em PB (WVID1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank - DSHB, Iowa City, IA, EUA), seguido de anticorpo secundário anti-camundongo gerado em cabra, conjugado com Alexa Fluor 594, (fluorescência vermelha; Molecular Probes, Invitrogen), em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; Molecular Probes), para marcação do citoesqueleto de actina, ambos na diluição de 1:200 em PB. As incubações dos anticorpos foram realizadas em atmosfera úmida por 60 min à TA. Entre as incubações, as amostras foram lavadas 3 vezes em PB, por 5 min cada. Antes da montagem para observação microscópica, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min e as amostras, em seguida, lavadas rapidamente com água deionizada. Os discos de Ti foram montados em lâminas de vidro Fisherbrand e sobre os discos foram colocadas lamínulas de vidro de 12 mm (Fisher Scientific) com meio de montagem anti-fade Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As amostras foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, TH, Alemanha), acoplado a uma câmera digital AxioCam

MRm (Carl Zeiss), e as aquisições das imagens, realizadas com o software AxioVision 4.8.2 e processadas com Adobe Photoshop CS5.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

3.4 Avaliação da proliferação celular por MTT

A avaliação da proliferação celular foi realizada pelo método colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}, que é baseado na clivagem de sal de tetrazólio, reduzido por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Nos dias 7, 10 e 14 de cultura, preparou-se MTT a 5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e, em seguida, as células foram incubadas com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 h a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio foi aspirado do poço e 1 mL de isopropanol ácido (100 mL de isopropanol e 134 µL de HCl) foi adicionado em cada poço. As placas foram agitadas em um agitador de placas por 5 min e 200 µL da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica. A densidade ótica foi lida a 570-650 nm no leitor de placas (µQuant, Biotek, Winooski, VT, EUA) e os dados foram expressos como absorbância.

3.5 Análise da expressão gênica de Runx2, ALP e BSP por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A expressão dos genes Runx2, ALP e BSP foi avaliada por PCR em tempo real nos dias 7, 10 e 14 de cultura. O meio de cultura foi removido de todos os poços da placa contendo os discos de Ti e, em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) no primeiro poço e realizou-se a homogeneização para promover a lise das células. Essa mistura foi transferida para o poço seguinte até o último poço de cada grupo avaliado. As amostras foram mantidas à TA durante 15 min e armazenadas no freezer a -20 °C por, no mínimo, 24 h. Decorrido esse período, para cada 1 mL da suspensão em Trizol foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha). Os tubos foram agitados manualmente por 30 s e mantidos no gelo durante 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 4 °C e 10.500 rpm (accuSpinTM Micro R, Fisher

Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) e a fase aquosa (superior) foi coletada em novos tubos de 1,5 mL. Foram adicionados, às amostras, 250 µL de etanol a 96% (Merck) e, em seguida, centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA). A solução amostra/etanol foi agitada cuidadosamente e transferida para uma nova coluna de sílica gel. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por centrifugações breves de 15 s a 10.500 rpm cada. Após várias lavagens com os diferentes tampões, as amostras de ácido ribonucleico (RNA) foram eluídas da coluna com 25 µL de água deionizada e tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) (Acros Organics, New Jersey, NJ, EUA), livre de RNase, e armazenadas a -80 °C, até a confecção do DNA complementar (cDNA).

No preparo da água, adicionou-se 1 mL de DEPC (Acros Organics) em 999 mL de água deionizada. A mistura foi mantida em TA por 24 h e, em seguida, autoclavada por 30 min a 121 °C (Tuttnauer Brinkmann 3870M, Hauppauge, NY, EUA). Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 2 µL foi diluída em 198 µL de água DEPC (Acros Organics) e analisada, por espectrofotometria, utilizando Genequant 1300 (GE Healthcare, Fairfield, CT, EUA). Para a detecção da concentração de RNA/µL e de possível contaminação por proteínas e fenol nas amostras, foi realizada a leitura nos comprimentos de onda de 260 nm (RNA), 280 nm (proteína) e 230 nm (fenol).

Para confecção do cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA total por reação de transcrição reversa utilizando-se o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em um tubo de 200 µL foram adicionados 1 µg de RNA total diluído em um volume final de 10 µL de água previamente tratada com DEPC, 2 µL de *reverse transcriptase buffer*, 0,8 µL de deoxinucleotídeo (dNTP), 2 µL de *random primer*, 1 µL de *MultiScribeTM reverse transcriptase*, 1 µL de *RNase inhibitor* e 3,2 µL de água DEPC (Acros Organics), para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburgo, HA, Alemanha) a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min e, posteriormente, resfriadas a 4 °C. Ao final da reação de transcrição reversa as amostras de cDNA foram estocadas em freezer a -20 °C.

Para a realização do PCR utilizou-se o sistema SYBR Green (Applied Biosystems) com o aparelho CFX 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Um mix foi

preparado, utilizando 7 μ L do reagente SYBR Green Master Mix que contém o fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs e o fluoróforo ROX, utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos componentes de tampão e 0,5 μ L da solução contendo cada primer (*forward* e *reverse*) com as concentrações adequadas, totalizando 8 μ L. Foi preparado 2,5 μ L da solução de cDNA com 2,5 μ L de água deionizada autoclavada, totalizando 5 μ L. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 8 μ L do mix e 5 μ L da solução de cDNA, em triplicata, para cada primer selecionado. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. A reação de amplificação foi de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C, além de um ciclo final de 20 min, com temperatura crescente de 60 °C a 95 °C, aplicada para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.

A análise dos resultados foi determinada com base no valor do ciclo limiar (Ct, do inglês *cycle threshold*). Como normalizador foi utilizada a expressão do gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Foi avaliada a expressão gênica dos seguintes marcadores osteoblásticos: Runx2, BSP e ALP. Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e apresentaram eficiência entre 95-105%. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica, a qual foi normalizada pelo gene constitutivo e relativos às culturas realizadas sobre os discos do grupo controle no tempo de 7 dias.

3.6 Avaliação da atividade de ALP da fração de membrana

Aos 7, 10 e 14 dias de cultura, a TNAP clivada, obtida a partir de fração de membrana celular, foi quantificada por sua atividade para-nitrofenil-fosfatase (pNPPase), capaz de hidrolisar para-nitrofenil-fosfato (pNPP). As células foram lavadas três vezes com 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 2 mM de $MgCl_2$, removidas com espátula e ressuspensas em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 10 mM de $MgSO_4$ e 0,8 M de NaCl (tampão osmótico). As células em

suspensão foram, então, homogeneizadas empregando-se um homogeneizador do tipo “potter”, para desmembramento suave, e centrifugadas a 100.000 g por 1 h a 4 °C. O pellet correspondente à TNAP ligada à membrana foi ressuspenso em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, contendo 2 mM de $MgCl_2$ e incubado com 0,2 U de fosfolipase C fosfatidilinositol-específica (PIPLC, na sigla em inglês) por 1 h, sob agitação rotativa constante a 37 °C. Após a incubação, as amostras foram ultracentrifugadas nas mesmas condições descritas acima e os sobrenadantes obtidos, considerados fonte de TNAP enzimaticamente liberada. A atividade pNPPase foi avaliada, descontinuamente, a 37 °C, seguida pela liberação do íon-nitrofenolato (PNF) ($\epsilon = 1M$, pH 13 = $17.600 M^{-1}cm^{-1}$) a 410 nm. As condições padrão foram 50 mM de buffer AMPOL, em pH 10, contendo 2 mM de $MgCl_2$ e 1 mM de PNPP no volume final de 1,0 mL.

As reações foram iniciadas pela adição da enzima e interrompidas com NaOH a 1M em intervalos de tempo apropriados, como descrito previamente (Camolezi et al., 2002). Todas as determinações foram realizadas em triplicata e as velocidades iniciais, constantes por pelo menos 90 min, desde que menos de 5% do substrato tenha sido hidrolisado. Os controles sem a adição da enzima foram incluídos em cada experimento para permitir a determinação da hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de enzima (1 U) é definida como a quantidade de 1,0 nmol de hidrólise enzimática do substrato a 37 °C/min/mL ou mg de proteína. As concentrações de proteína foram estimadas na presença de SDS a 2% (w/v) (Hartree, 1972), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.7 Detecção e quantificação dos nódulos de matriz mineralizada

Para análise da formação de matriz mineralizada, no 14^o dia, as culturas foram lavadas em solução salina balanceada de Hanks, fixadas em etanol a 70% a 4 °C por 1 h e, em seguida, lavadas em PBS e água deionizada. As culturas foram, então, coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2, à TA por 15 min, lavadas em PBS e água deionizada e deixadas a secar à TA. As imagens macroscópicas foram obtidas digitalmente com câmera Canon EOS Digital Rebel, sensor de 6.3 Megapixel CMOS, com lentes macro Canon EF 100 mm f/2.8 (Canon, Lake Success, NY, EUA).

A análise quantitativa do acúmulo de cálcio nas amostras foi determinada pelo método descrito por Gregory et al. (2004). Com a adição, em cada poço, de 280 μL de ácido acético a 10%, as placas de cultura foram submetidas à agitação suave por 30 min. A camada de células foi raspada e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL para, em seguida, serem agitados em vortex por 30 s. As amostras foram, então, aquecidas a 85 °C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 13.000 rpm durante 20 min. De cada amostra foram transferidos 100 μL de sobrenadante para cada poço da placa de 96 poços e adicionados 40 μL de hidróxido de amônio a 10%. Por fim, as placas foram lidas em espectrofotômetro (μQuant), utilizando comprimento de onda de 405 nm.

3.8 Análise estatística

Os dados numéricos relativos às análises de proliferação celular por MTT, expressão de RNAm de Runx2, BSP e ALP e atividade de ALP foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a dois fatores de variação, seguida do pós-teste de Bonferroni, quando apropriado. Para o ensaio de mineralização, procedeu-se à ANOVA a um fator de variação e pós-teste de Tukey. Para as análises correlativas, empregou-se o teste de Pearson. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Epifluorescência das culturas primárias

Os aspectos morfológicos das culturas primárias nos diferentes grupos nos tempos de 7, 10 e 14 dias são apresentados na Figura 1. Apesar de se constatar que em todos os grupos as culturas progrediram em função do tempo, variações fenotípicas relevantes foram observadas sobretudo entre as culturas controles e aquelas expostas às menores diluições do coquetel de FCs (grupos FCs e FCs/10).

Em 7 e 10 dias das culturas do grupo controle (Figura 1, A e F), observaram-se áreas de multicamadas celulares cujas células exibiam marcação citoplasmática para BSP em região perinuclear. Aos 14 dias, notaram-se formações nodulares de matriz mineralizada, imunomarcadas com OPN, com núcleos de fluorescência mais intensa e importante redução na marcação para BSP e faloidina (Figura 1, K e P).

Para as culturas expostas ao coquetel de FCs, em 7 e 10 dias as áreas de multicamadas celulares BSP-positivas eram progressivamente mais frequentes com as maiores diluições do coquetel (Figura 1, B-E e G-J); em 10 dias, as culturas FCs se diferiam das demais, com aparente maior população celular, homogênea em sua distribuição sobre o substrato de Ti (Figura 1G). Aos 14 dias, notou-se inibição completa dos nódulos de matriz mineralizada para o grupo FCs (Figura 1, L e Q). Os raros nódulos observados em culturas FCs/10 mostravam-se em estágio anterior de desenvolvimento se comparados aos de culturas controles, FCs/100 e FCs/1000, uma vez que exibiam intensa marcação para BSP e OPN e células faloidina-positivas em sua superfície (Figura 1, M e R). Por outro lado, os nódulos em estágios mais avançados, presentes nas culturas controles, FCs/100 e FCs/1000, mostravam-se OPN-positivos, sobretudo em sua periferia, e majoritariamente negativos para BSP e faloidina (Figura 1, K, N, O, P, S e T). A comparação dos nódulos indicados por setas (Figura 1, K e M) permite a distinção entre os estágios de desenvolvimento descritos (atrasado em M).

Figura 1. Epifluorescência de culturas primárias de células osteogênicas derivadas de calvárias de ratos recém-nascidos, dos grupos controle (A, F, K e P), FCs (B, G, L e Q), FCs/10 (C, H, M e R), FCs/100 (D, I, N e S) e FCs/1000 (E, J, O e T), marcadas para anticorpos anti-BSP e anti-OPN (A-O e P-T, respectivamente; fluorescência vermelha), com faloidina, para o citoesqueleto de actina (K-T, fluorescência verde), e DAPI, para os núcleos celulares (A-T, fluorescência azul), aos 7 (A-E), 10 (F-J) e 14 (K-T) dias, sobre Ti. Note-se inibição completa das formações nodulares de matriz mineralizada para FCs (L e Q), enquanto que os poucos nódulos observados em FCs/10 (M e R) mostravam-se em estágio anterior de desenvolvimento se comparados aos do grupo controle, FCs/100 e FCs/1000, a julgar pela marcação intensa de BSP (M) e OPN (R) e a presença de células faloidina-positivas em sua superfície. Os nódulos em estágios mais avançados, em culturas controle, FCs/100 e FCs/1000 (K, N, O, P, S e T), exibiam marcação intensa apenas para OPN, predominantemente periférica, sem detecção de actina em quase toda sua superfície (comparem-se, por exemplo, os nódulos indicados pelas setas em K e M). A barra de escala representa 200 μ m para A-E e P-T e 400 μ m para F-O.

4.2 Proliferação celular

Não se detectaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no ensaio de MTT ($p > 0,05$), apesar de os maiores valores médios terem sido detectados para as culturas FCs e FCs/10 (Figura 2). Considerando o fator tempo, observaram-se diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para as comparações entre 7 e 10 dias e 7 e 14 dias. Enquanto que no controle houve redução na proliferação celular de 7 para 10 dias, os grupos FCs e FCs/10 apresentaram valores maiores em 10 dias. No 14º dia notou-se redução da proliferação celular em todos os grupos, exceto para as culturas do grupo FCs.

Figura 2. Proliferação celular pelo ensaio colorimétrico MTT de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias, crescidas sobre Ti. Notem-se os maiores valores para os grupos FCs e FCs/10 e uma tendência aos menores valores para as culturas em 14 dias, com exceção para FCs.

4.3 Expressão dos marcadores relacionados à osteogênese, Runx2, BSP e ALP

Os resultados de expressão de Runx2, BSP e ALP, apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, revelaram redução dos níveis desses marcadores nas culturas que receberam o coquetel de FCs em suas quatro diluições em comparação ao controle

em 7 dias. Na comparação entre tempos, diferenças estatisticamente significantes foram observadas na expressão de Runx2 entre os dias 7 e 10 para todos os grupos ($p < 0,001$). Para a expressão de ALP, entre tempos, houve diferenças entre 7 e 10 dias para todos os grupos ($p < 0,001$), exceto o controle ($p > 0,05$). Com a progressão da cultura, no 10º dia, houve tendência ao aumento da expressão de Runx2, BSP e ALP, exceto para a expressão de Runx2 em FCs, que exibiu os menores valores. No 14º dia houve redução na expressão dos três marcadores, exceto para o grupo FCs/10, em que a expressão de Runx2 aumentou. Na análise entre grupos, o perfil de expressão de Runx2 e BSP, no 10º dia, foi concentração dependente, sendo crescente de FCs para FCs/1000. Para ALP, não houve significância estatística, apesar da tendência a valores progressivamente maiores de FCs/10 para FCs/1000.

Figura 3. Expressão de Runx2 em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Normalização por GAPDH e atribuição de valor 1 para controle em 7 dias. Notem-se picos de expressão de Runx2 em 10 dias para controle, FCs/100 e FCs/1000.

Figura 4. Expressão de BSP em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Normalização por GAPDH e atribuição de valor 1 para controle em 7 dias. Note-se expressão progressivamente maior de BSP em 10 dias com as diluições maiores do coquetel de FCs.

Figura 5. Expressão de ALP em culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Normalização por GAPDH e atribuição de valor 1 para controle em 7 dias. Note-se tendência à expressão progressivamente maior de ALP em 10 dias com as diluições maiores do coquetel de FCs.

4.4 Atividade de ALP da fração de membrana

Em todos os tempos avaliados, os menores valores de atividade de ALP da fração de membrana foram observados nas culturas expostas às maiores concentrações do coquetel de FCs (grupos FCs e FCs/10, Figura 6). A maior atividade de ALP foi observada para os grupos controle e FCs/1000 em 7 dias, com reduções significativas em 14 dias ($p < 0,001$). O perfil de atividade de ALP para FCs/100 diferiu dos demais, exibindo os maiores valores em 10 dias.

Figura 6. Atividade de ALP da fração de membrana (em U/mg) de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000, aos 7, 10 e 14 dias sobre Ti. Notem-se 1) menores valores de atividade de ALP para culturas expostas às menores diluições do coquetel de FCs e 2) perfis semelhantes entre controle e FCs/1000.

4.5 Formação de matriz mineralizada

Macroscopicamente, os grupos controle e FCs/1000 foram os que exibiram, aos 14 dias, formações nodulares vermelho de Alizarina-positivas distribuídas aleatoriamente por toda a superfície dos discos de Ti. Essas formações eram apenas discretas para FCs/10 e FCs/100 e ausentes nas culturas FCs. Uma coloração arroxeada difusa podia ser notada nos grupos FCs, FCs/10 e FCs/100 (Figura 7).

Para todas as culturas expostas às diferentes diluições do coquetel de FCs, observaram-se valores de extração de vermelho de Alizarina significativamente

menores se comparados aos do grupo controle ($p < 0,05$). As culturas FCs/1000 exibiram maior mineralização se comparadas às FCs e FCs/10 ($p < 0,05$). As comparações FCs/100 x FCs/1000 e FCs x FCs/10 não revelaram significância estatística para as diferenças entre os valores obtidos ($p > 0,05$).

Figura 7. Aspectos macroscópicos e quantificação do acúmulo de cálcio por extração de vermelho de Alizarina no 14º dia de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Notem-se formações coradas com vermelho de Alizarina para culturas controle e FCs/1000 e os menores valores para os grupos FCs e FCs/10.

4.6 Correlação entre marcadores de osteoblastos e mineralização

Os resultados do teste de Pearson indicaram haver correlação positiva entre a expressão de RNAm para os marcadores iniciais de osteoblastos em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias (Runx2, $r = 0,9875$, $p = 0,0017$; BSP, $r = 0,9695$, $p = 0,0064$; ALP, $r = 0,9706$, $p = 0,0060$; Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). Os resultados mostraram ausência de correlação ou correlação negativa entre as variáveis avaliadas em 10 dias (apêndice, Figuras 1-3) e em 14 dias (apêndice, Figuras 4-6). A aplicação do teste de Pearson para a atividade de ALP de membrana e a mineralização das culturas indicou haver correlação positiva em 7 dias ($r = 0,9649$, $p = 0,0078$; Figura 11), mas não em 10 e 14 dias (apêndice, Figuras 7 e 8).

Figura 8. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9875$, $p = 0,0017$).

Figura 9. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9695$, $p = 0,0064$).

Figura 10. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9706$, $p = 0,0060$).

Figura 11. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9649$, $p = 0,0078$).

4.7 Correlação entre a atividade de ALP de membrana e a expressão de RNAm dos marcadores de osteoblastos, Runx2, BSP e ALP

Análises correlativas entre a expressão de RNAm para Runx2, BSP e ALP em 7 dias e a atividade de ALP de membrana em 7 dias indicaram haver correlação positiva entre as variáveis. Os valores $r = 0,9651$, $p = 0,0078$; $r = 0,9628$, $p = 0,0086$ e $r = 0,9523$, $p = 0,0124$ foram encontrados para as correlações com Runx2, BSP e ALP, respectivamente (Figuras 12 a 14).

Figura 12. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de Runx2 em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9651$, $p = 0,0078$).

Figura 13. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de BSP em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9628$, $p = 0,0086$).

Figura 14. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP de membrana em 7 dias e a expressão de ALP em 7 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Note-se correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,9523$, $p = 0,0124$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a exposição a coquetel de FCs PRP-símile inibe e/ou atrasa a diferenciação osteogênica de culturas primárias de células osteoblásticas sobre Ti em uma relação concentração-dependente para alguns dos parâmetros e tempos avaliados. A maior inibição da mineralização para os grupos FCs e FCs/10 estava associada à maior atividade celular proliferativa em 10 dias, com o restabelecimento gradual desses parâmetros para os níveis controles na medida em que se diluía progressivamente o coquetel. A expressão de RNAm dos marcadores iniciais de diferenciação osteoblástica, menor para os grupos FCs em 7 dias e concentração-dependente para Runx2 e BSP em 10 dias, correlacionava-se positivamente com a mineralização das culturas em 7 dias, mas não em 10 e 14. A atividade de ALP de membrana mostrou-se também como marcador inicial para o potencial osteogênico *in vitro* no modelo de cultura primária utilizado, sendo aos 7 dias, mas não aos 10 e 14, concentração-dependente e de correlação positiva com a mineralização e com Runx2, BSP e ALP.

Os efeitos do coquetel de FCs sobre a proliferação celular e a diferenciação osteogênica são consistentes com os de estudos anteriores, utilizando coquetel de composição semelhante (de Oliva et al., 2009) ou preparações de PRP (Lucarelli et al., 2003; Arpornmaeklong et al., 2004; Ferreira et al., 2005), que indicam que o aumento da proliferação de células osteoprogenitoras e a redução da maturação osteoblástica são fenômenos concentração-dependente. O efeito mitogênico excessivo provocado pelo uso de PRP foi atribuído ao descontrole da proliferação celular, com impacto negativo no processo de maturação fenotípica (Uggeri et al., 2007). A relação inversa entre proliferação e diferenciação de células osteoblásticas está bem estabelecida na literatura; para o completo desenvolvimento do fenótipo osteogênico, interrompe-se o ciclo celular definitivamente e os osteoblastos, em sua diferenciação terminal, passam a expressar proteínas para a secreção e controle da mineralização do osteóide (Lian, Stein, 1995; Stein et al., 1996; Van den Dolder et al., 2003).

A análise dos resultados obtidos em nosso estudo aponta para um processo de inibição e/ou atraso da aquisição do fenótipo osteogênico. Em favor da interpretação de inibição estão as diferenças entre os grupos na quantificação bioquímica da mineralização e a observação, por epifluorescência, de formações

nodulares de matriz mineralizada, ausentes no grupo FCs. Por outro lado, em 14 dias, nódulos em estágios iniciais de desenvolvimento, BSP-positivos e ainda recobertos por células, estavam presentes em FCs/10, raros em FCs/100 e ausentes em FCs/1000 e controle, o que permite considerar para as culturas FCs/10 e FCs/100, adicionalmente, a ocorrência de atraso em seu desenvolvimento. Observações em tempos posteriores a 14 dias para FCs, FCs/10 e FCs/100 esclareceriam se os efeitos inibidores e/ou de atraso da mineralização seriam ou não mantidos. Ainda que essas avaliações sejam em modelo de cultura de células sobre substrato bidimensional de Ti, o que poderia ser considerado uma limitação à realidade tridimensional *in vivo* (Greiner et al., 2012; Naito et al., 2013), a comprovação de que os efeitos do coquetel de FCs em concentrações maiores são efetivamente inibidores da formação de matriz mineralizada levaria ao questionamento da utilização de preparações de PRP associadas a biomateriais com o objetivo de estimular o reparo ósseo.

Em comparação ao estudo de de Oliva et al. (2009), os nossos resultados permitem uma melhor compreensão dos efeitos do coquetel de FCs em suas 4 diluições sobre a diferenciação osteogênica *in vitro*, não apenas pela caracterização qualitativa dos estágios de desenvolvimento dos nódulos de mineralização, mas também pela análise quantitativa temporal de marcadores iniciais da diferenciação osteoblástica e sua potencial correlação com a mineralização. Com efeito, para o tecido ósseo, a expressão temporal de proteínas específicas da matriz extracelular é considerada um indicador da diferenciação osteoblástica (Yao et al., 1994). Com o término da atividade celular proliferativa, detectam-se proteínas relacionadas ao fenótipo osteogênico, como por exemplo, a ALP, cuja expressão/atividade pode aumentar em 10 ou mais vezes (Lian, Stein, 1995). Assim, qualquer alteração na dinâmica de diferenciação osteogênica nas culturas primárias por sua exposição às diferentes diluições do coquetel de FCs poderia ser identificada por perfis distintos dos marcadores iniciais de osteoblastos em função do tempo, como de fato foi observado para os 3 marcadores utilizados. Os menores valores de RNAm para Runx2, BSP e ALP em 7 dias foram detectados em FCs e FCs/10, correspondendo aos resultados morfológicos e de quantificação da proliferação celular e mineralização, indicando redução expressiva da diferenciação osteoblástica e do desenvolvimento do fenótipo osteogênico nessas culturas. Esses fenótipos poderiam estar associados à ocorrência de proporções variadas de células com diferenciação

miofibroblástica, resultado da exposição de subpopulação de fibroblastos ao coquetel de FCs (De Oliveira et al., 2003; Ramos-Torrecillas et al., 2014). Por outro lado, a maior atividade osteogênica em culturas expostas ao coquetel foi observada em FCs/1000, cujos perfis de expressão dos marcadores gênicos assemelhavam-se aos do grupo controle. Apesar de ter havido correlação positiva entre mineralização e RNAm para Runx2, BSP e ALP apenas em 7 dias, o que está de acordo com a importância da expressão desses genes no início da diferenciação de osteoblastos (Stein, Lian, 1993), foi interessante notar picos de expressão de BSP e ALP em 10 dias para todos os grupos e efeito concentração-dependente para Runx2 e BSP, indicando que o período de 7 a 10 dias no modelo utilizado deve ser considerado inicial para a diferenciação osteoblástica, mesmo com a mineralização parcial da matriz colágena em 10 dias (de Oliveira et al., 2007; de Oliveira et al., 2008).

A expressão e atividade de ALP são fatores determinantes para o início da mineralização do osteóide, mas não para a progressão e manutenção desse processo (Rodan, Noda, 1991; Bellows et al., 1991). Assim, por sua importância, avaliações qualitativas e quantitativas desse parâmetro de caracterização fenotípica tem sido utilizadas amplamente em estudos de diferenciação osteogênica *in vitro* (Declercq et al., 2004; Golub, Boesze-Battaglia, 2007). Entretanto, a aplicação de métodos de menor especificidade para sua quantificação resulta na obtenção de valores de atividade da enzima que não correspondem necessariamente à intensidade de mineralização de culturas primárias (Hoemann et al., 2009). Adicionalmente, picos de expressão de atividade de ALP podem oscilar temporalmente durante a fase de diferenciação terminal de osteoblastos de culturas controles (de Oliveira et al., 2007; de Oliveira et al., 2008; de Oliva et al., 2009), o que levaria ao questionamento da real importância do uso desse parâmetro para caracterização do fenótipo osteogênico. Dessa forma, optamos por utilizar um método de maior especificidade para quantificar a atividade de ALP, clivada a partir da fração de membrana por uma fosfolipase (PIPLC) e não por proteases e/ou solventes orgânicos, contribuindo para um efeito de menor desnaturação da enzima. Além disso, com a clivagem da TNAP, a atividade pNPPase seria específica da ALP e não de outras fosfatases também presentes na fração de membrana (Simão et al., 2007; Simão et al., 2010). Os resultados obtidos por esse método confirmaram a redução expressiva da atividade de ALP nas culturas FCs, FCs/10 e FCs/100, sobretudo em 7 dias, mas diferiram dos dados obtidos por de Oliva et al. (2009) em

relação ao pico de atividade de ALP do grupo controle, detectado em 7 dias no presente estudo. Adicionalmente, notou-se efeito concentração-dependente para a atividade de ALP em 7 dias e correlação positiva com a mineralização das culturas e com a expressão de Runx2, BSP e ALP. Avaliados conjuntamente, esses resultados permitem considerar a atividade de ALP, clivada da fração de membrana, também como marcador inicial de diferenciação osteoblástica *in vitro*, cujos níveis são indicativos do potencial osteogênico de culturas primárias no modelo utilizado.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- A diferenciação osteogênica de culturas primárias de células osteoblásticas sobre Ti é inibida e/ou atrasada pela exposição a diferentes diluições do coquetel de FCs, com valores menores de expressão de RNAm para Runx2, BSP e ALP, atividade de ALP de membrana e mineralização. Para alguns dos parâmetros e tempos avaliados, notou-se efeito concentração-dependente.
- Os níveis de atividade de ALP de membrana aos 7 dias se correlacionaram positivamente com a mineralização das culturas aos 14 dias, à semelhança do observado para a expressão de Runx2, BSP e ALP aos 7 dias, o que justifica seu uso como marcador inicial da diferenciação osteoblástica, indicativo do potencial osteogênico de culturas primárias no modelo utilizado.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

Addison WN, Azari F, Sorensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. **J Biol Chem** 2007; 282: 15872-83.

Aghaloo TL, Moy PK, Freymuller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. **J Oral Maxillofac Surg** 2002; 60: 1176-81.

Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int J Oral Maxillofac Implants** 1999; 14:529-35.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thromb Haemost** 2004; 91:4-15.

Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden, P, Orive G, Andia I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. **Trends Biotechnol** 2006; 24:227-34.

Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive, G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. **J Periodontol** 2013; 84: 1180-90.

Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. **Int J Maxillofac Surg** 2004; 33:60-70.

Bailey Dubose K, Zayzafoon M, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin-1 inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through latent TGF-beta activation. **Biochem Biophys Res Commun** 2012; 422:488-93.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen** 2008; 16:585-601.

Bellows CG, Aubin JE. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. **Dev Biol** 1989; 133:8-13.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. 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.

Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE. Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. **Dev Biol** 1990; 140:132-8.

Bonucci E. **Biological Calcification**: Normal and Pathological Processes in the Early Stages. Berlin: Springer, 2007. 592p.

Borzini P, Mazzucco L, Giampaolo A, Hassan HJ. Platelet gel - the Italian way: a call for procedure standardization and quality control. **Transfus Med** 2006; 16:303-4.

Broggini N, Hofstetter W, Hunziker E, Bosshardt DD, Bornstein MM, Seto I, Weibrich G, Buser D. The influence of PRP on early bone formation in membrane protected defects. A histological and histomorphometric study in the rabbit calvaria. **Clin Implant Dent Relat Res** 2011; 13:1-12.

Camolezi FL, Daghasanli KR, Magalhaes PP, Pizauro JM, Ciancaglini P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. **Int J Biochem Cell Biol** 2002; 34:1091-101.

Ciancaglini P, Pizauro JM, Rezende AA, Rezende LA, Leone FA. Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9-lauryl ether (polidocanol): purification and metalloenzyme properties. **Int J Biochem** 1990; 22:385-92.

Ciancaglini P, Simao AM, Camolezi FL, Millan JL, Pizauro JM. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz J Med Biol Res** 2006; 39:603-10.

de Assis AF, Beloti MM, Crippa GE, de Oliveira PT, Morra M, Rosa AL. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. **Clin Oral Implants Res** 2009; 20:240-6.

de Oliva MA, Maximiano WM, de Castro LM, da Silva PE, Jr Fernandes RR, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL, de Oliveira PT. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. **J Histochem Cytochem** 2009; 57:265-76.

de Oliveira PT, de Oliva MA, Maximiano WM, Sebastiao KE, Crippa GE, Ciancaglini P, Beloti MM, Nanci A, Rosa AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. **J Histochem Cytochem** 2008; 56:629-38.

de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials** 2004; 25:403-13.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J Biomed Mater Res** 2007; 80:554-64.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem** 2003; 51:633-41.

Declercq H, Van den Vreken N, De Maeyer E, Verbeeck R, Schacht E, De Ridder L, Cornelissen M. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials** 2004; 25:757-68.

Dimai HP, Linkhart TA, Linkhart SG, Donahue LR, Beamer WG, Rosen CJ, Farley JR, Baylink DJ. Alkaline phosphatase levels and osteoprogenitor cell numbers suggest bone formation may contribute to peak bone density differences between two inbred strains of mice. **Bone** 1998; 22:211-6.

Ferreira CF, Carriel Gomes MC, Filho JS, Granjeiro JM, Oliveira Simoes CM, Magini Rde S. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clin Oral implants Res** 2005; 16:456-60.

Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. **Am J Sports Med** 2009; 37: 2259-72.

Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2002; 22:45-53.

Giovanini AF, Deliberador TM, Gonzaga CC, de Oliveira Filho MA, Gohringer I, Kuczera J, Zielak JC, de Andrade Urban C. Platelet-rich plasma diminishes calvarial bone repair associated with alterations in collagen matrix composition and elevated CD34⁺ cell prevalence. **Bone** 2010; 46:1597-603.

Giovanini AF, Gonzaga CC, Zielak JC, Deliberador TM, Kuczera J, Goringher I, de Oliveira Filho MA, Baratto-Filho F, Urban CA. Platelet-rich plasma (PRP) impairs the craniofacial bone repair associated with its elevated TGF-beta levels and modulates the co-expression between collagen III and alpha-smooth muscle actin. **J Orthop Res** 2011; 29:457-63.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem** 2004; 329:77-84.

Greiner AM, Richter B, Bastmeyer M. Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. **Macromol Biosci** 2012; 12:1301-14.

Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. **Curr Opin Orthop** 2007; 18:444-8.

Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem** 1972; 48:422-7.

Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:9445-9.

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathol Biol (Paris)** 2009; 57:318-23.

Hotton D, Mauro N, Lezot F, Forest N, Berdal A. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. **J Histochem Cytochem** 1999; 47:1541-52.

Hsieh SC, Graves DT. Pulse application of platelet-derived growth factor enhances formation of a mineralizing matrix while continuous application is inhibitory. **J Cell Biochem** 1998; 69:169-80.

Huang W, Yang S, Shao J, Li YP. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. **Front Biosci** 2007; 12:3068-92.

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; 252:554-67.

Javed F, Al-Askar M, Al-Rasheed A, Al-Hezaimi K. Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. **Arch Oral Biol** 2011; 56:1476-84.

Kim TH, Yun YP, Park YE, Lee SH, Yong W, Kundu J, Jung JW, Shim JH, Cho DW, Kim SE, Song HR. In vitro and in vivo evaluation of bone formation using solid freeform fabrication-based bone morphogenic protein-2 releasing PCL/PLGA scaffolds. **Biomed Mater** 2014; 9:025008.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell Tissue Res** 2010; 339:189-95.

Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. **J Cell Biochem** 2011; 112:750-5.

Lacoste E, Martineau I, Gagnon G. Platelet concentrates: effects of calcium and thrombin on endothelial cell proliferation and growth factor release. **J Periodontol** 2003; 74:1498-507.

Laurencin CT, Ashe KM, Henry N, Kan HM, Lo KW. Delivery of small molecules for bone regenerative engineering: preclinical studies and potential clinical applications. **Drug Discov Today** 2014; 19:794-800.

Lee MH, Kim YJ, Kim HJ, Park HD, Kang AR, Kyung HM, Sung JH, Wozney JM, Kim HJ, Ryoo HM. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. **J Biol Chem** 2003; 278:34387-94.

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; 14:1-41.

Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. **Iowa Orthop J** 1995; 13:118-40.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **J Bone Joint Surg Am** 2002; 84:1032-44.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 2001; 25: 402-8.

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials** 2003; 24:3095-100.

Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. **Biomaterials** 2004; 25:4489-502.

Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J Oral Maxillofac Surg** 2004; 62:489-96.

Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff K R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1998; 85:638-46.

Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. **J Histochem Cytochem** 2002; 50:333-40.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 1983; 65:55-63.

Naito H, Yoshimura M, Mizuno T, Takasawa S, Tojo T, Taniguchi S. The advantages of three-dimensional culture in a collagen hydrogel for stem cell differentiation. **J Biomed Mater Res A** 2013; 101:2838-45.

Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. **Microsc Res Tech** 1996; 33:214-31.

Nikolidakis D, Van den Dolder J, Wolke JG, Jansen JA. Effect of platelet-rich plasma on the early bone formation around Ca-P-coated and non-coated oral implants in cortical bone. **Clin Oral Implants Res** 2008; 19:207-13.

Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. **J Periodontal Res** 2008; 43:127-35.

Paz J, Wade K, Kiyoshima T, Sodek J, Tang J, Tu Q, Yamauchi M, Chen J. Tissue- and bone cell-specific expression of bone sialoprotein is directed by a 9.0 kb promoter in transgenic mice. **Matrix Biol** 2005; 24:341-52.

Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, van der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clin Oral Implants Res** 2005; 16:349-56.

Ramos-Torrecillas J, Luna-Bertos Ed, Manzano-Moreno FJ, García-Martínez O, Ruiz C. Human fibroblast-like cultures in the presence of platelet-rich plasma as a single growth factor source: clinical implications. **Adv Skin Wound Care** 2014; 27:114-20.

Ranly DM, Lohmann CH, Andreacchio D, Boyan BD, Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. **J Bone Joint Sur Am** 2007; 89:139-47.

Ranly DM, McMillan J, Keller T, Lohmann CH, Meunch T, Cochran DL, Schwartz Z, Boyan BD. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. **J Bone Joint Surg Am** 2005; 87:2052-64.

Rodan GA, Noda M. Gene expression in osteoblastic cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr** 1991; 1:85-98.

Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. **Bone Miner** 1994; 27:57-67.

Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. **J Oral Maxillofac Surg** 2005; 63:766-70.

Schwartz Fo HO, Novaes AB Jr, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. **Clin Oral Implants Res** 2007; 18:333-44.

Simão AM, Beloti MM, Cezarino RM, Rosa AL, Pizauro JM, Ciancaglini P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 2007; 146:679-87.

Simão AM, Yadav MC, Narisawa S, Bolean M, Pizauro JM, Hoylaerts MF, Ciancaglini P, Millán JL. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicle biomimetics. **J Biol Chem** 2010; 285:7598-609.

Slavkin HC, Bartold PM. Challenges and potential in tissue engineering. **Periodontol** 2000 2006; 41:9-15.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/ differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. **Endocr Rev** 1993; 14:424-42.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. **Physiol Rev** 1996; 76:593-629.

Streckbein P, Kleis W, Buch RS, Hansen T, Weibrich G. Bone healing with or without platelet-rich plasma around four different dental implant surfaces in beagle dogs. **Clin Implant Dent Relat Res** 2013 Jan 7. doi: 10.1111/cid.12026.

Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. **J Biol Chem** 2005; 280:13487-92.

Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. **J Biol Chem** 2003; 278:7949-55.

Uggeri J, Belletti S, Guizzardi S, Poli T, Cantarelli S, Scandroglio R, Gatti R. Dose-dependent effects of platelet gel releasate on activities of human osteoblasts. **J Periodontol** 2007; 78:1985-91.

Van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA. Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh. **Tissue Eng** 2003; 9:315-25.

Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. **Crit Rev Clin Lab Sci** 1994; 31:197-293.

Venne D, Raymond J, Allas S, Roy D, Leclerc G, Boushira M, Brazeau P. Healing of experimental aneurysms. II: Platelet extracts can increase the thickness of the neointima at the neck of treated aneurysms. **J Neuroradiol** 1999; 26:92-100.

Weibrich G, Kleis WK, Streckbein P, Moergel M, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of point-of-care methods for preparation of platelet concentrate (platelet-rich plasma). **Int J Oral Maxillofac Implants** 2012; 27:762-9.

Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. **J Bone Miner Res** 2000; 15:1879-88.

Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. **Endocr Rev** 1994; 15:439-61.

Whyte MP. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. **Ann N Y Acad Sci** 2010; 1192:190-200.

Yao KL, Todescan R Jr, Sodek J. Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. **J Bone Miner Res** 1994; 9:231-40.

APÊNDICE

8 APÊNDICE

Figura 1. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação positiva entre as variáveis ($r = 0,8667$, $p = 0,0573$), apesar de tendência à correlação positiva.

Figura 2. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = 0,6763$, $p = 0,2100$).

Figura 3. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = 0,4413$, $p = 0,4569$).

Figura 4. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para Runx2 em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = -0,3806$, $p = 0,5274$).

Figura 5. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para BSP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = -0,8715$, $p = 0,0542$), apesar de tendência à correlação negativa.

Figura 6. Teste de correlação de Pearson entre a expressão de RNAm para ALP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = -0,8667$, $p = 0,0572$), apesar de tendência à correlação negativa.

Figura 7. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP em 10 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = 0,5738$, $p = 0,3117$).

Figura 8. Teste de correlação de Pearson entre a atividade de ALP em 14 dias e a quantidade de matriz mineralizada em 14 dias de culturas primárias de células osteogênicas dos grupos controle, FCs, FCs/10, FCs/100 e FCs/1000 sobre Ti. Não se detectou correlação entre as variáveis ($r = 0,4224$, $p = 0,4787$).