



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL



Guilherme Alvarenga Alves

**Avaliação do efeito do licopeno no tecido ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas:
estudo *in vitro* em células osteoblásticas e *in vivo* com implante de scaffold de
PLLA/licopeno em defeitos ósseos críticos.**

Ribeirão Preto

2021



GUILHERME ALVARENGA ALVES



**Avaliação do efeito do licopeno no tecido ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas:
estudo *in vitro* em células osteoblásticas e *in vivo* com implante de scaffold de
PLLA/licopeno em defeitos ósseos críticos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu a vida. Aos meus pais, José Osvani Alves e Elaine de Alvarenga Alves, que são minha base educacional e de amor. Dedico este trabalho também ao meu irmão Osvaine, que esteve sempre ao meu lado incentivando e direcionando. E a Letícia Aparecida Ribeiro, pelo companherismo e sempre me estimular a conquistar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dr. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, por ter me apresentado a pesquisa, me orientado e acreditado em mim.

Ao Roger Rodrigo Fernandes e a Paula Katherine Vargas Sanchez pelos ensinamentos e todo apoio durante esses anos.

Meus companheiros de equipe Viviann Ruocco Vetucci e José Bernardo de Santis, pela amizade e cordialidade no meu percurso.

Aos técnicos Dimitrius Leonardo Pitol, Luiz Gustavo de Sousa, Milla Sprone Tavares Ricoldi, Fabíola Singaretti de Oliveira pelo direcionamento e auxílio durante a pesquisa.

À Imaculada Jainaira Miguel por todas as vezes que necessitei de sua ajuda, me atendendo prontamente e com total eficiência.

À todos os professores pertencentes ao Programa de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –USP.

Aos colegas do grupo Bone Research ao qual tive a alegria de participar.

À todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

LISTA DE FIGURAS, ILUSTRAÇÕES, EQUAÇÕES E TABELAS

Figura 1- Passos cirúrgicos de ovariectomia	12
Figura 2- Procedimentos para realização do exame de ciclo estral	13
Figura 3- Scaffolds de PLLA e scaffolds de PLLA/licopeno construídos em impressora 3D para serem implantados na calvária.	13
Figura 4- Confeção dos defeitos ósseos nas calvárias dos grupos experimentais	15
Figura 5- Inserção dos scaffolds de PLLA e de PLLA/licopeno.	15
Figura 6- Fotomicrografia de esfregaço vaginal	20
Figura 7. Cornos uterinos de ratas controles e ratas ovariectomizadas	20
Figura 8 - Proliferação celular de células osteoblásticas provenientes da calvária de ratas controle (Sham) e ovariectomizadas (OVX) cultivadas em concentrações de 10 µg/ml e 30 µg/ml de licopeno aos 7, 10 e 14 dias, avaliada por meio de ensaio colorimétrico (MTT).	22
Figura 9- Detecção in situ de fosfatase alcalina em células osteoblásticas da calvária de ratas controle e ovariectomizadas cultivadas em concentrações de 10 µg/ml e 30 µg/ml de licopeno aos 7, 10 e 14 dias.	23
Figura 10- Quantificação de nódulos mineralizados de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controle (Sham) e ovariectomizadas (OVX) e com adição de 10 µg/ml e 30 µg/ml de licopeno, aos 17 e 21 dias por meio da extração de vermelho de alizarina.	24
Figura 11- Análise da expressão gênica em células obtidas da medula óssea de calvária ratas controle (Sham) e ovariectomizada (OVX) e com adição de licopeno em 10µg/ml e 30 µg/ml aos 10 dias.	25

LISTA DE ABREVIACOES

ALP	Fosfatase Alcalina
ATP	Adenosina Trifosfato
Bglap	Osteocalcina
DEXA	Densitometria de Dupla Emisso com fontes de raios X.
DMO	Densidade Mineral ssea
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-Acético
FDA	Food and Drug Administration
MI	Mililitro
MTS	Meio Totalmente Suplementado
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
OVX	Grupo ovariectomizado
OVX_{PLLA}	Grupo ovariectomizado com implantao de scaffold de PLLA
OVX_{PLLA/Lic}	Grupo ovariectomizado com implantao de scaffold de PLLA e licopeno
OVX_{L10}	Grupo ovariectomizado com administrao de 10 µg/ml de licopeno
OVX_{L30}	Grupo ovariectomizado com administrao de 30 µg/ml de licopeno
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
PLLA	Polylactic acid
PVPI	Iodopovidona
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Sham	Grupo com simulao de ovariectomia

Sham_{PLLA} PLLA	Grupo com simulação de ovariectomia com implantação de scaffold de PLLA
Sham_{PLLA/Lic} PLLA e licopeno	Grupo com simulação de ovariectomia com implantação de scaffold de PLLA e licopeno
Sham_{L10} de licopeno	Grupo com simulação de ovariectomia com administração de 10 µg/ml de licopeno
Sham_{L30} de licopeno	Grupo com simulação de ovariectomia com administração de 10 µg/ml de licopeno
TRIS	Hidroximetil e aminometano
µg	Micrograma

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO

II. PROPOSIÇÃO

III. MATERIAL E MÉTODOS

IN VIVO

1. ANIMAIS UTILIZADOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS
2. INDUÇÃO DA OSTEOPOROSE
3. GRUPO CONTROLE
4. CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD
5. CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO NA CALVÁRIA
6. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL
7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO
8. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA
9. ANÁLISE QUALITATIVA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

IN VITRO:

1. COLETA DE FRAGMENTOS E CULTURA CELULAR
2. ADMINISTRAÇÃO DO LICOPENO IN VITRO
3. PROLIFERAÇÃO CELULAR
4. DETECÇÃO IN SITU DE FOSFATASE ALCALINA
5. FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA
6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL
7. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADO

IV. RESULTADOS

IN VIVO:

1. ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS EM MICROSCOPIA ÓPTICA
2. ANÁLISE QUALITATIVA EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

IN VITRO:

1. PROLIFERAÇÃO CELULAR:
2. DETECÇÃO IN SITU DA FOSFATASE ALCALINA ALP
3. FORMAÇÃO DA MATRIZ MINERALIZADA
4. EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA

5. DISCUSSÃO

6. CONCLUSÕES

7. BIBLIOGRAFIA

8. ANEXOS

9. APÊNDICE

RESUMO

A osteoporose é caracterizada por uma redução da massa e alteração da microarquitetura óssea, resultando em fraturas. Estudos apontam o estresse oxidativo como fator coadjuvante no aparecimento e desenvolvimento da osteoporose pós-menopausa. O licopeno, carotenoide responsável pela pigmentação vermelha de alguns alimentos, é um potente antioxidante que combate os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs) que geram o estresse oxidativo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o potencial do licopeno na atividade funcional das células osteoblásticas de ratas ovariectomizadas e *in vivo* a associação do scaffold de PLLA/licopeno em defeitos ósseos críticos. Foram utilizadas ratas Wistar Hannover divididas em grupos sham (controle) e ovariectomizado (OVX). Após 60 dias da ovariectomia, foram criados defeitos críticos de 5mm de diâmetro na calvária para a aplicação do scaffold de PLLA associado ou não ao licopeno. Após 30 dias, as ratas foram eutanasiadas para análise histológica da neoformação óssea e integração com o scaffold na região de calvária. Para os experimentos *in vitro*, os fragmentos ósseos provenientes dos defeitos das calvárias foram processados para isolamento de células osteoblásticas e cultivadas em meio osteogênico estabelecendo os seguintes grupos: Sham, Sham+10µg/mL licopeno (Sham_{L10}), Sham+30µg/mL licopeno (Sham_{L30}), ovariectomizado (OVX), OVX+10µg/mL licopeno (OVX_{L10}) e OVX+30µg/mL (OVX_{L30}). Os parâmetros avaliados foram: proliferação celular (MTT), detecção *in situ* de fosfatase alcalina, formação de matriz mineralizada e expressão gênica quantitativa dos genes fosfatase alcalina (Alp), osteocalcina (Bglap), osteopontina (Spp1) e fator de transcrição relacionado ao gene runt 2 (Runx2). Os dados quantitativos foram submetidos à testes estatísticos para significância de $p < 0.05$. A análise histológica qualitativa da região dos defeitos mostrou neoformação óssea em todos os grupos, sendo similar entre os grupos OVX com scaffold PLLA/lic e grupos sham, com integração osso/scaffold sem a presença de cápsula fibrosa. Os resultados *in vitro* demonstraram que a presença do licopeno diminuiu a proliferação celular nos grupos Sham e nos grupos OVX após 7, 10 e 14 dias em ambas as concentrações. A detecção *in situ* de ALP foi similar nos grupos Sham e menor aos 7 e 10 dias nos grupos ovariectomizados com a adição das duas concentrações de licopeno. O licopeno aumentou a mineralização no grupo Sham após 17 dias, enquanto que aos 17 e 21 dias houve maior formação de nódulos no grupo OVX sem licopeno. A expressão quantitativa dos genes Alp, Runx2, Bglap e Opn foi similar entre os grupos Sham e

OVX sem licopeno, enquanto que a sua adição induziu significativamente a expressão dos genes *Alp*, *Runx2* e *Bglap* nos grupos Sham. Os resultados sugerem que o licopeno pode ser associado à scaffold de PLLA para auxiliar a neoformação óssea e influenciar a atividade funcional de células osteoblásticas independente da presença do modelo experimental de osteoporose.

PALAVRAS –CHAVE: Licopeno, osteoporose, scaffold, PLLA

ABSTRACT

Osteoporosis is characterized by a reduction in bone mass and fragile bone microarchitecture, leading to fractures. Studies indicate oxidative stress as a coadjuvant factor in the development of postmenopausal osteoporosis. Lycopene is a carotenoid responsible for the red pigmentation of fruits and vegetables and a potent antioxidant that might diminish the deleterious effects of oxygen-reactive species (ROS) that generate oxidative stress. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of lycopene to stimulate the functional activity of calvaria osteoblastic cells of ovariectomized rats as well as assess the association of a PLLA/lycopene scaffold in critical bone defects. Wistar Hannover female rats were divided into sham and ovariectomized groups and after 60 days of ovariectomy, critical defects were created in the calvaria followed by the application of the PLLA scaffold with or without lycopene. After 30 days, the rats were euthanized to collect the calvaria for qualitative histological analysis. Bone fragments of calvaria defects were processed to isolate osteoblastic cells cultured in osteogenic medium and divided in the following groups: Sham, Sham+10mg/mL lycopene (Sham10), Sham+30mg/mL lycopene (Sham30), ovariectomized (OVX), OVX+10mg/mL lycopene (OVX10) e OVX+30mg/mL (OVX30). There were evaluated cell proliferation (MTT), in situ detection of alkaline phosphatase (ALP), mineralized matrix formation, and quantitative expression of *Alp*, osteocalcin (*Bglap*), osteopontin (*Spp1*), and Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) genes. Quantitative data were submitted to statistical tests set for $p < 0,05$. Histological analysis of bone defects showed bone neof ormation in all groups, especially in sham groups and OVX associated with PLLA/lic scaffold, bone/scaffold integration. The presence of lycopene decreased cell proliferation in the Sham and OVX groups after 7, 10, and 14 days at both concentrations. The in situ detection of ALP was similar in the Sham group and lower at 7 and 10 days in the ovariectomized groups with the addition of both concentrations of lycopene. Lycopene increased mineralization in the Sham group after 17 days, while at 17 and 21 days there was greater nodule formation in the OVX group without lycopene. The quantitative expression of genes *Alp*, *Runx2*, *Bglap*, and *Opn* was similar between the Sham and OVX groups without lycopene, whereas its addition significantly induced the expression of the *Alp*, *Runx2*, and *Bglap* genes in the Sham groups. The results suggest that lycopene can be associated with PPLA scaffolds to help bone repair and may influence the functional activity of osteoblastic cells regardless of the presence of the experimental model of osteoporosis.

Keywords: Lycopene, osteoporosis, scaffold, PLLA.

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma patologia metabólica caracterizada pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo e diminuição da densidade mineral óssea (DMO). Essas características promovem a fragilidade deste tecido, aumentando o risco à fraturas (Prentice et al., 2003). Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose, como a idade, o sexo e a origem étnica (Kuo et al., 2017). Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas sofram de osteoporose em todo o mundo. No cenário atual, aproximadamente 30% das mulheres na pós-menopausa na Europa e nos Estados Unidos são afetadas pela osteoporose (Szulc et al., 2011). Presume-se que haverá um aumento de 32% na incidência de osteoporose em adultos mais velhos com idade superior aos 50 anos até 2030 (Wright et al., 2014). A osteoporose pode ser classificada em duas categorias: osteoporose primária e osteoporose secundária (Duque et al., 2008). Segundo Sipos et al. (2008), a osteoporose primária pode ser subclassificada em osteoporose pós-menopausa (tipo 1) e osteoporose senil (tipo 2). A osteoporose pós-menopausa é causada pela deficiência de hormônios estrogênicos em mulheres após a menopausa, enquanto a osteoporose senil se desenvolve com o envelhecimento em pessoas com idade superior aos 70 anos. A osteoporose secundária tem causas determinadas, como fatores alimentares, doença crônica, disfunção endócrina, efeitos colaterais de medicamentos ou malignidade metastática ou hematológica (Duque et al., 2008). Por suas características a osteoporose possui prevalência em idosos e predileção pelo sexo feminino por se relacionar ao período pós-menopausa (Kuo et al., 2017), quando ocorre a diminuição da secreção dos hormônios estrogênicos, obtendo como consequência maior atividade metabólica óssea, ou seja, maior ritmo na reabsorção e menor formação óssea (Richelson et al., 1987). A osteoporose tem início assintomático, tornando-se fundamental o seu diagnóstico precoce (Danowski et al., 1996). Os métodos mais utilizados para monitoração da DMO e identificação de pacientes propensos à fraturas osteoporóticas são as triagens por densitometria de dupla emissão com fontes de raios X (DEXA) e as ultrasonometrias ósseas (USO). A DEXA realiza as análises da coluna, região proximal do fêmur e terço distal do rádio, áreas anatômicas mais afetadas pela patologia. A ultrasonometria óssea é uma avaliação indireta do risco de fratura na coluna e fêmur que todavia não mede a DMO propriamente dita (Szejnfeld et al., 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS), para critério de diagnóstico da osteoporose recorre ao método “T-score”. O “T-score” é um valor que corresponde à diferença, em

desvio-padrão, entre o pico de massa óssea, alcançado aos 30 anos de idade, e a DMO do paciente examinado na região nas áreas da coluna, quadril ou antebraço. Assim o diagnóstico baseia-se em um “T-score” acima de 1.0 de desvio padrão considerando normalidade, valores “T-score” entre -1 e -2,5 para osteopenia e valores igual ou abaixo de -2.5 para osteoporose (Miller et al., 2006). Na busca da prevenção ou diminuição da perda óssea, devem-se associar medidas físicas, medicamentosas e mudanças no cotidiano. Estratégias de prevenção da osteoporose incluem precauções de quedas, prática de atividades físicas, ingestão diária de alimentos ricos em cálcio (1.200 mg de cálcio diárias), exposição solar, além de evitar vícios nocivos como o tabagismo e alcoolismo (Rossini et al., 2016). A terapia medicamentosa é recomendada em casos mais extremos como (1) mulheres na pós-menopausa que já apresentaram fraturas osteoporóticas vertebrais ou de quadril; (2) mulheres que têm valores de DMO compatível com osteoporose na coluna lombar, porção femoral ou região de quadril; (3) todas as pessoas que se enquadram no perfil de osteopenia, “T-score” entre -2,5 e -1 desvio padrão; e (4) pessoas que possuem risco de fratura osteoporótica maior que 20% em 10 anos (Cosman et al., 2014). Os medicamentos que atualmente têm demonstrado maiores evidências em relação a redução de fraturas são os bisfosfonatos, raloxifeno e utilização de cálcio e vitamina D (Bischoff et al., 2005). Os bisfosfonatos são os mais utilizados como inibidores da reabsorção óssea e aumentam a DMO dos ossos trabeculares, reduzindo fraturas vertebrais, não-vertebrais e de quadril (Reid et al., 2011). Os raloxifenos atuam como agonistas dos receptores de estrogênio, reduzindo as fraturas vertebrais, sendo disponíveis para prevenção e tratamento da osteoporose pós-menopausa (Ettinger et al., 1999). A associação de cálcio e vitamina D reduz fraturas não vertebrais, uma vez que o cálcio diminui lentamente a perda óssea, e a vitamina D é fundamental para absorção intestinal de cálcio e sua incorporação ao osso (Shea et al., 2004). Apesar das atuais terapias para tratar a osteoporose serem eficazes em aumentar a densidade mineral óssea, atualmente menos de 20% dos pacientes com fratura por fragilidade têm acesso aos medicamentos, sendo que na Europa, 60% das mulheres com alto risco não recebem terapia (Kanis et al., 2014). A falta de adesão ao tratamento é atribuída principalmente às preocupações sobre a segurança dos fármacos utilizados para o tratamento da osteoporose (Russo et al., 2020). Os efeitos adversos são incomuns nos tratamentos da osteoporose, mas em alguns casos, os bisfosfonatos podem causar osteonecrose mandibular e o raloxifeno pode aumentar o risco de trombose e acidente vascular cerebral (Kha et al., 2017). Além disso, relatos de irritação da mucosa

gastrointestinal superior, fraturas atípicas associadas a antirreabsortivos, reações de hipersensibilidade e câncer estão ligados a agentes com capacidade de aumentar a densidade mineral óssea (Ukon et al., 2019). Assim, novas estratégias terapêuticas e métodos seguros que podem acelerar e promover um equilíbrio na remodelação óssea e/ou reparação sem efeitos adversos graves são necessárias (Khan et al., 2017). Entre os estímulos que podem modular o metabolismo ósseo, o estresse oxidativo parece ter um papel de destaque. Sabe-se que a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode diminuir a osteoblastogênese (Mody et al., 2001) e aumentar a diferenciação e função dos osteoclastos (Nakanishi et al., 2013). Os antioxidantes fornecem um meio eficaz para combater os efeitos deletérios das EROs, sendo utilizados como preventivos no tratamento de doenças (Shi et al., 2004). Assim, a atividade antioxidante de algumas substâncias tornou-se foco central de pesquisas com a finalidade de prevenir ou melhorar lesões teciduais. Os antioxidantes são encontrados em fármacos e alimentos, e entre eles encontra-se o licopeno, que é um carotenoide amplamente encontrado na natureza, sendo responsável pela pigmentação vermelha de algumas frutas e vegetais como o tomate, goiaba e pimentão (Clinton et al., 1998). O licopeno é o carotenoide com maior potencial antioxidante, capaz de inibir o estresse oxidativo de espécies reativas (Stahl et al., 2003). Outros pesquisadores encontraram relação diretamente proporcional em pacientes com fraturas osteoporóticas com maior estresse oxidativo em relação a pacientes saudáveis, se tornando importante o estudo dos antioxidantes como o licopeno no papel de neutralizar o efeito das EROs na redução de risco a osteoporose (Prasad et al., 2003). As substâncias antioxidantes podem ser administradas de maneira indireta pela ingestão oral e diretamente pelo contato local com o tecido. Para aplicação local existe a necessidade de um carreador, papel que pode ser realizado pelos arcabouços ou scaffolds (Chimutengwende et al., 2012), os quais podem ser descritos como um ambiente 3D biocompatível e biodegradável produzido a partir de polímeros sintéticos ou naturais, cerâmicas ou metais, que atuam como matrizes para a colonização, crescimento e diferenciação celular, objetivando a reparação e regeneração de tecidos (Hutmacher et al., 2007). Estes materiais bioativos em formato de arcabouços biodegradáveis são referência na engenharia tecidual, uma vez que reparar defeitos ósseos de tamanho crítico é um grande desafio para medicina ortopédica e regenerativa (Rao et al., 2013). Materiais como os polímeros têm sido utilizados para substituição ou preenchimento de lojas ósseas (Liao et al., 2004), entre eles o polidimetilsiloxano, o poliácido láctico (PLLA), poliácido láctico-co-glicólico, a policaprolactona e o

polietileno tereftalato (Islami et al., 2018). O PLLA é um polímero biodegradável, cuja degradação resulta em ácido lático, desempenhando um papel importante devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de possuir aprovação da Food and Drug Administration (FDA) para sua utilização em cirurgias de reconstrução óssea (Giavaresi et al., 2004). Entre os biomateriais disponíveis, ainda não existe um biomaterial considerado ideal, que seja osteocondutor, osteoindutor e osteogênico (Amini et al., 2012), com ótimas propriedades mecânicas, biocompatibilidade, novas habilidades de degradação de sincronização óssea, estrutura de poros ajustável e capacidade de promoção da osteogênese. Assim, a associação de um scaffold com substâncias antioxidantes poderia ser interessante, assim como o estudo de novos biomateriais torna-se necessário (Weisgerber et al., 2016). Sendo assim, se torna importante o estudo do licopeno com seu alto potencial antioxidante em doenças crônicas relacionadas ao dano oxidativo como a osteoporose. Assim, foram construídas duas hipóteses para o presente estudo: (1) a de que o licopeno administrado in vitro em contato com células osteoblásticas da calvária de ratas ovariectomizadas possa promover uma atividade funcional semelhante às células controles e (2) que o licopeno aplicado localmente junto com um scaffold de PLLA possa beneficiar o reparo ósseo em defeitos da calvária de ratas ovariectomizadas.

2. PROPOSIÇÃO

Considerando o acima exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar: (1) in vitro, a influência do licopeno na atividade funcional de células osteoblásticas da calvárias de ratas ovariectomizadas, e (2) in vivo, a neoformação óssea em defeito ósseo crítico de calvária na presença de scaffold de PLLA associado com o licopeno.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi avaliar in vitro a influência do licopeno na atividade funcional de células osteoblásticas da calvária e in vivo a associação do scaffold de PLLA com o licopeno na neoformação óssea em defeito ósseo crítico em ratas osteoporóticas.

3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram alcançados por meio dos seguintes parâmetros:

ENSAIOS IN VIVO

-análise histológica qualitativa por meio de microscopia óptica do reparo ósseo no defeito da calvária e da integração com o scaffold.

ENSAIOS IN VITRO

- proliferação celular (MTT);
- detecção in situ de fosfatase alcalina;
- detecção e quantificação de nódulos mineralizados;
- expressão de genes associados ao metabolismo ósseo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS UTILIZADOS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Após realizado o cálculo amostral com o Software G*Power 3.1 (Faul et al., 2007), assumindo uma diferença como significativamente maior que 1.5 do desvio padrão e considerando os erros Tipo I (α) e Tipo II (β) de 5% e 20%, respectivamente, ficou estabelecido que seriam necessárias 40 ratas Wistar Hannover fêmeas (já considerando possíveis perdas) entre 250g e 300g, provenientes do Biotério central da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto. Foram utilizadas 18 ratas Wistar para os experimentos in vitro (n=3 para sham e n=3 para ovariectomizadas, com experimentos em triplicata) e 20 para os experimentos in vivo (n=5 para cada grupo experimental). Elas foram tratadas com ração especial para roedores e água filtrada ad libitum. Foram separadas em caixas grandes com cama de maravalha nas dimensões 41 x 34 x 16 cm, em número de três por caixa. A temperatura do local de alojamento dos animais foi mantida em 23,5-24,5°C, controlada por condicionador de ar quente/frio de janela, além de um sistema de exaustão de ar, e foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais da FORP-USP, com o protocolo 2019.1.483.58.3.

4.2. INDUÇÃO DA OSTEOPOROSE

Os animais foram ovariectomizados bilateralmente (Figura 1). Primeiramente eles foram pesados e então anestesiados Dopaser (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Ketamina Agener (Ketamina) - anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA - Campinas, SP, Brasil, na proporção de 10mg/Kg e 75mg/Kg de cetamina respectivamente, injetada por via intramuscular. Também foi realizada a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas. Após a anestesia os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais e feita a assepsia dos locais a serem incisionados com álcool iodado (PVPI, Cristália, Brasil). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos. Foi realizada a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil) de modo a fechar

devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Brasil). Os animais permaneceram mantidos em número de três por caixa, por sessenta dias e receberam ração e água “ad libitum”. Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana. A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos.

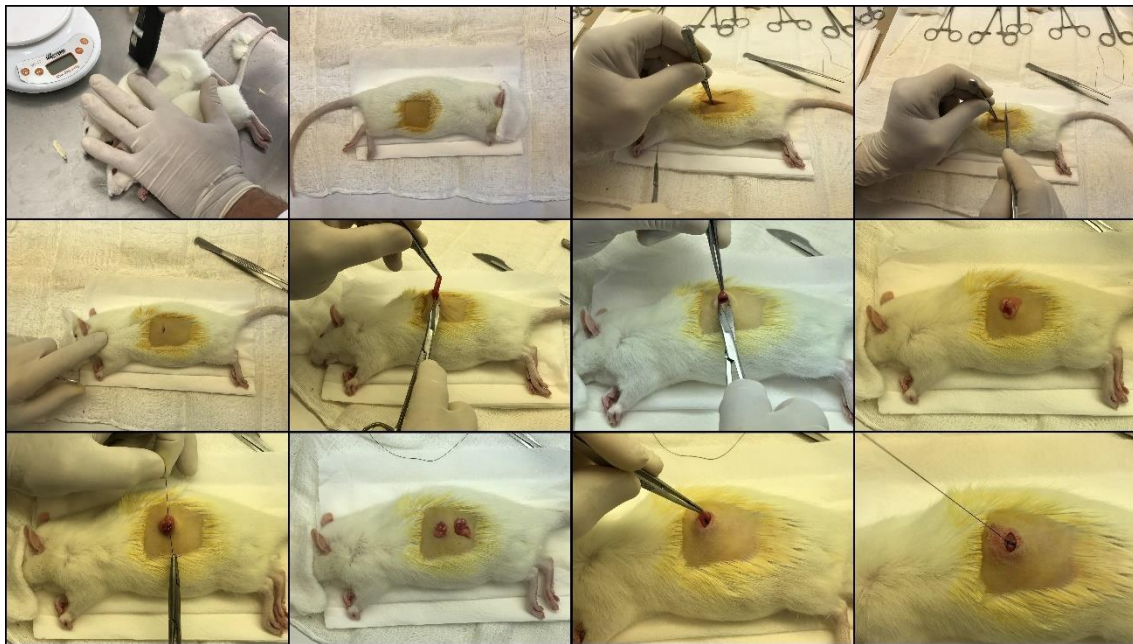


Figura 1. Passos da cirurgia de ovariectomia. Arquivo Pessoal.

4.3. GRUPO CONTROLE /SHAM

Os animais dos grupos controles foram submetidos à anestesia, exposição do ovário e reposicionamento do mesmo na cavidade abdominal. Estes animais também receberam, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Brasil) e também foram submetidos ao exame de ciclo estral (Figura 2).

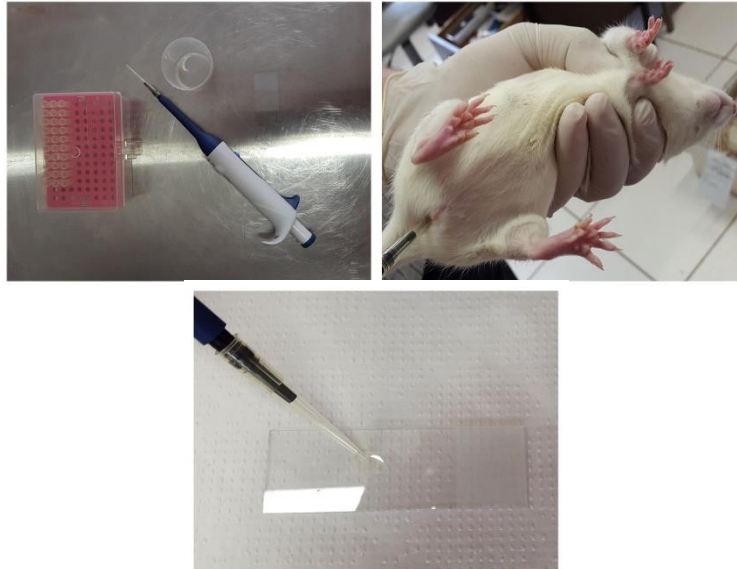


Figura 2. Procedimentos para realização do exame de ciclo estral. Arquivo Pessoal.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD

Os scaffolds foram obtidos por meio de uma parceria realizada com a Dra. Janaína A. Dernowsek, do Instituto de Pesquisa Renato Archer (Campinas, Brasil), que gentilmente confeccionou scaffolds de ácido poli-L-láctico (PLLA) PLLA e de PLLA com o licopeno liofilizado a 10%, por meio de utilização de impressão 3D. Os scaffolds apresentaram dimensão de 4mm de diâmetro e 2mm de altura para serem inseridos nos defeitos criados na calvária (Figura 3).



Figura 3. Scaffolds de PLLA e scaffolds de PLLA/licopeno construídos em impressora 3D para serem implantados na calvária.

4.5. CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO NA CALVÁRIA

Os animais foram anestesiados com o mesmo protocolo do item 4.2 e após a tricotomia e antissepsia com povidini-iodo alcoólica (PVPI, Cristália, Brasil), foi realizada uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região central da

calvária, com lâmina de bisturi estéril número 15, previamente montada em cabo de bisturi número 3, de modo a expor a região óssea de interesse. Com a calvária exposta, foi realizado um defeito ósseo na região do lobo parietal esquerdo (Figura 4). Para isso foi utilizada uma broca cirúrgica do tipo trefina com “stop” de 5 mm de diâmetro interno previamente adaptada em contra-ângulo cirúrgico (Kavo, Brasil) e com o auxílio de um motor elétrico para implantes, ajustado em 3000rpm com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%, foi realizada a perfuração criando um defeito ósseo cilíndrico com o diâmetro dito anteriormente, estando esta dimensão dentro dos padrões citados na literatura para defeitos ósseos críticos (Messora et al., 2008), para inserção dos scaffold (Figura 4). Os fragmentos retirados da calvária foram utilizados para o isolamento das células osteoblásticas, metodologia que está descrita no item ensaios in vitro. Os animais foram divididos em grupos Sham+scaffold PLLA, Sham+scaffold PLLA/licopeno, OVX+scaffold PLLA e OVX+scaffold PLLA/licopeno. Após a cirurgia e inserção dos scaffolds (Figura 5), foi realizada a sutura dos tecidos, sendo a pele do animal, juntamente com o periósteo, reposicionada à sua posição original e suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil), de forma que as margens do retalho foram fechadas corretamente. Cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso corporal de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil).

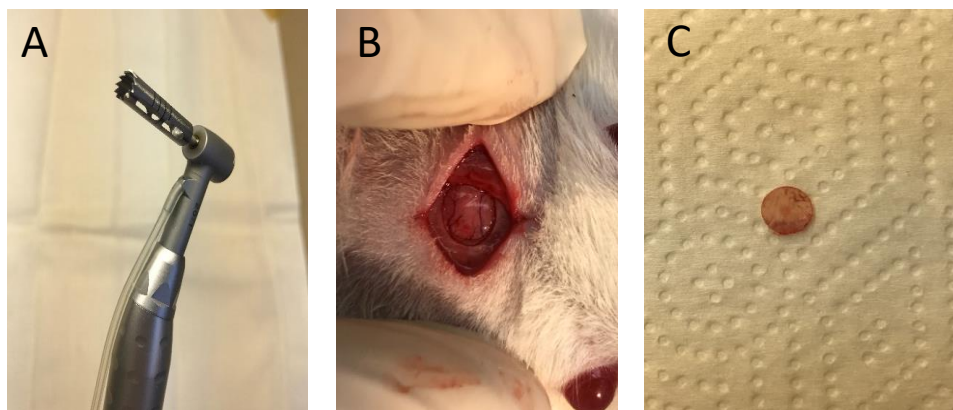


Figura 4. Confecção dos defeitos ósseos nas calvárias dos grupos experimentais.

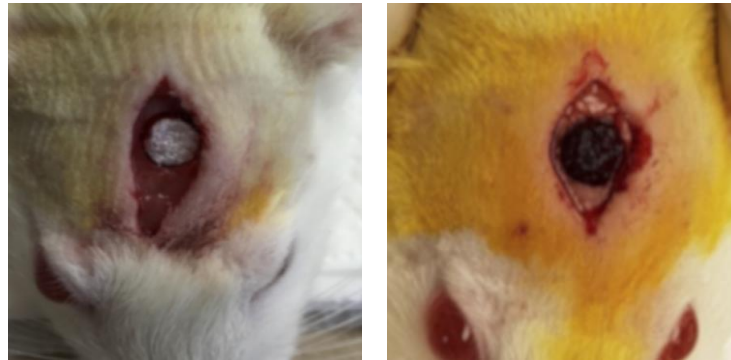


Figura 5. Inserção dos scaffolds de PLLA (A) e de PLLA/licopeno (B).

4.6. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL

As ratas foram eutanasiadas após trinta dias por meio de dose anestésica convencional (descrita no item 4.2) seguida de decapitação. Em seguida foi realizada a coleta dos fragmentos ósseos contendo o defeito com margem de segurança, para a realização das avaliações histológicas por microscopia óptica. Os fragmentos foram acondicionados individualmente em potes plásticos devidamente identificados, contendo solução de formalina neutra, tamponada 10% p.H.=7,0.

4.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

A calvária dos animais foi removida, utilizando tesoura e pinças adequadas. Os tecidos moles presentes foram cuidadosamente separados para a obtenção de um fragmento ósseo contendo o defeito e margem de segurança. As calvárias foram imersas em formaldeído a 4% tamponado, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA+TRIS a 0,5M, e as soluções foram trocadas a cada dois dias. As amostras foram desidratadas em exposição gradual ao etanol (70% durante a noite, seguidas de 80, 85, 90, 95% e 100%), processados com xilol e embebidas em parafina. Secções semi-seriadas longitudinais foram realizadas em micrótomo, com espessura de 6 μ m e coradas com tricrômico de Masson para observação histológica da neoformação óssea com a presença dos scaffolds com e sem licopeno. A análise foi realizada utilizando um microscópio de luz Leica DM4000B (Leica, Bensheim, Alemanha) equipado com uma câmara digital Leica DFC310FX (Leica, Bensheim, Alemanha).

4.8. COLETA DE FRAGMENTOS E CULTURA CELULAR

Os fragmentos ósseos das calvárias dos grupos experimentais foram coletados durante a criação do defeito ósseo (Figura 4), triturados, e transferidos para um tubo de centrífuga estéril para digestão através da adição de colagenase tipo II (Gibco) na concentração de 1mg/mL e colocados em banho de água a 37°C sob agitação constante. Após 15 minutos de digestão, o sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo de centrífuga contendo metade de volume de meio de cultura. Este procedimento de digestão com colagenase foi realizado três vezes. O sobrenadante da primeira digestão foi descartado e os das últimas duas digestões foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes da centrifugação foram removidos, e as células e fragmentos foram ressuspensos em MTS e colocados em garrafas de cultura de 75 cm². Ao atingirem subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1 mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), contadas utilizando o contador automático (Invitrogen) e a primeira passagem foi utilizada para cultivo em garrafas de cultura a uma densidade celular de 8×10^4 células por garrafa. Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas em ambiente úmido com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após a subconfluência, as células foram removidas das garrafas e colocadas em placas de cultura de 24 poços em uma concentração de 2×10^4 por poço.

4.8.1. ADMINISTRAÇÃO DO LICOPENO IN VITRO

Foi utilizado o licopeno (Galena, Brasil) na concentração de 10%, com certificado de análise de controle de qualidade emitido pela Via Farma (São Paulo, Brasil). Após sua solubilização em água destilada, o licopeno foi administrado nas concentrações de 10 e 30 µg/mL, seguindo protocolos já realizados em nosso laboratório e baseados na literatura (Zeng et al., 2017). A diluição foi preparada a cada troca de meio de cultura, que ocorreu a cada dois dias. As culturas celulares foram divididas em grupo Sham, Sham+10 µg/mL licopeno (Sham_{L10}), Sham+30 µg/mL licopeno (Sham_{L30}), ovariectomizado (OVX), ovariectomizado+10 µg/mL licopeno (OVX_{L10}) ovariectomizado+30 µg/mL licopeno (OVX_{L30}) e posteriormente foram avaliadas com os parâmetros descritos a seguir.

4.8.2. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Após 7, 10 e 14 dias, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) (Sigma®). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e estes foram lavados com 1mL de solução PBS aquecida. Em seguida, foi adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150µL foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Inc.) a 570nm. Os valores de absorbância obtidos foram submetidos à análise estatística.

4.8.3. DETECÇÃO IN SITU DE FOSFATASE ALCALINA

A detecção de fosfatase alcalina in situ foi realizada aos 7, 10 e 14 dias. Em um béquer foram adicionados 20mL de água deionizada e 0,320g de Triz (Sigma) para preparar a solução 1. Em outro béquer foram adicionados 2mL de dimetilformamida (Merck) e 0,007g de Naphthol (Sigma) para preparar a solução 2. Foram adicionados 7 mg de FastRed (Sigma) na solução 1 e retirados 2mL desta solução para serem adicionados 2mL na solução 2 formando a solução de trabalho. Cada poço foi lavado uma vez com tampão (PBS) e colocado 1mL da solução de trabalho. Posteriormente a placa foi armazenada na incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Após este período foi retirada a solução dos poços e após a secagem a temperatura ambiente, foram realizadas as imagens fotográficas. Com o auxílio do software Image J, as imagens coloridas foram convertidas em imagens binárias, seguindo uma escala de cinza e os pixels contados, gerando um gráfico com os resultados.

4.8.4. FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 e 21 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C, preenchidos com 2mL de formalina 10% e mantidos a 4°C. Decorridas 24 horas, após

remoção da formalina, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em séries crescentes de álcoois (30°GL, 50°GL, 70°GL e 100°GL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica foi de 1 hora. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 150µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos eppendorf de 1,5mL e agitadas em vórtex por 30 segundos e aquecida a 85°C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 20 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram adicionados. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405nm.

4.8.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Para avaliar a expressão dos genes osteocalcina (Bglap), osteopontina (Spp1), fosfatase alcalina (Alp), e fator de transcrição relacionado ao gene runt 2 (Runx2), aos 10 dias de experimento o meio de cultura foi removido dos poços e adicionado o reagente Trizol LS (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) à TA, sob agitação por pipetagem. As amostras foram transferidas para tubos eppendorf e armazenadas em freezer a -20°C por 48 horas. Após esse período, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320nm) e a integridade de cada amostra foi avaliada utilizando um chip, capaz de verificar amostras de RNA na concentração de 25 a 500ng/µL, no equipamento Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras do RNA total foram aliqüotadas e aquecidas a 70°C por 2 minutos e, em seguida, mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. A matriz do gel, aplicada nos capilares do chip, contém uma mistura de fluoróforos e marcadores de peso molecular. A ligação dos fluoróforos ao marcador e ao RNA

resultou na emissão de fluorescência, que é quantificada, permitindo a separação do RNA ribossômico 18S e 28S e a verificação da integridade do RNA total a partir da atribuição de um número de integridade do RNA (RIN) que varia de 1 a 10. Foram consideradas amostras viáveis para realização do Real-time PCR aquelas que apresentaram valores de RIN superiores a 8. Depois de constatada a integridade do RNA, o passo seguinte foi a confecção da fita complementar de DNA (cDNA) a partir de 1µg de RNA total. Este procedimento foi realizado no termociclador MastercycleGradient (Eppendorf, 20 Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit High-capacitycDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems, Fort City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para as reações de Real-time PCR, foram utilizadas sondas TaqMan (AppliedBiosystems) para os genes-alvo em equipamento StepOnePlus (Life Technologies). As reações foram realizadas em quadruplicata utilizando 5µL de TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5µL de sonda TaqMan para os genes de interesse (Tabela 2) e 4,5µL de cDNA (11,25ng), para um volume final de 10µL/reação. As reações de amplificação consistem em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar, determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras. Como controle endógeno foi avaliada a expressão do gene para a enzima GAPDH. Os níveis de expressão do controle endógeno foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene-alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pela betactina.

4.8.6. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados quantitativos obtidos dos ensaios in vitro e in vivo foram submetidos a testes de avaliação de normalidade dos dados, e posteriormente submetidos à teste

estatístico One-way ANOVA ou Kruskal-Wallis para significância de 5%, com a utilização do software GraphPadPrism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. COMPROVAÇÃO DO SUCESSO DA OVARIECTOMIA

A Figura 6 mostra as imagens de esfregaço vaginal 16 dias após a cirurgia. Nas ratas controles podemos observar a predominância de leucócitos e células epiteliais nucleadas e anucleadas, definindo a fase metaestro. Já o esfregaço de ratas ovariectomizadas mostrou predominância de leucócitos, definindo a fase diestro, confirmando o sucesso da ovariectomia. A Figura 7 indica a atrofia dos cornos uterinos das ratas ovariectomizadas quando comparado às ratas controles.

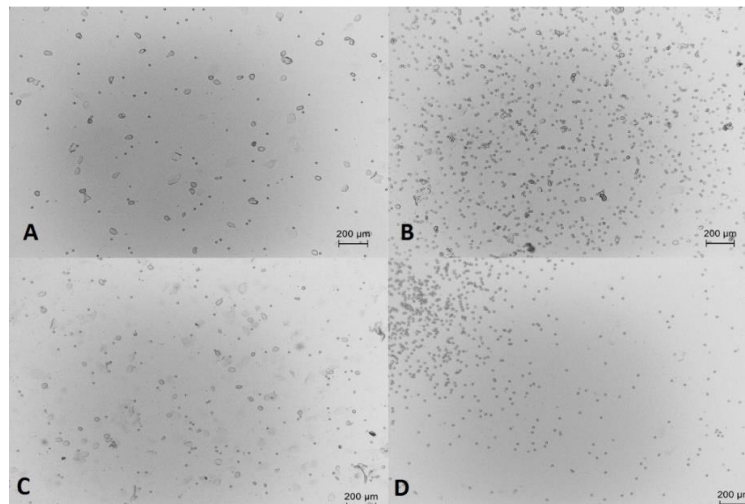


Figura 6. Fotomicrografia de esfregaço vaginal, dezesseis dias após cirurgia. A e C) Esfregaço de ratas controles em fase metaestro com leucócitos e células epiteliais nucleadas e anucleadas. B e D) Esfregaço de ratas ovariectomizadas na fase diestro com predominância de leucócitos. Arquivo Pessoal.

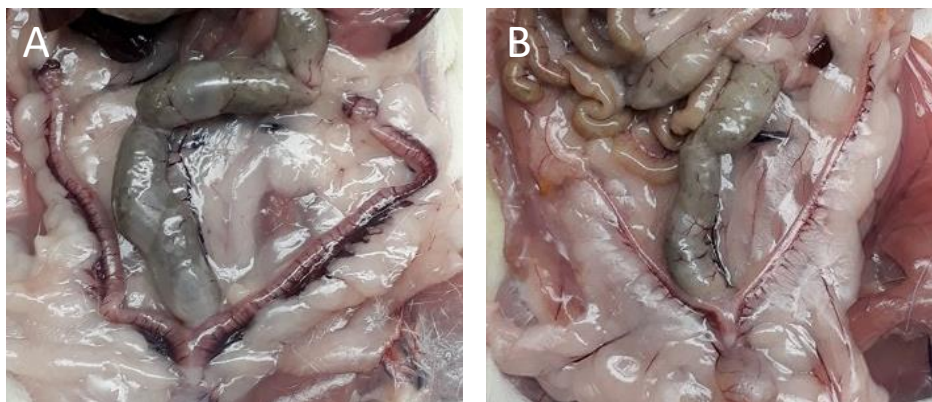


Figura 7. Cornos uterinos de ratas controles (A) de ratas ovariectomizadas. Arquivo Pessoal.

5.2. PROLIFERAÇÃO CELULAR

Ao final de 7 dias, a proliferação celular foi maior nos grupos ovariectomizados (OVX), em destaque o grupo sem administração de licopeno. Após administração de 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ de licopeno houve a queda da proliferação celular. O mesmo foi observado nos grupos controles (Sham), com maior proliferação no grupo Sham e após administração 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ de licopeno observou-se uma queda significativa da proliferação celular, sem diferença estatística entre os grupos Sham_{L10} e Sham_{L30}. No período experimental de 10 dias os grupos OVX e OVX₁₀ apresentaram maior proliferação, não havendo diferença estatística entre ambos. O grupo OVX₃₀ mostrou uma queda da proliferação em relação aos demais grupos ovariectomizados. Os grupos controles Sham, Sham_{L10} e Sham_{L30} não apresentaram diferença estatística, porém houve menor proliferação comparado aos grupos OVX. Aos 14 dias, o grupo OVX continuou com maior proliferação. Os grupos OVX_{L10} e OVX_{L30} não apresentaram diferença estatística entre ambos. Nos grupos controles, houve maior proliferação no grupo SHAM, ao passo que nos grupos Sham_{L10} e Sham_{L30} não houve diferença estatística entre eles.

5.3. DETECÇÃO IN SITU DE FOSFATASE ALCALINA (ALP)

No período de 7 e 10 dias houve maior detecção da fosfatase alcalina in situ no grupo OVX sem presença de licopeno. Os grupos OVX₁₀ e OVX₃₀ não apresentaram diferença estatística. O mesmo ocorreu entre grupos SHAM, Sham_{L10} e Sham_{L30}, com menor detecção in situ quando comparado aos grupos OVX. Aos 14 dias, o grupo OVX mostrou aumento significativo na detecção in situ de ALP quando comparado aos grupos OVX_{L10} e OVX_{L30}, os quais não apresentaram diferença estatística entre si. O mesmo padrão foi observado nos grupos controles SHAM, SHAM_{L10} e SHAM_{L30}, porém com diminuição significativa na detecção in situ de ALP quando comparados aos grupos OVX.

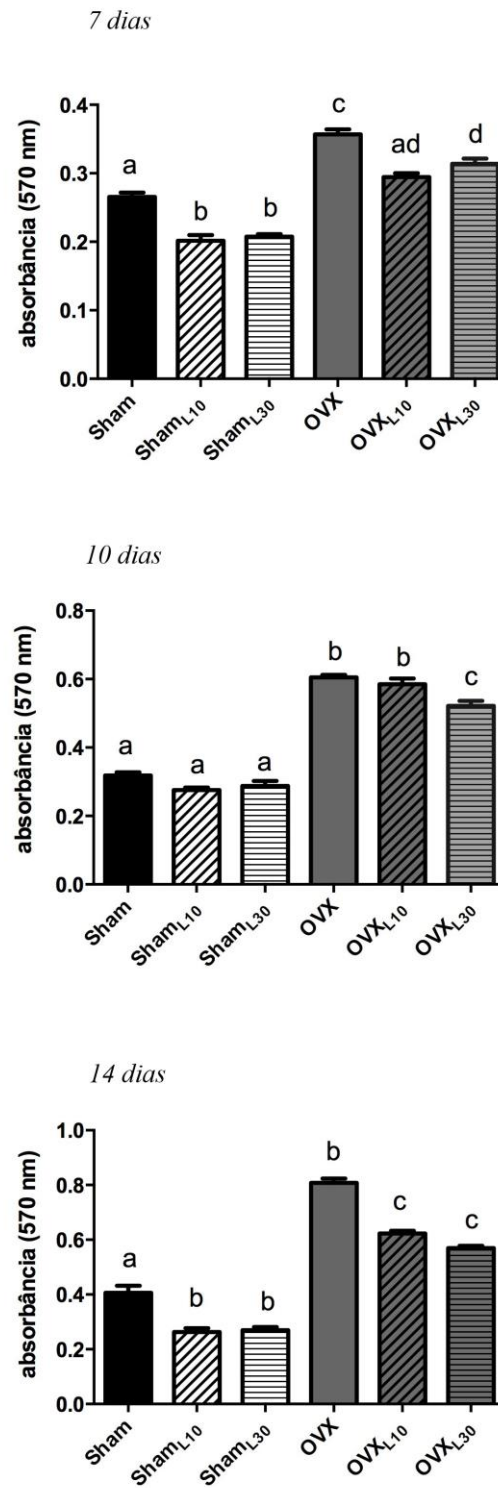


Figura 8 - Proliferação celular de células osteoblásticas provenientes da calvária de ratas controle (Sham) e ovariectomizadas (OVX) cultivadas em concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ de licopeno aos 7, 10 e 14 dias, avaliada por meio de ensaio colorimétrico (MTT). Teste estatístico One-way ANOVA para $p < 0,05$.

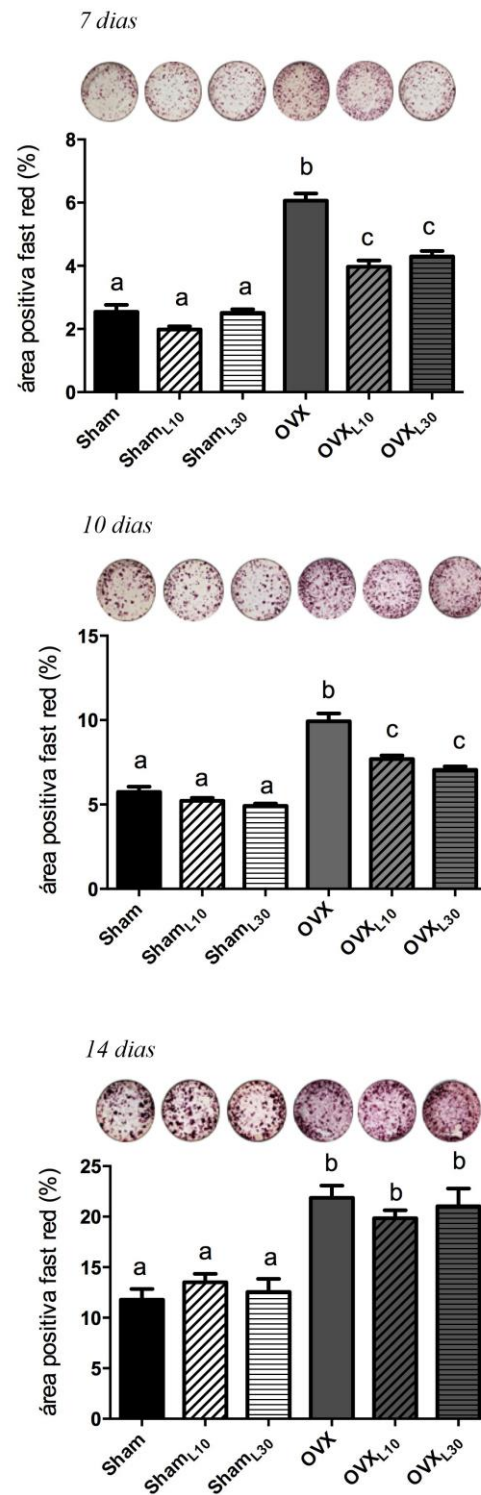


Figura 9 – Detecção in situ de fosfatase alcalina em células osteoblásticas provenientes da calvária de ratas controle (Sham) e ovariectomizadas (OVX) cultivadas em concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ de licopeno aos 7, 10 e 14 dias. Teste estatístico One-way ANOVA para $p < 0,05$.

5.4. FORMAÇÃO DA MATRIZ MINERALIZADA

A avaliação quantitativa dos nódulos mineralizados no período de 17 dias mostrou que no grupo OVX houve um aumento significativo na formação de nódulos em relação aos demais grupos. A administração do licopeno nas concentrações de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nos grupos OVX caracterizou similaridade na formação de nódulos quando comparado ao grupo controle com administração das mesmas quantidades de licopeno. Aos 21 dias, não houve diferença estatística na formação de nódulos mineralizados nos grupos SHAM, SHAM_{L10} e SHAM_{L30}. O grupo OVX obteve com maior formação de nódulos. O grupo OVX_{L10} mostrou aumento significativo na formação de nódulos em relação aos grupo OVX_{L30}.

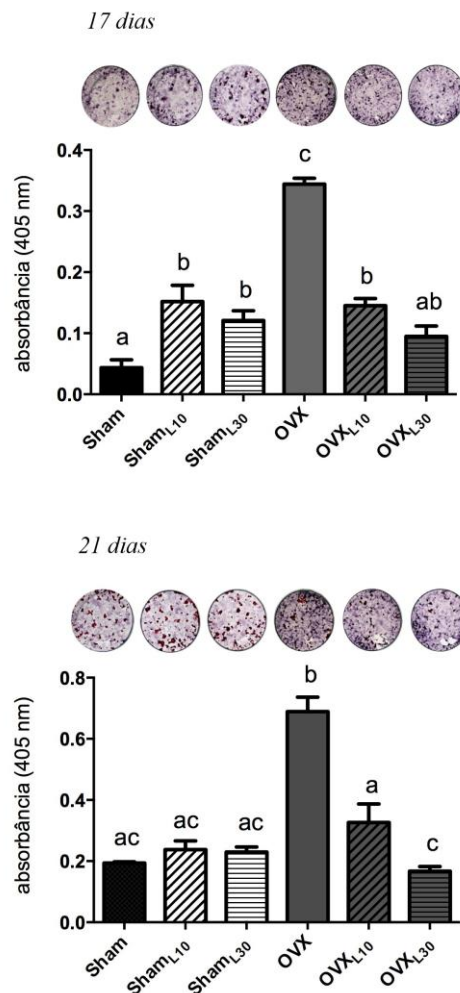


Figura 10- Quantificação de nódulos mineralizados de células osteoblásticas da medula óssea de ratas controle (Sham) e ovariectomizadas (OVX) e com adição de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de licopeno, aos 17 e 21 dias por meio da extração de vermelho de alizarina. Teste estatístico One-way ANOVA para $p < 0,05$.

5.5. EXPRESSÃO GÊNICA QUANTITATIVA

No período de 10 dias, a expressão dos genes *Bglap* e *Opn* não mostrou diferenças significativas entre os grupos sham e entre os grupos ovariectomizados. Por outro lado, houve uma indução significativa com a administração do licopeno na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$ (SHAM_{30}) comparado com o grupo OVX_{L10} . A expressão do gene *Alp* foi induzida no grupo SHAM_{L30} quando comparada aos outros grupos experimentais. Entre os grupos OVX, houve uma repressão deste gene no grupo OVX_{L10} . A expressão do gene *Runx2* foi maior em SHAM_{L30} quando comparado aos grupos SHAM_{L10} , OVX e OVX_{L30} .

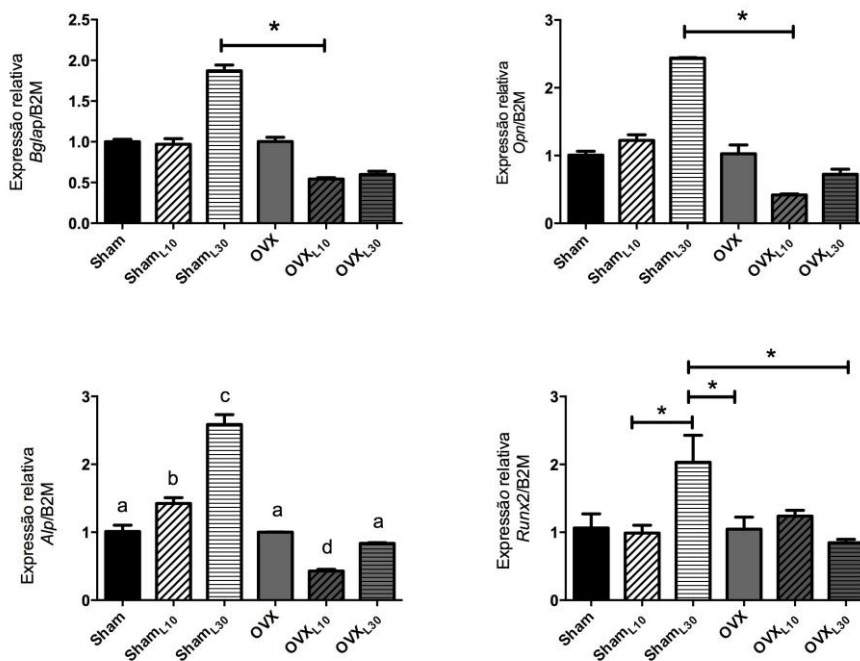


Figura 11- Análise da expressão gênica em células obtidas da medula óssea de calvária ratas controle (Sham) e ovariectomizada (OVX) e com adição de licopeno em 10 $\mu\text{g/ml}$ e 30 $\mu\text{g/ml}$ aos 10 dias. Teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$.

5.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA

A região do defeito cirúrgico nos animais controles o ovariectomizados que receberam o scaffold com e sem licopeno apresentaram preenchimento parcial por tecido ósseo neoformado envolvido por tecido conjuntivo. Ambos os grupos apresentaram matriz neoformada ocupada por várias lacunas contendo osteócitos no seu interior, envolvida por fibras colágenas entremeadas por fibroblastos, adipócitos, e vasos sanguíneos, sem a presença de infiltrado inflamatório. O grupo OVX que recebeu o scaffold sem a associação com o licopeno mostrou menor formação de tecido ósseo neoformado adjacente ao osso lamelar, envolvido por tecido conjuntivo organizado com a presença de adipócitos. O grupo OVX com scaffold associado ao licopeno mostrou neoformação óssea similar aos grupos sham, com integração osso/scaffold sem a presença de cápsula fibrosa e formação de osteóide próximo ao scaffold (Figuras 12-13).

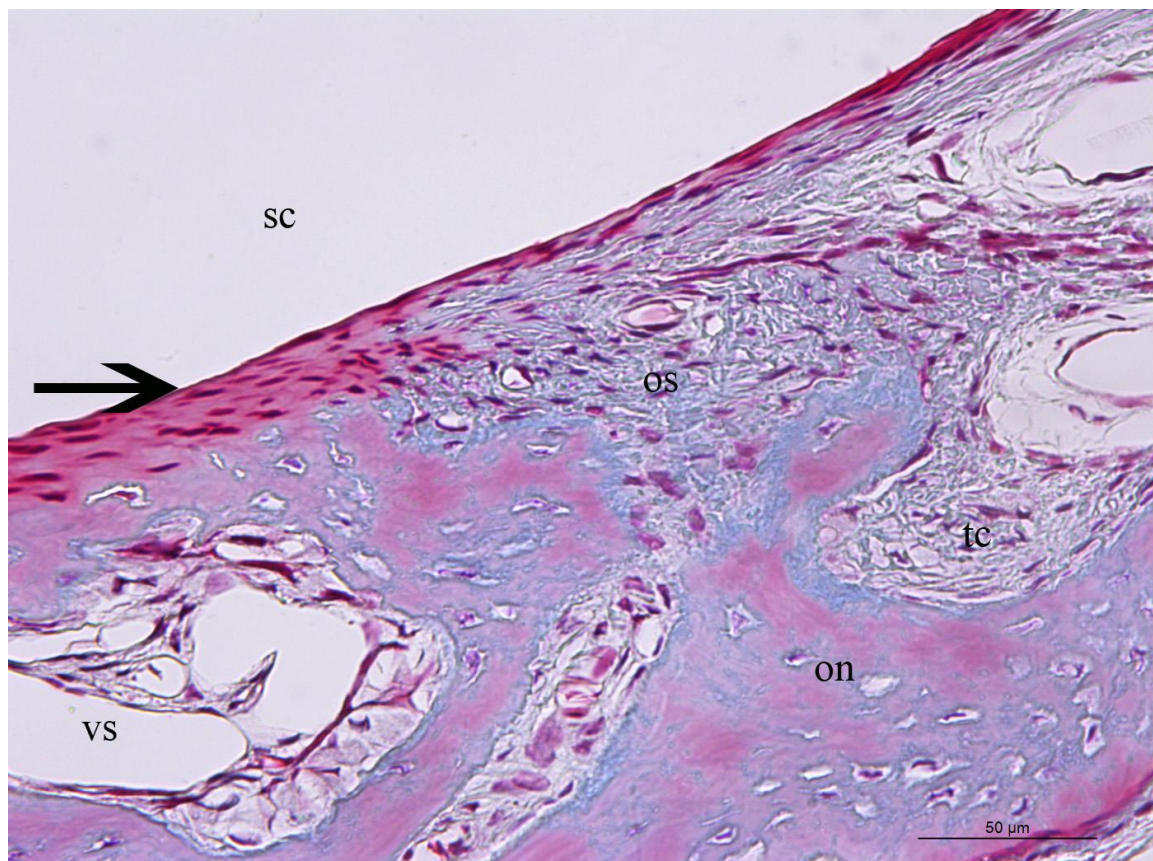


Figura 12. Interface (seta preta) do scaffold associado com licopeno (sc) e tecido ósseo em formação (os). Ainda podem ser observados tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Aumento de 40x, barra=50 µm.

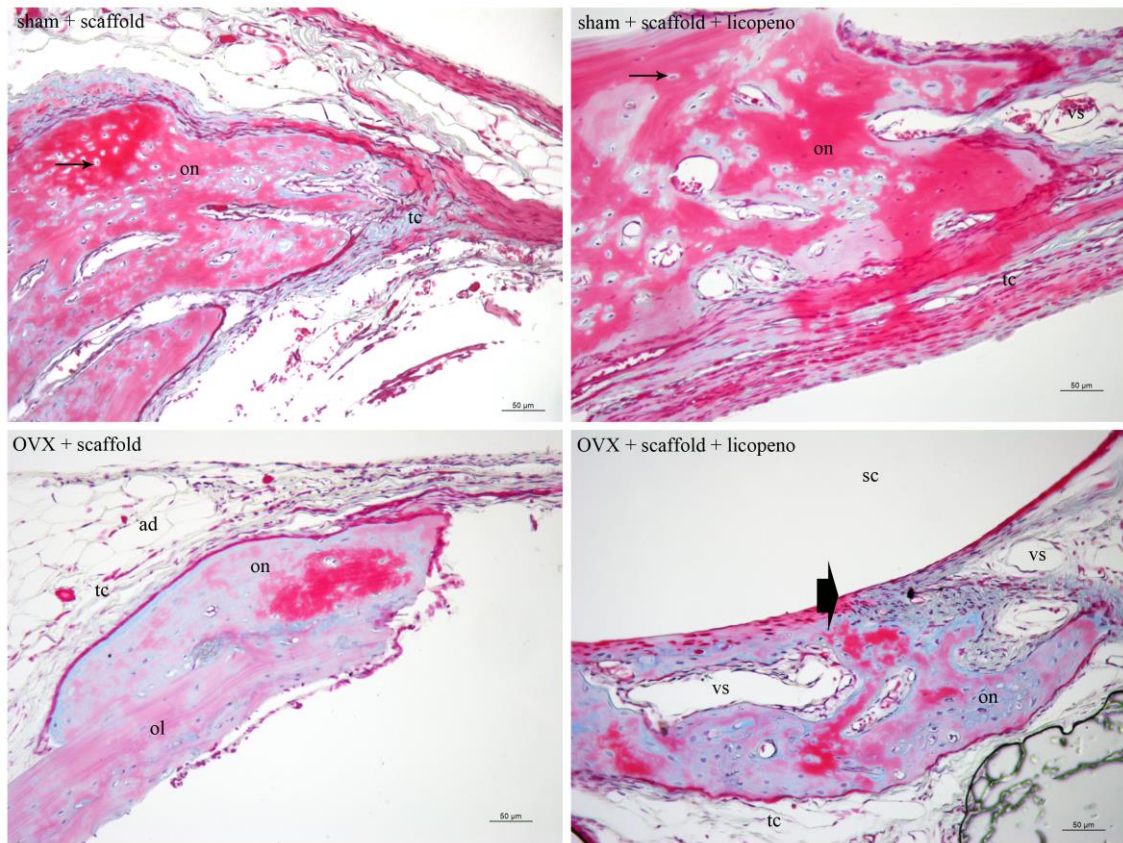


Figura 13- Imagens histológicas das bordas dos defeitos realizados nas calvárias de ratas sham e ovariectomizadas que receberam o scaffold associado ou não ao licopeno. Pode ser observada neoformação óssea em todos os grupos (on), presença de tecido conjuntivo sem infiltrado inflamatório (tc), osso lamelar (ol), vascularização (vs) e o scaffold em contato com tecido ósseo (seta preta) em formação (sc). Aumento de 40x, barra=50 µm.

6.DISCUSSÃO

Osteoporose é um distúrbio esquelético caracterizado pela redução da resistência óssea predispondo a um aumento do risco de fratura (Prentice et al., 2003). Várias linhas de pesquisa evidenciam que os compostos nutracêuticos podem prevenir a perda óssea, o que recentemente levou ao seu uso profilático aumentado, especialmente em mulheres na pós-menopausa (Wang et al., 2017; Martiniakova et al., 2020). Os carotenoides são mencionados principalmente em relação às suas propriedades antioxidantes (Mody et al., 2021). O estresse oxidativo favorece a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são capazes de diminuir a osteoblastogênese e aumentar a diferenciação e função dos osteoclastos (Shi et al., 2004; Basu et al., 2001; Nakanishi et al., 2013). Uma investigação europeia demonstrou que uma maior ingestão dietética de carotenoides melhora a DMO e reduz o risco de fraturas osteoporóticas (Hayhoe et al., 2017). Entre os carotenóides, o licopeno é relatado como tendo uma das maiores capacidades antioxidantes (Stahl et al., 2003). No entanto, até o momento, os efeitos do licopeno no metabolismo das células ósseas foram pouco estudados.

No presente estudo, examinamos o efeito *in vitro* e *in vivo* do licopeno no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas. A ovariectomia concerne na remoção dos ovários com a intenção de diminuir os níveis de hormônios estrogênicos, resultando na simulação da osteoporose pós-menopausa nas ratas (Wronski et al., 1988). O modelo utilizado para se obter ratas ovariectomizadas (OVX) foi aprovado pelo FDA como eficaz para o estudo da osteoporose pós-menopausa, mimetizando a perda óssea pós-menopausa quando examinada em períodos curtos de tempo (Thompson et al., 1995). Analisando esfregaços vaginais das ratas após ovariectomia, observou-se predominância de leucócitos, caracterizando o estágio diestro do ciclo das ratas, confirmando o sucesso da ovariectomia. O período diestro gera uma como diminuição substancial no número de células epiteliais queratinizadas anucleadas, obtendo como consequência período inativo de fertilidade (Cora et al., 2015). O exame macroscópico observou a atrofia dos cornos uterinos das ratas ovariectomizadas quando comparado às ratas controles. Segundo dados da literatura, o útero de mulheres no período pós-menopausa pode reverter para tamanhos pediátricos (Miller et al., 1977).

A primeira hipótese deste estudo foi confirmada parcialmente, mostrando que o licopeno administrado *in vitro* em contato com células osteoblásticas da calvária de ratas saudáveis e ovariectomizadas influencia a atividade funcional destas células em alguns dos parâmetros analisados. O estudo *in vitro* foi realizado com a administração

do licopeno nas concentrações de 10 µg/mL e 30 µg/mL. As concentrações seguiram protocolos baseados na literatura (Zeng et al., 2017), sendo que estudos prévios realizados em nosso laboratório já haviam demonstrado que o licopeno tem influência na atividade funcional dos osteoblastos em concentrações mais baixas (Oliveira et al., 2019).

Na presente investigação, a proliferação celular e a detecção *in situ* de ALP nos três períodos estudados foi significativamente maior nos grupos de células de animais ovariectomizados quando comparado aos grupos de células controles, independente da presença de licopeno. A proliferação celular exacerbada de osteoblastos provenientes de animais com osteoporose já foi evidenciado anteriormente por Yu et al. (2012), que associam estes resultados a um maior metabolismo energético, especialmente na geração de adenosina trifosfato (ATP), que fornece energia para o crescimento, reparo e atividade dos osteoblastos. Os gráficos também permitem observar que as células dos grupos OVX, quando em contato com as duas concentrações de licopeno, apresentam uma diminuição significativa na proliferação celular e na detecção de ALP ao longo dos períodos de cultura, se aproximando dos valores dos grupos controles. O mesmo pode ser observado na formação de nódulos mineralizados, com o grupo OVX formando mais matriz e os grupos OVX_{L10} e OVX_{L30} apresentando valores similares aos controles. Estes resultados sugerem que a presença do licopeno nas duas concentrações pode influenciar na diminuição da proliferação celular e na formação de uma matriz mineralizada seguindo padrões de normalidade e resistência. Autores como Busse et al. (2009) encontraram maior conteúdo mineralizado em pacientes osteoporóticos, contudo o tecido ósseo apresentava baixas propriedades biomecânicas. O conteúdo mineralizado aumentado em pacientes osteoporóticos se forma de maneira não homogênea, tem maior risco de fratura por carga, menor resistência ao escoamento, falha e rigidez de flexão, tornando-se um osso frágil com comprometimento da estrutura devido a microfissuras, rachaduras e lacunas. Os mesmos autores relataram o tecido ósseo caracterizado como saudável com dependência linear dos parâmetros estruturais, propriedades biomecanicamente benéficas devido a uma configuração de mineralização homogênea. Resultado semelhante aos obtidos na presente pesquisa foi encontrado por Russo et al. (2020) em experimento com licopeno nas concentrações de 5 µg/ml e 10 µg/ml, onde o licopeno na concentração de 5 µg/ml não afetou a proliferação de células Saos-2 e na concentração de 10 µg/ml mostrou queda da proliferação osteoblástica.

Os genes *Bglap*, *Opn*, *Alp* e *Runx2* codificam proteínas que fazem parte do processo de remodelação, influenciando a atividade das células ósseas (Ducy et al., 1996). A osteocalcina (*Bglap*) é especificamente expressa em osteoblastos e é uma das proteínas não colágenas mais abundantes no osso (Hauschka et al., 1975), apresentando papel importante no processo de mineralização óssea (Hauschka et al., 1980; Menanteau et al., 1982). Segundo Ducy et al. (1996), a *Bglap* é uma proteína da matriz óssea que pode estimular e inibir a remodelação óssea. Já a osteopontina (*OPN*) é uma proteína que atua de forma importante na renovação óssea ativando a cascata de reabsorção (Reinohlt et al., 1990). Franzén et al. (2007) sugerem que a *OPN* desempenhe papéis no desenvolvimento e na atividade dos osteoclastos, além de atuar na adesão celular e durante a mineralização da matriz. No presente estudo, a administração de 30 µg/mL de licopeno influenciou a modulação dos genes *Bglap* e *Opn* no grupo controle, sugerindo que o licopeno atue na expressão destes dois genes em células de indivíduos saudáveis, influenciando na diferenciação celular e osteogênese.

O *Runx2* é um fator de transcrição que pertence à família *Runx* composta por *Runx1*, *Runx2* e *Runx3*. O *Runx2* é expresso em células mesenquimais multipotentes, células da linhagem de osteoblastos e condrócitos (Komori et al., 2019), sendo um fator fundamental de transcrição para a diferenciação e ativação dos osteoblastos maduros (Adhami et al., 2014). Já a fosfatase alcalina é uma proteína vinculada à regulação da formação óssea, facilmente encontrada nos tecidos ósseos e cartilagens calcificantes (Siller et al., 2018). Os genes que codificam estas proteínas apresentaram maior expressão com a administração de licopeno nos grupos controles, quando comparado aos grupos OVX. Estes resultados sugerem que o licopeno possa influenciar a modulação gênica em uma fase de diferenciação e início de formação de matriz extracelular em células saudáveis, podendo acontecer em períodos mais tardios nas células afetadas pela condição osteoporótica. Assim, outros períodos experimentais devem ser estudados para observar a possível modulação gênica com a administração do licopeno.

A segunda hipótese construída neste estudo pôde ser comprovada por meio da análise histológica qualitativa, mostrando que a associação do scaffold com o licopeno permitiu a neoformação óssea nas bordas do defeito criado na calvária, além de permitir uma integração com a nova matriz sendo formada. A inserção do scaffold com ou sem o licopeno não levou à formação de infiltrado inflamatório, confirmando a ausência de toxicidade do material, assim como a biocompatibilidade. Não existem na literatura até

o momento relatos de associação de scaffold com o licopeno, mas alguns autores pesquisaram a associação de scaffold de polímeros com outras substâncias consideradas antioxidantes, mostrando seus benefícios no reparo ósseo. Bose et al. (2018) verificaram que a associação da curcumina à scaffold de polímeros como PCL, PEG e PGLA promoveu neoformação óssea significativa no defeito femoral de ratos Sprague-Dawley. Li et al. (2018) também observaram que scaffolds em microsferas de PLGA associado à curcumina promoveram maior formação óssea no defeito de calvária de ratos machos Sprague-Dawley com diabetes tipo 2 induzida por medicamentos.

Existem algumas limitações deste estudo, em relação à investigação dos modelos in vitro e in vivo de neoformação óssea. A expressão gênica foi estudada em somente um período de cultura celular (10 dias), dificultando a interpretação dos resultados em relação à proliferação, diferenciação e formação de matriz mineralizada associada à modulação dos genes selecionados. Além disso, a análise histológica realizada foi qualitativa, sem a quantificação de área ou porcentagem de osso neoformado, o que poderia contribuir para a confirmação dos resultados. Muitos fragmentos restantes dos scaffold não puderam ser mantidos nas secções histológicas, dificultando a observação de integração com o osso neoformado. Assim, futuros experimentos devem ser programados pelo nosso grupo de pesquisa para sanar estas deficiências. Ainda assim, os resultados indicam os benefícios da associação do licopeno à scaffolds biodegradáveis, sugerindo que mais estudos sejam feitos nesta área para uma aplicação mais abrangentes em situações de dificuldade de reparo ósseo, como acontece na osteoporose e outras doenças ósseas metabólicas.

7. CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que:

1) a administração *in vitro* do licopeno:

- diminuiu a proliferação celular em células de ratas saudáveis e ovariectomizadas nas concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$, principalmente aos 7 e 14 dias;
- não mudou a detecção de fosfatase alcalina em células de ratas saudáveis e diminuiu a mesma significativamente nas concentrações de 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$ em células de ratas ovariectomizadas, chegando a valores similares aos grupos controles, aos 7 e 10 dias;
- aumentou a mineralização aos 17 dias nas células de ratas saudáveis e diminuiu a mesma em células de ratas ovariectomizadas aos 17 e 21 dias, chegando a valores similares aos controles.
- a expressão dos genes foi maior no grupo em células de ratas saudáveis que receberam o licopeno na concentração de 30 $\mu\text{g/ml}$.

2) a incorporação do licopeno aos scaffolds de PLLA:

- permitiu a neoformação óssea a partir das bordas do defeito na calvária de ratas saudáveis e ovariectomizadas, independente da presença ou não do licopeno.
- permitiu neoformação óssea qualitativamente maior no grupo ovariectomizado que recebeu o scaffold PLLA/Licopeno quando comparado ao grupo OVX que recebeu somente o scaffold de PLLA.
- permitiu a osseointegração do tecido ósseo neoformado com o scaffold de PLLA.

Estes dados sugerem que o licopeno pode influenciar positivamente o metabolismo ósseo em situação de osteoporose ou tecido ósseo saudável, mostrando potencial promissor no tratamento da osteoporose pós-menopausa e sua incorporação em scaffolds para auxiliar o reparo ósseo.

8. REFERÊNCIAS

1. Adhami MD, Rashid H, Chen H, Javed A. Runx2 activity in committed osteoblasts is not essential for embryonic skeletogenesis. *Connect Tissue Res.* 2014. 1(0 1):102-6.
2. Amini A, Laurencin C, Nukavarapu S. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Review in Biomedical Engineering* 2012 40: 363- 408.
3. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 288:275–279.
4. Ferrari HAB, Willett WC, Wong JB, Giovannucci E, Dietrich T, Hughes BD. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 2005 293(18):2257-64.
5. Bose S, Sarkar N, Banerjee D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. *Mater Today Chem.* 2018;8:110-120.
6. Busse B. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: Mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone.* Volume 45. 2009. Pages 1034-1043.
7. Gordon MC, Khan WS. Advances in the use of stem cells and tissue engineering applications in bone repair. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012 7: 122–126.
8. Clinton SK. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutrition Reviews.* 1998 56(2):31-5.
9. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology.* 2015;43(6):776-793.
10. Cosman F, de Beur S J, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2014 25(10):2359–2381.
11. Danowski JS. Osteoporose conceito, classificação e clínica. *ARS CVRANDI Clínica Médica* 1996 29: 21.
12. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Gerald P, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382, 448–452 (1996).
13. Duque G, Troen BR. Compreendendo os mecanismos da osteoporose senil: Novos fatos para uma síndrome geriátrica importante. *Geriatr. Soc.* 2008; 56 : 935–941.

14. Poly (ϵ -caprolactone)/ engineering: in vitro degradation and biocompatibility study. *J Mater Sci Mater Med* 2012 23:763-70.
15. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 1999 282: 637-645.
16. Franzén A, Reinholt F, Hultenby K, Onnerfjord P. Altered osteoclast development and function in osteopontin deficient mice. *Journal of Orthopaedic Research* 26(5):721-8.
17. Giavaresi G, Tschon M, Borsari V, Daly JH, Liggat JJ, Fini M, Bonazzi V, Nicolini A, Carpi A, Morra M, Cassinelli C, Giardino R. New polymers for drug delivery systems in orthopaedics: in vivo biocompatibility evaluation. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2004 58: 411–417.
18. Gregory CA, Gunn WG, Peister A. An Alizarin red-based assay of Ca^{2+} mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem* 2004 329(1):77-84.
19. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975. 72(10):3925-9.
20. Hauschka PV, Reddi AH. Correlation of the appearance of gamma-carboxyglutamic acid with the onset of mineralization in developing endochondral bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980. 92 (3): 1037-41.
21. Hayhoe RPG, Lentjes MAH, Mulligan AA, Luben RN, Khaw KT, Welch AA. Carotenoid dietary intakes and plasma concentrations are associated with heel bone ultrasound attenuation and osteoporotic fracture risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. *Br J Nutr.* 2017 May;117(10):1439-1453.
22. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CX, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 1(4):245-60.

23. Islami M, Mortazavi Y, Soleimani M, Nadri S. In vitro expansion of CD 133+ cells derived from umbilical Cordblood in poly-L-lactic acid (PLLA) scaffold coated with fibronectin and collagen. *Artif Cells Nano Biotechnol* 2018. 46(5):1025-1033. 23.
24. Kanis JA, Svedbom A, Harvey N, McCloskey EV. The osteoporosis treatment gap. *J Bone Miner Res*. 2014; 29 (9): 1926–1928.
25. Khan M, Cheung AM, Khan AA. Drug-related adverse events of osteoporosis 22 therapy. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2017 46(1):181–92.
26. Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *Int J Mol Sci*. 2019. 20 (7): 1694.
27. Kuo T R, Chen C H. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent development and future perspectives. *Biomark Res*. 2017. (5):18.
28. Li Y, Zhang ZZ. Sustained curcumin release from PLGA microspheres improves bone formation under diabetic conditions by inhibiting the reactive oxygen species production. *Drug Des Devel Ther*. 2018. 12:1453-1466.
29. Liao S, Cui F, Zhang W, Feng Q. Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004. 69:158-65.
30. Martiniakova M, Babikova M, Omelka R. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. *J Physiol Pharmacol*. 2020. 71(3).
31. Menanteau J, Neuman WF, Neuman MW. A study of bone proteins which can prevent hydroxyapatite formation. *Metab. Bone Dis. Relat. Res*. 1982. 4(2):157-62.
32. Messori MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim RC, Furlaneto FA, de Melo LG, Fucini SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet rich plasma: A histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of Periodontal Research*. 2008. 43(2), 217– 223.
33. Miller EI, Roger TH, Patricia L, RDMS. The atrophic postmenopausal uterus. *Jornal of Clinical Ultrasound*. 1977. 5(4):261-3.
34. Miller P. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fracture. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006. 7:75-89.
35. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Radic Biol Med*. 2001. 31:509–519.

36. Nakanishi MH, Iitsuka N, Tsukamoto I. A crucial role for reactive oxygen species in macrophage colony-stimulating factor-induced RANK expression in osteoclastic differentiation. *Int J Mol Med*, 31. 2013. 874-880.
37. Oliveira GR, Vargas-Sanchez PK, Fernandes RR, Ricolde MST, Semeghini MS, Pitol DM, Sousa LG, Siessere S, Prado KFB. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2019. 37, 658–667.
38. Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON. Evaluation of oxidative stress after fractures: a preliminar study. *Acta Orthop Belg*. 2003. 69:546–551.
39. Prentice A, Bonjour JP, Branca F, Cooper C, Flynn A, Garabedian M, Müller D, Pannemans D, Weber P. Bone health and osteoporosis. *Eur J Nutr*. 2015: I/28–I/49.
40. Rao RR., Stegemann JP. Cell-Based Approaches to the Engineering of Vascularized Bone Tissue. *Cytotherapy*. 2013. 15: 1309–1322.
39. Reid IR. Cornish J. Epidemiology and pathogenesis of osteonecrosis of the jaw. *Nat Rev Rheumatol*. 2011. 29 8(2):90-6.
40. Reinholt F, Hulthenby K, Oldberg A. Osteopontin possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1990. (12):4473-5.
41. Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ, Riggs BL. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med* 1984 (311):1273-5.
42. Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, Giusti A, Malavolta N, Minisola S, Osella G, Pedrazzoni M, Sinigaglia L, Viapiana O, Isaia GC. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. *Reumatismo*. 2016 68(01):1–39.
43. Russo C., Ferro Y., Maurotti S., Salvati M.A., Mazza E., Pujia R., Terracciano R., Maggisano G., Mare R., Giannini S., et al. Lycopene and bone: An in vitro investigation and a pilot prospective clinical study. *J. Transl. Med*. 2020. 18 (1): 43.
44. Shea B, Wells G, Cranney A, Zytaruk N, Robinson V, Griffith L, Hamel C, Ortiz Z, Peterson J, Adachi J, Tugwell P, Guyatt G. Calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *The Cochrane Library*, Oxford, Issue 1; 2004. (1):CD004526.

45. Shi J, Qu Q, Kakuda Y, Yeung D, Jiang Y. Stability and synergistic effect of antioxidative properties of lycopene and other active components. *Cri Rev Food Sci Nut.* 2004. 44:559–73.
46. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res.* 2018. 33 (2): 362-364.
47. Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kersch-Schindl K, Patsch J. Pathophysiology of osteoporosis. *Wien. Med. Wochenschr.* 2009; 159 : 230–234.
48. Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med.* 2003. 24:345– 351.
49. Szejnfeld VL. Osteoporose. *Rev Bras Med* 2004; 61(7): 417-28.
50. Szulc P, Bouxsein ML. Visão geral da osteoporose: Epidemiologia e manejo clínico. *Vertebr. Fract. Initiat. Recurso. Doc.* 2011; 1 : 1-65.
51. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone.* 1995;17:125S–133S.
52. Ukon Y, Makino T, Kodama J, Tsukazaki H, Tateiwa D, Yoshikawa H, Kaito T. Molecular-based treatment strategies for osteoporosis: a literature review. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):2557.
53. Wang T, Liu Q, Tjhi W, Zhao J, Lu A, Zhang G, Tan RX, Zhou M, Xu J, Feng HT. Therapeutic Potential and Outlook of Alternative Medicine for Osteoporosis. *Curr Drug Targets.* 2017;18(9):1051-1068.
54. Weisgerber DW, Erning K, Flanagan CL, Hollister SJ, Harley BAC. Evaluation of multi-scale mineralized collagen-polycaprolactone composites for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016 61:318–327
55. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S., Dawson-Hughes B. The recent prevalence of Osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the Femoral Neck or Lumbar Spine. *J. Bone Miner. Res.* 2014; 29 : 2520–2526.
56. Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 1988. 123(2):681-6.
57. Yu SJ, Liu HC, E LL, Wang DS, Zhu GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. *Experimental Biology and Medicine.* 2012. 237 (4): 395-406.

58. Zeng YC, Peng LS, Zou L, Huang SF, Xie Y, Mu GP, Zeng XH, Zhou XL, Zeng YC. Protective effect and mechanism of lycopene on endothelial progenitor cells (EPCs) from type 2 diabetes mellitus rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 92:86-94.

9.ANEXOS



Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
Divisão Brasileira da IADR


CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **AO0093 - INFLUÊNCIA DO LICOPENO NA ATIVIDADE FUNCIONAL DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS DA CALVÁRIA DE RATAS OVARIETOMIZADAS** de Alves GA*, Fernandes RR, Pitol DL, Ricoldi MST, Sousa LG, Siessere S, Prado KFB foi apresentado **na modalidade Apresentação Oral**

durante a 38ª Reunião Anual Virtual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
no período de 08 a 11 de Setembro de 2021




Paulo Francisco César
Presidente


Valentim Adelino Ricardo Barão
Vice-Presidente

CERTIFICATE CEUA – FORP/USP

We hereby certify that the project entitled “**Effect of lycopene on calvaria bone of ovariectomized rats: in vitro study of osteoblastic cells and in vivo study with PLLA/ lycopene scaffold implant in critical bone defects**” Protocol n° 2019.1.483.58.3 under the responsibility of Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 04/07/2019.

Duration of the Project	01/08/2019 a 01/08/2021
Species/Lineage	Heterogenic Rats / Wistar Hannover
Nº of animals	40
Weight / age	300g
Gender	Female
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo

Ribeirão Preto, July 4th, 2019.



Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação do efeito do licopeno no tecido ósseo da calvária de ratas ovariectomizadas: estudo in vitro em células osteoblásticas e in vivo com implante de scaffold de PLLA/licopeno em defeitos ósseos críticos**”, Protocolo nº 2019.1.483.58.3, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado– que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 04/07/2019.

Vigência do Projeto	01/08/2019 a 01/08/2021
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico / Wistar Hannover
Nº de animais	40
Peso/Idade	300g
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério Central – PUSP-RP

Ribeirão Preto, 04 de julho de 2019.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

