

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

LEONARDO RAPHAEL ZUARDI

**Efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre culturas de células
osteoblásticas crescidas sobre titânio com nanotopografia**



Ribeirão Preto– SP

2019

LEONARDO RAPHAEL ZUARDI

**Efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre culturas de células
osteoblásticas crescidas sobre titânio com nanotopografia**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zuardi, Leonardo Raphael

Efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre culturas de células osteoblásticas crescidas sobre titânio com nanotopografia. Ribeirão Preto, 2019.

129p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: de Oliveira, Paulo Tambasco

1. BMP-7 2. Osteoblasto 3. Titânio 4. Nanotopografia
5. Coágulo Sanguíneo

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEONARDO RAPHAEL ZUARDI

Efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre culturas de células osteoblásticas crescidas sobre titânio com nanotopografia

Tese apresentada à banca de defesa pública da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Biologia Oral

Aprovado em: _____/_____/2019

Banca examinadora:

Prof. Dr.: Paulo Tambasco de Oliveira

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico questo compendio ai miei parenti, specialmente i miei genitori, che mi hanno sempre sostenuto in questo sforzo. Questo è il frutto dell'amore, dell'educazione e del rispetto per le persone.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que me deram base, amor e me educaram para aceitar as contrariedades das pessoas, as quais enfrentei pelos caminhos da vida. São prova viva da benevolência da espiritualidade superior na concessão de alegrias que em muito excedem o meu merecimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, que me aceitou em seu grupo de pesquisa; ensinou-me, na convivência destes quatro anos, sobre o que é ser pesquisador. O meu muito obrigado pela dedicação, solicitude e confiança.

Ao Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego, por ter me recebido na Fundação Hemocentro, FMRP-USP.

Aos meus colegas, que me nortearam neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Básica e Oral e do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Periodontia, FORP-USP, em especial a Roger Rodrigo Fernandes e Fabíola Singaretti de Oliveira.

Aos funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, FMRP-USP, em especial a Cleide Lúcia Araújo Silva.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, FMRP-USP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, na forma de bolsa de Doutorado (processo 1569214), com vigência de outubro de 2015 a outubro de 2018.

“A Ciência vê alargar-se sem cessar o seu campo de exploração. Todos os dias, com a ajuda de seus poderosos instrumentos de observação e de análise, ela descobre novos aspectos da matéria, da força e da vida; mas o que ela constata o espírito já havia percebido há muito tempo, pois o vôo do pensamento está sempre adiante e supera os meios de ação da ciência positiva. Os instrumentos não seriam nada sem a inteligência, sem a vontade que os dirige.”

Léon Denis

RESUMO

Zuardi, L. R. **Efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre culturas de células osteoblásticas crescidas sobre titânio com nanotopografia.** Ribeirão Preto, 2019. 127p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A disponibilização de moléculas bioativas em superfícies de implantes metálicos osseointegráveis objetiva promover a formação óssea na região interfacial durante o processo de reparo, especialmente em sítios anatômicos com baixa densidade óssea. Entre os diferentes aspectos físico-químicos de superfícies de titânio (Ti), a nanotopografia obtida por H₂SO₄ e H₂O₂ (Nano-Ti) constitui-se em opção importante para esta finalidade, pelos benefícios que proporciona à formação óssea. Apesar de a proteína óssea morfogenética 7 (BMP-7) ser reconhecida como estimuladora da diferenciação osteoblástica, são ainda contraditórios os efeitos de sua disponibilização sobre a aquisição do fenótipo osteogênico em contato com Ti. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos 1) da suplementação de BMP-7 ao meio de cultura sobre parâmetros chaves de sinalização/diferenciação celulares durante a fase proliferativa de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 e UMR-106 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti (Estudo 1), e 2) da funcionalização de BMP-7 em Nano-Ti sobre a sinalização/diferenciação de células MC3T3-E1 crescidas em contato com coágulo sanguíneo *ex vivo*, formado previamente por implantação subcutânea de Nano-Ti em camundongos (Estudo 2). No Estudo 1, células MC3T3-E1 sobre Ti Controle e Nano-Ti apresentaram responsabilidades distintas à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. Enquanto que efeitos osteogênicos significativos foram observados sobre Ti Controle em relação à proliferação celular, expressão de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Opn*, *Smad 1* e atividade de ALP *in situ*, sobre Nano-Ti esses efeitos se limitavam ao aumento da expressão de *Alp*, *Bsp*, *Opn* e atividade de ALP *in situ*, majoritariamente já com 40 ng/mL de BMP-7. Essa concentração mantinha inalterado o potencial osteogênico de culturas UMR-106, enquanto que a de 200 ng/mL o reduzia. No Estudo 2, a presença do coágulo sanguíneo sobre Nano-Ti inibiu a expressão de marcadores osteoblásticos em células MC3T3-E1, com exceção para *Opn*, mantendo inalteradas as de *Smad 1* e *Smad 4*. A funcionalização com BMP-7, por simples adsorção de solução a 400 ng/mL, resultou em tendência à maior diferenciação osteoblástica sobre o coágulo sanguíneo, mas em menor grau em comparação ao de culturas crescidas diretamente sobre Nano-Ti, o que foi corroborado pela quantificação de RUNX2, sem, no entanto, alterar a expressão das *Smads* avaliadas. Quantidades menores de OPN, SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e SMAD 4 foram detectadas em culturas expostas à BMP-7, com exceção para OPN naquelas crescidas diretamente sobre Nano-Ti. A forma clivada de OPN e bandas de menor peso molecular reconhecidas pelos anticorpos anti-SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e anti-SMAD 4 foram observadas apenas na presença de coágulo sanguíneo. Em conclusão, a disponibilização de BMP-7 para células MC3T3-E1 nas concentrações de 40 ng/mL e 200 ng/mL altera o perfil de expressão de marcadores osteoblásticos, indicativo da aquisição de um estágio mais avançado de diferenciação celular, com efeitos mais pronunciados para Ti Controle, entretanto sem refletir em aumento da produção de matriz mineralizada por células UMR-106. A presença de coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti reduz a diferenciação de células MC3T3-E1, com tendência à reversão para o estímulo à diferenciação osteoblástica com a funcionalização de BMP-7.

Palavras- Chave: 1. BMP-7 2. Osteoblasto 3. Titânio 4. Nanotopografia 5. Coágulo Sanguíneo

ABSTRACT

Zuardi, L.R. **Effects of availability of BMP-7 on osteoblastic cell cultures grown on a nanostructured titanium surface.** Ribeirão Preto, 2019. 127p. Doctoral thesis in Science– Ribeirão Preto Dental School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

The availability of bioactive molecules on osseointegrable, metallic implant surfaces aims at promoting bone formation in the interfacial area during tissue repair, mainly at anatomic sites with low bone density. Among the diverse physico-chemical features of titanium (Ti) surfaces, the nanotopography created by treatment with H₂SO₄ and H₂O₂ (Nano-Ti) can be a good candidate for that purpose, as it positively impacts bone formation. Although the bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) has been shown to be stimulatory for osteoblastic differentiation, the effects of its availability on the acquisition of the osteogenic phenotype on Ti are still contradictory. The present study aimed at evaluating 1) the effects of supplementation of the culture medium with BMP-7 on key parameters of cell signalling/differentiation during the proliferative phase of pre-osteoblastic MC3T3-E1 and UMR-106 cell cultures grown on Control Ti and Nano-Ti (Study 1), and 2) the effects of BMP-7 functionalization on key parameters of cell signalling/differentiation of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cell cultures grown in contact with *ex vivo* blood clot that was previously formed on Nano-Ti by means of subcutaneous implantation in mice (Study 2). The results of the Study 1 showed that MC3T3-E1 cells grown either on Control Ti or Nano-Ti exhibited distinct responsiveness to 40 ng/mL and 200 ng/mL BMP-7. Already with the lower concentration of BMP-7, significant osteogenic effects were noticed for Control Ti group in terms of cell proliferation, *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Opn*, and *Smad 1* mRNA expression and *in situ* ALP activity, while for Nano-Ti these were limited to higher *Alp*, *Bsp*, and *Opn* mRNA expression and *in situ* ALP activity. The osteogenic potential of UMR-106 cultures was maintained unaltered with 40 ng/mL BMP-7 and was reduced when cells were exposed to the 200 ng/mL concentration. The results of the Study 2 showed that the presence of blood clot inhibited the expression of the osteoblast markers by MC3T3-E1 cells, except for *Opn*, while unaffacting those of *Smad 1* and *Smad 4*. The surface functionalization of Nano-Ti, by simple adsorption using a solution of 400 ng/mL BMP-7, resulted in a tendency towards higher osteoblastic cell differentiation on blood clot, but in a lesser degree compared with that of the cultures grown directly on Nano-Ti- a finding that was corroborated by the quantification of RUNX2, while unaffacting the expression of *Smads 1* and *4*. Smaller quantities of OPN, phosphorylated SMAD 1, 5 and 9, and SMAD 4 were detected in cultures exposed to BMP-7, except for OPN in those grown directly on Nano-Ti. The cleaved form of OPN and bands with lower molecular weight recognized by the antibodies against phosphorylated SMAD 1, 5 and 9 and SMAD 4 were observed only in the presence of blood clot. In conclusion, the availability of BMP-7 to MC3T3-E1 cells at the concentrations used alters the expression profile of osteoblast markers, indicative of the acquisition of a more advanced stage of differentiation, more pronounced for Control Ti, but without reflecting in higher mineralized matrix production by UMR-106 cultures. The presence of an *ex vivo* blood clot on Nano-Ti reduces the differentiation of MC3T3-E1 cells, with a tendency to reversion towards osteoblastic differentiation with BMP-7 functionalization.

Keywords: 1. BMP-7 2. Osteoblast 3. Titanium 4. Nanotopography 5. Blood clot

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fluorescência direta de cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.58
- Figura 2** - Número de células, por campo microscópico, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.58
- Figura 3** - Imunomarcacão para Ki-67 (fluorescência vermelha) em cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL59
- Figura 4** - Proporção de células Ki-67 positivas, por campo microscópico, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....59
- Figura 5** - Atividade de ALP *in situ* (fluorescência vermelha), pelo método do Fast Red, em cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....60
- Figura 6** - Expressão de *Runx2*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....61
- Figura 7** - Expressão de *Osx*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....61
- Figura 8** - Expressão de *Alp*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....62
- Figura 9** - Expressão de *Bsp*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....62
- Figura 10** - Expressão de *Opn*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....63
- Figura 11** - Expressão de *Smad 1*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL.....63

Figura 12 - Western Blot para detecção e quantificação de OPN, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	65
Figura 13 - Western Blot para detecção e quantificação do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	66
Figura 14 - Aspectos macroscópicos e quantificação de formações de matriz mineralizada de culturas de células UMR-106 em 7 dias, coradas por vermelho de Alizarina.	67
Figura 15 - Epifluorescência de discos de titânio com nanotopografia (Nano-Ti). ...	69
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de discos de titânio com nanotopografia (Nano-Ti).....	70
Figura 17 - Expressão de <i>Runx2</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	71
Figura 18 - Expressão de <i>Osx</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	72
Figura 19 - Expressão de <i>Alp</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	72
Figura 20 - Expressão de <i>Bsp</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	73
Figura 21 - Expressão de <i>Oc</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	73
Figura 22 - Expressão de <i>Opn</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	74
Figura 23 - Expressão de <i>Smad 1</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	74
Figura 24 - Expressão de <i>Smad 4</i> , normalizada em relação a <i>Gapdh</i>	75
Figura 25 - Western Blot para detecção e quantificação de RUNX2, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	76
Figura 26 - Western Blot para detecção e quantificação de OPN, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	77
Figura 27 - Western Blot para detecção e quantificação do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	78
Figura 28 - Western Blot para detecção e quantificação de SMAD 4, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF).	79
Figura 29 - Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de lamínulas de Thermanox®, em período de 48 h de cultura	115

Figura 30 - Cultura de células MC3T3-E1 na densidade de plaqueamento de 5×10^4 células/poço em discos de Ti Controle (A e B) e Nano-Ti (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 48 h (B e D).	116
Figura 31 - Integridade do RNA ribossômico.....	117
Figura 32 - Eletroferograma do gel de integridade do RNA ribossômico.....	117
Figura 33 - Escores de RIN para amostras	118
Figura 34 - Integridade do RNA ribossômico.....	119
Figura 35 - Eletroferograma do gel de integridade do RNA ribossômico.....	119
Figura 36 - Escores de RIN para amostras	120
Figura 37 - Imagem de MEV de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18 h pós-implantação no subcutâneo do dorso de camundongo da linhagem C57Bl/6, GFP positivo.....	121
Figura 38 - Imagens de MEV (A-E) e epifluorescência (F) de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18 h pós-implantação subcutânea no dorso de camundongos.....	122
Figura 39 - Imagens de MEV (A-E) e epifluorescência (F) de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18h pós-implantação subcutânea no dorso de camundongos.....	122
Figura 40 - Imagens de MEV de células MC3T3-E1 cultivadas por 48 h sobre coágulo sanguíneo <i>ex vivo</i> nos diferentes grupos experimentais	123
Figura 41 - Imagens de epifluorescência de células MC3T3-E1 (citoesqueleto de actina em vermelho) cultivadas por 48 h sobre coágulo sanguíneo <i>ex vivo</i> nos diferentes grupos experimentais	124
Figura 42 - Desenho técnico e modelo tridimensional da modificação do disco de Ti visando à retenção do coágulo sanguíneo e preservação de sua estrutura tridimensional sobre a superfície de Nano-Ti	127
Figura 43 - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP	128
Figura 44 - Adendo da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- %- Porcentagem
- µg- Micrograma
- µL- Microlitro
- µm- Micrometro
- ALP- Fosfatase alcalina
- A- Ampère
- ARS- Vermelho de Alizarina S
- BMP- Proteína óssea morfogenética
- BMP-7- Proteína óssea morfogenética 7 ou OP-1
- BSA- Albumina de soro bovino
- BSP- Sialoproteína óssea
- CD8⁺- Linfócito T citotóxico
- cDNA- DNA complementar
- cm³- Centímetro cúbico
- CO₂- Gás carbônico
- DEPC- Água tratada com dietil pirocarbonato
- D-MEM- Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
- DNA- Ácido desoxirribonucleico
- DTT- Ditioneitol
- EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EUA- Estados Unidos da América
- FDA- *Food and Drug Administration*
- FMRP- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- FORP- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
- g- Grama
- GAPDH- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GFP- Proteína verde fluorescente
- h- Hora
- H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄- Ácido sulfúrico
- IgG- Imunoglobulina G
- IP- Intraperitoneal
- kDa- Kilodalton
- L- Litro
- M- Molar
- MAP kinases- *Mitogen-activated protein kinases*
- MEC- Matriz extracelular
- MEV- Microscopia eletrônica de varredura
- mg- Miligrama
- mg/kg- Miligrama por kilograma
- mg/mL- Miligrama por mililitro
- min- Minuto

- mL- Mililitro
- mm- Milímetro
- mm²- Milímetro quadrado
- mM- Milimolar
- N- Normal
- Nano-Ti- Titânio com nanotopografia
- ng/mL- Nanograma por mililitro
- nm- Nanometro
- °C- Grau Celsius
- OC- Osteocalcina
- OP-1- *Osteogenic protein 1*
- OPN- Osteopontina
- OSX- Osterix
- PB- Tampão fosfato
- PBS- Tampão fosfato salino
- PCR- Reação em cadeia da polimerase
- PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas
- pH- Potencial hidrogeniônico
- PVDF- Fluoreto de polivinilideno
- PVPI- Povidona-Iodo
- RIN- Número de integridade do RNA
- RNA- Ácido ribonucleico
- RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro
- RPM- Rotação por minuto
- RUNX2- Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
- s- Segundo
- SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
- SMAD- *Small mothers against decapentaplegic*
- T.A.- Temperatura ambiente
- TBS-T- Tampão salino com Tris e Tween
- TGF-β- Fator de crescimento transformador beta
- Ti Controle- Titânio comercialmente puro
- Ti- Titânio
- V- Volt
- α-MEM- Meio Essencial Mínimo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 PROPOSIÇÃO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Estudo 1	39
3.1.1 Preparação das superfícies de Ti.....	41
3.1.2 Cultivo das linhagens celulares osteogênicas	41
3.1.3 Morfologia e proliferação celulares e atividade de ALP <i>in situ</i>	42
3.1.4 Análise da diferenciação osteoblástica por PCR em tempo real	43
3.1.5 Detecção de proteínas por Western Blot.....	44
3.1.6 Detecção de acúmulos de cálcio- formação de matriz mineralizada	46
3.2 Estudo 2	46
3.2.1 Funcionalização de BMP-7 em Nano-Ti.....	48
3.2.2 Cirurgia nos animais para obtenção de coágulo sanguíneo <i>ex vivo</i> sobre Nano-Ti.....	48
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	49
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Estudo 1	57
5.2 Estudo 2	68
6 DISCUSSÃO	83
6.1 Estudo 1	83
6.2 Estudo 2	86
7 CONCLUSÕES	93
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

9 APÊNDICES	115
APÊNDICE A - <i>Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de lamínulas de Thermanox®</i>	115
APÊNDICE B - <i>Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de titânio</i>	116
APÊNDICE C - <i>Integridade do RNA referente ao Estudo 1</i>	117
APÊNDICE D - <i>Integridade do RNA referente ao Estudo 2</i>	119
APÊNDICE E - <i>Aspectos morfológicos do coágulo sanguíneo ex vivo</i>	121
APÊNDICE F - <i>Viabilidade do transporte do coágulo sanguíneo ex vivo</i>	122
APÊNDICE G - <i>Cultura de células MC3T3-E1 em 48 h pós-plaqueamento nos diferentes grupos experimentais</i>	123
10 ANEXOS	127
ANEXO A - <i>Desenho técnico do disco de Ti com rebaixo circular plano</i>	127
ANEXO B - <i>Folha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP</i>	128

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Ainda que estudos em Implantodontia nas últimas décadas tenham proporcionado resultados clínicos satisfatórios com a reabilitação protética por meio de sofisticados sistemas de implantes, persistem desafios ao desenvolvimento desses sistemas, sobretudo visando à sua aplicação em pacientes com deficiências ósseas nos maxilares (SURMENEV et al., 2014; ROSA et al., 2014; KATO et al., 2014; AGGARWAL et al., 2016). Entre as características dos implantes osseointegráveis que podem afetar substancialmente o fenômeno de formação óssea na região interfacial estão a química, a energia e a topografia de superfície da estrutura metálica (BRUNSKI et al., 2000). Assim, um dos objetivos das pesquisas atuais está centrado em modificações nesses parâmetros que resultem, por exemplo, em maiores viabilidade, diferenciação e atividade de células da linhagem osteoblástica e em menores das de fibroblastos, consequentemente proporcionando maior formação óssea em sítios osteopênicos e/ou osteoporóticos pós-implantação (SURMENEV et al., 2014). Das estratégias utilizadas para essa finalidade, destacam-se as modificações bioquímicas da superfície dos implantes, com a disponibilização de moléculas bioativas (funcionalização de superfície), em geral estruturadas sobre micro e/ou nanotopografias, reconhecidamente mais favoráveis à osseointegração se comparadas a topografias planas nessas escalas (MORRA et al., 2007; JUNKER et al., 2009; BEUTNER et al., 2010; SHEKARAN; GARCIA, 2011; PEREIRA et al., 2013; TEJERO et al., 2014; SALOU et al., 2015; LI et al., 2019).

Estudos sobre a funcionalização de superfícies de implantes osseointegráveis têm avaliado, majoritariamente, a disponibilização de moléculas constitutivas da matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo, incluindo: 1) hidroxiapatita e colágeno do tipo I (MORRA et al., 2003; RAMMELT et al., 2004; SCHARNWEBER et al., 2004; MORRA et al., 2006; VAN DEN DOLDER; JANSEN, 2007; MEIRELLES et al., 2008; YANG et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2017; MARTINEZ et al., 2018; LI et al., 2018); 2) proteínas não-colágenas e fatores de crescimento (O'TOOLE et al., 2004; WIKESJÖ et al., 2008; SCHOUTEN et al., 2009; KASHIWAGI et al., 2009; SUSIN et al., 2010; HYZY et al., 2013; BARANOWSKI et al., 2016); e 3) peptídeos reconhecidamente bioativos (REZANIA et al., 1999; ROESSLER et al., 2001; TOSATTI et al., 2004; GARCIA; REYES, 2005; LUTZ et al., 2010; NAYAK et al., 2013; SEVILLA et al., 2016). Antibióticos, peptídeos

antimicrobianos e moléculas de origem vegetal, entre as quais os polifenóis, são também considerados para essa finalidade (revisto em FERRARIS et al., 2020). Uma vez que fatores de crescimento estimulam diferentes funções celulares e são liberados, endogenamente, durante o processo de reparo ósseo (ZAKY; CANCEDDA, 2009; BEUTNER et al., 2010; LIN et al., 2011), sua disponibilização exógena na superfície de implantes poderia trazer benefícios adicionais relevantes ao processo de osseointegração.

Constituintes da superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β), os fatores de crescimento do grupo das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) participam da regulação da formação de diversos órgãos e tecidos, incluindo cartilagem (YOON et al., 2004; CICIONE et al., 2014; PENG et al., 2019) e osso, durante o desenvolvimento embrionário, remodelação e reparo/regeneração (CHEN et al., 2004; DUNN et al., 2005; CHEN et al., 2012; MAURER et al., 2012). Os mecanismos de ação das BMPs resultam da interação com dois tipos de receptores transmembrana quinase serina-treonina (I e II) (LIN et al., 2016), formando um complexo BMP-receptores (LAVERY et al., 2008; WANG et al., 2014). Os receptores do tipo II são, então, fosforilados, ativando os receptores do tipo I, que irão desencadear as vias intracelulares, subdivididas em canônica e não-canônicas. A via canônica consiste na fosforilação do complexo SMAD 1, 5 e 9, formando heterodímeros com a SMAD 4, os quais são translocados para o núcleo para interagir com fatores de transcrição e regular a expressão de genes-alvo (CHANG et al., 2002; BRAGDON et al., 2011; WU et al., 2016; GOMEZ-PUERTO et al., 2019). Vias não-canônicas, não dependentes de SMADs, são ainda pouco compreendidas, e envolvem MAP Kinases (RETTING et al., 2009; CHEN et al., 2012; BROEGE et al., 2013). A modulação da sinalização de BMPs é um fenômeno complexo (WU et al., 2016), podendo ocorrer tanto pela adição da proteína como pela interferência na expressão de receptores, de moléculas de transdução de sinais (SMADs) e/ou pela ação de moléculas inibidoras (KAWABATA et al., 1998; SCHLIEPHAKE et al., 2005; LIU et al., 2007; KASHIWAGI et al., 2009; HYZY et al., 2013; TAN et al., 2013; LEE et al., 2014; KIM et al., 2014). Assim, a funcionalização de superfície de biomateriais com BMP exógena poderia, potencialmente, afetar a produção de BMP endógena pelas células, por um mecanismo de autorregulação ainda pouco conhecido (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015).

A BMP-7, também conhecida como proteína osteogênica-1 (OP-1), foi aprovada em 2001 pela FDA para utilização como alternativa ao enxerto autógeno na consolidação de fraturas de ossos longos (BENGLIS et al. 2008; BEGAM et al., 2017). Estudos têm demonstrado que a BMP-7 atua como modulador-chave da osteogênese, regeneração óssea (BEI et al., 2012; CECCHI et al., 2015) e condrogênese (KIM; IM, 2009; BROWN et al., 2014; CICIONE et al., 2014), com efeitos estimuladores sobre a regeneração óssea ao redor de dentes e implantes osseointegráveis (DUNN et al., 2005), em lesões de furca (GIANNOBILE et al., 1998) e em procedimentos de levantamento do seio maxilar (VAN DEN BERGH et al., 2000; HO et al., 2010). Em avaliação *in vitro* com BMP-7 suplementada ao meio, observou-se inibição da formação de osteoclastos a partir de cultura de monócitos (MAURER et al., 2012). Em outro estudo, com superfície de cromo-cobalto, a funcionalização de BMP-7 resultou em menor adesão e proliferação de fibroblastos, com redução da expressão de genes e proteínas associadas ao processo de fibrose (TAN et al., 2013); a redução de fibrose tecidual pela disponibilização de BMP-7 foi também observada no coração, fígado, rim e córnea (LONG et al., 2013; TAN et al., 2013; TANDON et al., 2013).

Por estes aspectos, seria lícito supor que a funcionalização de BMP-7 em superfície de implantes metálicos traria benefícios à neoformação óssea na interface osso-implante e, conseqüentemente, ao processo de osseointegração, o que, no entanto, é ainda controverso na literatura (TOGASHI et al., 2007, 2009; ZHANG et al., 2012; TAN et al., 2013; CIRANO et al., 2014). Com efeito, a disponibilização de BMP-7 até a concentração de 200 ng/mL estimula a diferenciação osteoblástica, enquanto que entre 200 e 400 ng/mL, inibe esse processo (ZHANG et al., 2012). Assim, e considerando que 1) distintas estratégias de disponibilização de moléculas na superfície de materiais metálicos podem alterar a sua bioatividade (BEUTNER et al., 2010; SOUZA et al., 2019) e 2) resultados prévios do nosso grupo de pesquisa sugerem que o maior potencial osteogênico *in vitro* ocorre quando células osteoblásticas interagem com superfícies funcionalizadas com moléculas bioativas por simples adsorção em comparação àquelas funcionalizadas por filmes *layer-by-layer* (BUENO et al., 2016), o método de simples adsorção constitui-se em estratégia adequada para avaliar os efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre o desenvolvimento do fenótipo osteogênico sobre superfícies de titânio (Ti).

Resultados de estudos *in vitro* permitem reconhecer que há benefícios para a diferenciação de fenótipos teciduais específicos quando em contato com biomateriais funcionalizados (LIU et al., 2007; KASHIWAGI et al., 2009; LAI et al., 2011; TAN et al., 2013; KIM et al., 2014; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015; LAI et al., 2017). Entretanto, a maioria dos estudos, senão a sua totalidade, não apresenta avaliações que incluam a formação de coágulo sanguíneo fisiológica, o que deve afetar os fenômenos de interação das células com a superfície do biomaterial e de sinalização celular via transdução de sinais e, conseqüentemente, o processo inicial de neoformação tecidual na região interfacial.

Com efeito, os primeiros elementos a interagirem com a superfície metálica imediatamente após a implantação em sítios ósseos são componentes do sangue extravasado (ANITUA et al., 2015), coagulado por ação das plaquetas. A formação do coágulo sanguíneo, além de interromper os fenômenos hemorrágicos, favorece o reparo ósseo, que ocorre por osteogênese de contato e à distância (DAVIES, 2003). Plaquetas ativadas fornecem superfícies fosfolipídicas para a associação e função de complexos enzimáticos imprescindíveis para a cascata de coagulação (BOUCHARD; TRACY, 2001; WATSON, 2009; ANITUA et al., 2015; TOMAIUOLO et al., 2017), cujo produto final é a formação das fibras de fibrina por meio da clivagem do fibrinogênio catalisada por trombina, com liberação dos fibrinopeptídeos A e B (DAVIES, 2003; RIEDEL et al., 2011); a quantidade de fibrinopeptídeo B é diretamente proporcional à de fibrina formada (RIEDEL et al., 2011). Proteínas plasmáticas e da MEC, incorporadas ao coágulo em formação, favorecem a adesão e migração de células pela rede de fibrina, controlam a dissolução do coágulo antes da formação do tecido de granulação e a remodelação óssea, com efeitos sobre as atividades osteoblástica e osteoclástica (SHIU et al., 2014).

Embora estudos na literatura apresentem métodos de simples adição de sangue sobre superfícies de biomateriais metálicos para a avaliação da formação de coágulo sanguíneo e suas interações com tais superfícies (MILLERET et al., 2011; OTA-TSUZUKI et al., 2011; HUANG et al., 2012; ORSINI et al., 2012; ANITUA et al., 2015; KOPF et al., 2015; SPEAR et al., 2015; YANG et al., 2016; LOLLOBRIGIDA et al., 2018; RAO et al., 2019), o modelo cirúrgico preconizado por Monroe & Hoffman (2012), se adaptado à implantação de biomateriais, constitui-se em método inédito e assegura a formação de coágulo sanguíneo fisiológica, resultando em rede espacial de fibrina sobre a qual, em estratégia *ex vivo*, as células osteoblásticas podem ser

cultivadas, o que permitiria análises futuras da interação entre superfícies de implantes, coágulo e células. Das superfícies de Ti que podem ser utilizadas para estudos de disponibilização de BMP-7 para células osteogênicas, aquelas nanoestruturadas merecem destaque, como as obtidas por condicionamento com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio (Nano-Ti), originalmente descritas por Nanci et al. (1998), considerando que 1) nanotopografias promovem o aumento da expressão do fenótipo osteogênico *in vitro* (ELIAS et al., 2002; PRICE et al., 2003; DE OLIVEIRA; NANCI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; LE GUEHENNEC et al., 2008; YAO et al., 2008; YANG et al., 2009; VETRONE et al., 2009; MENDONÇA et al., 2009, 2010; LORD et al., 2010); 2) tornam as células mais responsivas a BMPs, por mecanismos que envolvem a sinalização celular via integrinas (ROSA et al., 2014) e a inibição de microRNAs/aumento de SMADs citoplasmáticas (KATO et al., 2014); 3) favorecem a adsorção de proteínas do plasma e da MEC (BUENO et al., 2011); e 4) exibem alta hidrofiliabilidade (DE OLIVEIRA et al., 2007), com aumento da energia de superfície e, conseqüentemente, maior molhabilidade do material por fluidos biológicos, como o sangue. Superfícies altamente hidrofílicas afetam positivamente a resposta biológica ao implante nas fases iniciais do reparo, favorecendo a adsorção seletiva de proteínas, como a trombina, (ERIKSSON; NYGREN, 2001; ERIKSSON et al., 2004), além de estimular os fenômenos de adesão, proliferação e diferenciação celulares e a mineralização óssea (GITTENS et al., 2014).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre a progressão de culturas de células osteogênicas crescidas sobre superfície de Nano-Ti. Mais especificamente, foram avaliados os efeitos da suplementação de BMP-7 ao meio de cultura sobre parâmetros chaves de sinalização e diferenciação celulares durante a fase proliferativa de culturas de células pré-osteoblásticas crescidas diretamente sobre superfície de Nano-Ti (Estudo 1). Adicionalmente, avaliaram-se os efeitos da funcionalização de BMP-7 em Nano-Ti sobre parâmetros chaves da sinalização e diferenciação de células pré-osteoblásticas crescidas em contato com coágulo sanguíneo *ex vivo* formado previamente sobre esta superfície (Estudo 2).

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo 1

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, de camundongos (CRL-2594, ATCC, Manassas, VA, EUA), durante sua fase proliferativa, crescidas sobre superfícies de discos de Nano-Ti e Ti Controle (descritos em 3.1.1), perfazendo 5 dias de cultura. Nos tempos de 2 e 4 dias, suplementou-se o meio de cultura em dois grupos experimentais distintos nas concentrações de BMP-7 recombinante de camundongo (5666-BP, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de 40 e 200 ng/mL (ZHANG et al., 2012). No 5º dia, as culturas celulares foram submetidas a protocolos de fluorescência direta e imunofluorescência indireta para análise morfológica, de densidade e proliferação celulares, e quantificação de RNAm, por reação de cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, para os marcadores de diferenciação osteoblástica fator de transcrição relacionado ao *runt 2 (Runx2)*, osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), sialoproteína óssea (*Bsp*) e osteopontina (*Opn*), além de *Smad 1*, relacionada a vias de sinalização de BMP-7. No mesmo tempo, procedeu-se à detecção de OPN e do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, por Western Blot. Os grupos experimentais foram definidos como:

Controle 0: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Ti Controle sem BMP-7, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

Nano 0: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Nano-Ti sem BMP-7, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

Controle 40: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Ti Controle com BMP-7 na concentração de 40 ng/mL, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

Nano 40: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Nano-Ti com BMP-7 na concentração de 40 ng/mL, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

Controle 200: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Ti Controle com BMP-7 na concentração de 200 ng/mL, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

Nano 200: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Nano-Ti com BMP-7 na concentração de 200 ng/mL, no período de 5 dias (10 discos para morfologia, 16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot).

Células pré-osteoblásticas da linhagem UMR-106, de osteosarcoma de ratos (CRL-1661, ATCC), foram utilizadas para o ensaio de formação de matriz mineralizada em 7 dias de cultura, seguindo o mesmo protocolo de exposição à BMP-7 estabelecido para culturas MC3T3-E1. Os grupos experimentais foram definidos como:

Controle 0: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Ti Controle sem BMP-7, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina);

Nano 0: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Nano-Ti sem BMP-7, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina);

Controle 40: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Ti Controle com BMP-7 na concentração de 40 ng/mL, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina);

Nano 40: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Nano-Ti com BMP-7 na concentração de 40 ng/mL, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina);

Controle 200: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Ti Controle com BMP-7 na concentração de 200 ng/mL, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina);

Nano 200: Cultura de células UMR-106 sobre discos de Nano-Ti com BMP-7 na concentração de 200 ng/mL, no período de 7 dias (5 discos para extração do vermelho de Alizarina).

3.1.1 Preparação das superfícies de Ti

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro por 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil), usinados, foram lixados em lixas de carbetto de silício de gramatura 300, 400 e 600, lavados em ultrassom e tolueno, constituindo-se no grupo Ti Controle. Para a obtenção do grupo Nano-Ti, após a lavagem em tolueno, os discos de Ti foram condicionados em solução de H₂SO₄ a 10 N e H₂O₂ a 30% por 4 h (YI et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2007; VETRONE et al., 2009) à temperatura ambiente (T.A.), sob agitação constante. Discos de Ti Controle e Nano-Ti foram, em seguida, lavados em água destilada, secos ao ar e autoclavados.

3.1.2 Cultivo das linhagens celulares osteogênicas

Células MC3T3-E1 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ (Corning Inc., Kennebunk, ME, EUA) com 16 mL de meio de cultura α -MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Durante todo o tempo de cultivo, as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2-3 dias. Após a subconfluência, as células eram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e tripsina a 0,25% (Gibco), e contadas em microscópio com auxílio de um hemocitômetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As células foram, então, plaqueadas na densidade de 5x10⁴ células/poço ou 377 células/mm² sobre discos de Ti Controle e Nano-Ti contidos em placas de 24 poços (Corning Inc.), em meio de cultura α -MEM como mencionado, suplementado com 5 μ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por 5 dias. A definição de uma densidade de plaqueamento diferente das de protocolos de rotina para culturas MC3T3-E1 baseou-se em observações de estudo piloto utilizando-se como substratos lamínulas de Thermanox (Thermo Fisher Scientific) inicialmente, avaliando-se em seguida em superfícies de Ti Controle e Nano-Ti (vide APÊNDICES A e B, respectivamente), visando a se obter material suficiente para as análises

moleculares posteriores. As trocas de meio ocorreram nos tempos de 2 e 4 dias, quando se adicionava BMP-7 nas concentrações de 40 ng/mL e 200 ng/mL. De forma análoga ao cultivo de células MC3T3-E1, células UMR-106 eram cultivadas em meio de cultura D-MEM (Invitrogen), com 10% de soro fetal bovino, até atingirem a subconfluência, quando, então, eram tripsinadas e plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço ou 75 células/mm² e cultivadas por 7 dias, com as trocas de meio adicionando BMP-7 no 2^o e 4^o dia.

3.1.3 Morfologia e proliferação celulares e atividade de ALP *in situ*

Após 5 dias de cultura, células MC3T3-E1 foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB) a 0,1 M, em pH 7,2, por 10 min à T.A. Em seguida, foram processadas para imunofluorescência e fluorescência direta (DE OLIVEIRA; NANJI, 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 a detecção da proteína nuclear Ki-67, utilizou-se anticorpo policlonal anti-Ki-67, gerado em coelho 1:70 (RP025, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, EUA), seguido de anticorpo secundário policlonal anti-coelho gerado em cabra, conjugado com Alexa Fluor 594 1:500 (A11012, Molecular Probes Invitrogen, Eugene, OR, EUA). As incubações dos anticorpos foram realizadas em atmosfera úmida por 60 min à T.A. 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, Invitrogen) a 300 nM por 5 min e as amostras, em seguida, lavadas rapidamente com água deionizada. Particularmente para a análise morfológica por fluorescência direta, utilizou-se faloidina conjugada com Alexa Fluor 594 1:200 (A12381, Invitrogen). Para determinar a atividade de ALP *in situ*, células MC3T3-E1 foram lavadas com PBS aquecido e 1 mL de solução tampão Tris a 120 mM (Sigma-Aldrich), pH 8,4, contendo Fast Red TR a 1,8 mM (Sigma-Aldrich), naftol-ASM-X- fosfato a 0,9 mM (Sigma-Aldrich) e dimetil 1:9 (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 30 min em incubadora umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Procedeu-se, em seguida, à permeabilização com Triton X-100 para a marcação com DAPI, como descrito anteriormente. Para todos os ensaios, os discos de Ti foram montados sobre lâminas de vidro (Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific) e sobre as culturas, adaptadas lamínulas de vidro (Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific)

utilizando meio de montagem anti-decaimento de fluorescência Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As amostras foram, então, examinadas utilizando microscópio de fluorescência Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, TH, Alemanha), acoplado a uma câmera digital AxioCam MRm (Carl Zeiss, Inc., Jena, TH, Alemanha), com as aquisições de imagens realizadas com o programa AxioVision 4.8.2 e processadas em Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

3.1.4 Análise da diferenciação osteoblástica por PCR em tempo real

A expressão de marcadores do fenótipo osteoblástico foi avaliada por PCR em tempo real. Como controle, foi avaliada a expressão do gene constitutivo *Gapdh*. No 5º dia de cultura foi realizada a extração do RNA total por meio do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Cardiff, Reino Unido) e avaliado em relação à sua integridade (vide APÊNDICE C). Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100 mM), 2 µL (10X) RT *Random Primers*, 1 µL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 1 µL de *RNase Inhibitor* e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min, 85 °C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação, a amostra foi mantida refrigerada e o cDNA, estocado em freezer a -20 °C, até posterior análise. Para as reações de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems) em aparelho CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com volume final de 10 µL por reação. Para cada reação, foram adicionados 5 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG* (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 11,25 ng de cDNA. As reações ocorreram por 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold*– ou ciclo limiar) e todas as amostras, submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o

gene de expressão constitutiva *Gapdh*, sendo uma amostra negativa (água) 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, SCHMITTGEN, 2001), com os dados obtidos representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo, atribuindo-se valor 1 para cada marcador em culturas sobre Ti Controle.

3.1.5 Detecção de proteínas por Western Blot

Após 5 dias de cultura, células MC3T3-E1 foram lisadas em ultrassom (Misonix, Farmingdale, NY, EUA), utilizando tampão RIPA (NaCl a 150 mM, Sigma-Aldrich; NP40 a 10%, Sigma-Aldrich; $C_{24}H_{39}O_4Na$ a 0,5%, Sigma-Aldrich; SDS a 0,1%, Sigma-Aldrich; Tris base a 50 mM, pH 8; Roche, Basileia, Suíça), com 5 pulsos com intensidade 10 por 10 s, com intervalo de 1 min entre cada pulso. A quantidade de proteína foi quantificada por meio do ensaio de micro Lowry utilizando o kit DC™ Protein Assay (Bio Rad). Foram preparados géis de acrilamida a 10% para um volume final de 20 mL (6,7 mL de acrilamida a 30%, 5 mL de tampão Tris a 1,5% e 0,2 mL de SDS a 10%, pH 8,8, 7,9 mL de água destilada, 8 μ L de Temed e 20 μ L de persulfato de amônio a 10%; National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA). Os géis foram montados em aparato próprio e adicionou-se tampão de corrida 1X (3,01 g de Tris base, Roche; 14,4 g de glicina, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA; 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; para um volume final de 1 L de água destilada). Amostras contendo aproximadamente 25 μ g de proteína em 32 μ L de tampão de lise foram misturadas com 8 μ L de dye 6X (7 mL de Tris base pH 6,8, Roche; 3 mL de glicerol, Sigma-Aldrich; 1 g de SDS, Sigma-Aldrich; 0,93 g de DTT, Sigma-Aldrich; 1,2 mg de bromofenol, Sigma-Aldrich; em um volume final de 10 mL de água destilada) e mantidas em banho com água em ebulição por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10500 RPM e, posteriormente, aplicadas nos géis. A separação das proteínas foi feita com o aparato funcionando em 95 V por aproximadamente 2 h. Para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um marcador de peso molecular (Bio-Rad) que identifica bandas entre 2 e 250 kDa. As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de PVDF (Thermo Fisher Scientific), usando aparato adequado (Bio-Rad), com voltagem variável e amperagem fixa em 10 A, por 45 min. As membranas passaram por três incubações

de 1 h à T.A., sendo: (1) solução de leite desnatado ou BSA (de acordo com as recomendações do fabricante para cada anticorpo utilizado) a 5% em TBS-T (2,43 g de Tris, Roche; 8 g de NaCl, Sigma-Aldrich; 1 mL de Tween 20 (USB, Cleveland, OH, EUA) em um volume final de 1 L de água destilada e ajustando o pH final em 7,6, para bloqueio de sítios inespecíficos; (2) anticorpo primário policlonal anti-SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, gerado em coelho 1:1000 (#13820, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EUA); anticorpo primário monoclonal anti-SMAD 4, gerado em camundongo, 1:500 (sc-7966, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); anticorpo primário monoclonal anti-RUNX2, gerado em coelho, 1:500 (#12556, Cell Signaling Technology Inc.); anticorpo primário monoclonal anti-OPN MPIIB10-1, gerado em camundongo 1:1000 (AB 2286610, Hybridoma Bank, Iowa City, IA, EUA), em solução de BSA ou leite a 2,5% em TBS-T (de acordo com as recomendações do fabricante para cada anticorpo utilizado); (3) anticorpo secundário anti-IgG1 HRP conjugado com peroxidase, gerado em cabra, 1:2000 (sc-2060, Santa Cruz, Biotechnology); anticorpo secundário anti-IgG HRP conjugado com peroxidase, gerado em cabra 1:2000 (#7074s, Cell Signaling Technology Inc.); diluídos em solução de leite desnatado ou BSA a 2,5% em TBS-T (de acordo com as recomendações do fabricante para cada anticorpo utilizado). Entre as incubações com anticorpo primário e secundário e ao final da incubação com anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes, 5 min cada, com TBS-T. Foi feita uma lavagem de 1 min com solução quimioluminescente (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) e as membranas foram analisadas no aparelho G-Box (Syngene, Frederik, MD, EUA), que detecta a luminescência das bandas marcadas referentes às proteínas de interesse. Ao final do processo, as membranas foram incubadas em solução Re-blot plus mild (Millipore, Burlington, MA, EUA), à T.A. por 25 min, para a remoção dos anticorpos primário e secundário. Procedeu-se, então, à incubação do anticorpo primário policlonal anti-GAPDH, gerado em rato 1:1500 (sc-25778, Santa Cruz Biotechnology) e anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase gerado em cabra 1:2000 (#7074s, Cell Signaling Technology Inc.), diluídos em leite desnatado a 2,5% em TBS-T. As proteínas de interesse foram quantificadas por contagem do número de pixels da banda correspondente normalizada por GAPDH, utilizando-se os programas GeneSys 1.6.9 (Syngene), para aquisição de imagens, e GeneTools 4.3.8 (Syngene), para quantificação de bandas, atribuindo-se valor 1 para cada proteína em culturas sobre Ti Controle.

3.1.6 Detecção de acúmulos de cálcio- formação de matriz mineralizada

Em 7 dias, culturas UMR-106 foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em etanol a 70% a 4 °C por 60 min e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina (ARS) a 2%, pH 4,2, à T.A. por 15 min, lavadas com PBS e água bidestilada, e deixadas a secar à T.A. Bioquimicamente, acúmulos de cálcio foram quantificados pelo método de extração de ARS (GREGORY et al., 2004). Em cada poço contendo os discos de Ti corados com ARS, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10%, mantendo-se a placa sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi, então, removida com um raspador de células e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL e agitada em vortex por 30 s. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85 °C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 13000 RPM por 20 min. De cada grupo experimental foram transferidos 100 µL de sobrenadante para placa de 96 poços e adicionados 40 µL de hidróxido de amônio a 10% em cada poço. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (µQuanti, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), utilizando comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de ARS de 0,5 a 3 mM em acetato de amônio (ácido acético a 10% e hidróxido de amônio a 5 M).

3.2 Estudo 2

Foram utilizadas células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, de camundongos (CRL-2594, ATCC), durante sua fase proliferativa, plaqueadas sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* formado previamente sobre superfície de Nano-Ti funcionalizada com BMP-7, perfazendo 5 dias de cultura. A confecção do rebaixo durante a usinagem dos discos de Ti visou à retenção mais eficiente e preservação da estrutura tridimensional do coágulo sanguíneo, limitando o contato íntimo da superfície de Nano-Ti com o plano muscular no sítio de implantação. Na área do rebaixo circular plano (vide ANEXO A) foi utilizada solução de BMP-7 a 400 ng/mL para a funcionalização de uma das superfícies desses discos, *overnight* a 4 °C. A concentração de BMP-7 em solução preparada para a funcionalização de Nano-Ti

(consulte-se item 3.2.1) era 8X maior do que a definida por Zhang et al. (2012) como indutora de efeitos osteogênicos, baseando-se no conceito de que a disponibilização de BMPs para o fluido intersticial ocorre com a sua dessorção a partir da superfície funcionalizada de biomateriais (TENG et al., 2019). O coágulo sanguíneo foi obtido por implantação subcutânea de discos de Nano-Ti, previamente tratados como já descrito, no dorso de camundongos. À semelhança da metodologia do Estudo 1, avaliaram-se, no tempo de 5 dias, a morfologia das culturas por epifluorescência e MEV, a expressão de RNAm para marcadores da diferenciação osteoblástica (*Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, osteocalcina- *Oc* e *Opn*), de moléculas relacionadas a vias de sinalização de BMP-7 (*Smad 1* e *Smad 4*) e a detecção, por Western Blot, de RUNX2 e OPN e do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e SMAD 4. A metodologia utilizada foi semelhante à do Estudo 1, com experimentos adicionais descritos em seguida. Todos os experimentos do Estudo 2 foram realizados em duplicata técnica. Os grupos experimentais foram definidos como:

C1: Cultura de células MC3T3-E1 sobre o coágulo sanguíneo *ex vivo* de camundongos GFP positivos em discos de Nano-Ti funcionalizados com BMP-7, no período de 5 dias (Coágulo+MC3T3+BMP-7) (16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot, 20 camundongos);

C2: Cultura de células MC3T3-E1 sobre o coágulo sanguíneo *ex vivo* de camundongos em discos de Nano-Ti, no período de 5 dias (Coágulo+MC3T3) (16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot, 20 camundongos);

C4: Coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre discos de Nano-Ti após implantação em camundongos GFP positivos por período de 16-18 horas (Coágulo) (16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot, 20 camundongos);

S1: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Nano-Ti funcionalizados com BMP-7, no período de 5 dias (MC3T3+BMP-7) (16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot);

S2: Cultura de células MC3T3-E1 sobre discos de Nano-Ti sem BMP-7, no período de 5 dias (MC3T3) (16 discos para PCR e 20 discos para Western Blot).

As siglas alfanuméricas apresentadas acima foram utilizadas apenas para a análise dos resultados de integridade do RNA (vide APÊNDICE D).

3.2.1 Funcionalização de BMP-7 em Nano-Ti

No dia anterior à cirurgia dos animais, discos de Nano-Ti previamente autoclavados foram incubados, *overnight* a 4 °C, em solução de BMP-7 (BP-5666, R&D Systems) a 400 ng/mL com BSA a 0,1% e 4 mM de HCl, em placas de poliestireno de 24 poços (Corning Inc.), sendo, em seguida, lavados três vezes com PBS a 37 °C (BUENO et al., 2016).

3.2.2 Cirurgia nos animais para obtenção de coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti

Para obter a formação de coágulo sanguíneo *ex vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6, fêmeas, GFP positivas, com idades entre 8 e 12 semanas, adquiridos junto ao Biotério Central da Prefeitura do Campus da USP de Ribeirão Preto. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP (173/2016, vide ANEXO B), seguindo o modelo proposto por Monroe & Hoffman et al. (2012), com adaptações. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos Experimentais em Animais da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, como descrito em seguida: 1) anestesiaram-se os animais com isoflurano a 3% em câmara de indução em equipamento próprio de uso veterinário; 2) após terem atingido plano anestésico profundo, os animais foram mantidos em cone facial com isoflurano a 2% e colocados em decúbito ventral sobre mesa cirúrgica; 3) procedeu-se, então, à tricotomia da região posterior dorsal, em ambos os lados, seguida de antissepsia com PVPI; 4) uma incisão de 2,5 cm foi feita com bisturi na pele do animal, no plano sagital, rompendo-se a fáscia muscular; 5) dois discos de Nano-Ti funcionalizados ou não com BMP-7 foram introduzidos nas regiões subcutâneas direita e esquerda de cada animal; 6) a incisão foi grampeada utilizando-se grampeador cirúrgico veterinário (Autoclip 9 mm, Clay Adams, Vernon Hill, IL, EUA); 7) durante a cirurgia e 6 h após seu término, os animais receberam, via intraperitoneal (IP), o analgésico cloridrato de tramadol 12 mg (Agener União, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) na dose de 40 mg/kg; 8) os animais eram acompanhados até o retorno da anestesia e mantidos em gaiolas individuais, por períodos entre 16 e 18 h pós cirurgia, quando, então, eram eutanasiados por sobredose de anestésico, consistindo na injeção

IP de tiopental sódico 1g (Cristália, Itapira, MG, Brasil) na dose de 150 mg/kg, com administração prévia, via IP, de cloridrato de lidocaína a 2% (Lidovet, Engenho Novo, RJ, Brasil) na dose de 5 mg/kg, para a retirada dos discos de Nano-Ti recobertos com coágulo sanguíneo. O tempo de 16-18 h foi estabelecido como adequado por estudo piloto que avaliou por MEV a morfologia do coágulo sanguíneo *ex vivo* (vide APÊNDICE E). Imediatamente após a cirurgia, parte dos discos de Nano-Ti foi submetida a protocolos de fixação em solução de glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato a 0,2 M ou em paraformaldeído a 4% em PB a 0,1 M, para posterior avaliação morfológica, respectivamente, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e epifluorescência. Discos não submetidos à fixação foram colocados em placas de poliestireno de 24 poços contendo tampão PB e acondicionadas em isopor com gelo, e transportados até o Laboratório de Cultura de Células da FORP-USP, onde se procedeu ao plaqueamento de células MC3T3-E1 sobre a superfície de Nano-Ti contendo a formação de coágulo sanguíneo *ex vivo*. As características morfológicas do coágulo sanguíneo mantinham-se semelhantes após o transporte (vide APÊNDICE F), assegurando a ocorrência de interações entre células MC3T3-E1 e seus elementos e estrutura tridimensional (vide APÊNDICE G).

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após o período de cultivo de 5 dias, os grupos amostrais destinados à MEV foram fixados em glutaraldeído (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, Inglaterra) a 2% em tampão cacodilato (contendo 0,9 mM de Ca^{2+} e 0,5 mM de Mg^{2+}) por 2 h à T.A. Brevemente, seguiram-se duas lavagens com tampão cacodilato (EM Sciences) a 1% por 2 h à T.A. As células foram, então, lavadas em água Milli-Q e incubadas em solução saturada de tiocarbohidrazida (EM Sciences) por 10 min à T.A., seguindo-se cinco lavagens em água Milli-Q e incubação em OsO_4 a 1% (em água Milli-Q). Como meio de montagem, os discos foram fixados em suportes que se mantiveram mergulhados em água para evitar o contato das células com o ar atmosférico. O material biológico foi desidratado em diversos banhos de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e seco até o ponto crítico com CO_2 (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer, Balzers, Liechtenstein). Os discos foram fixados com cola de prata (EM Science) sobre um suporte metálico e recobertos com ouro (Bal-Tec CPD 050 Sputter Coater). As amostras foram, então,

observadas no microscópio de varredura JEOL JSM- 6610LV (JOEL, Tokio, Japão) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (LMME) da FMRP-USP, utilizando-se 20 e 25 kV.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

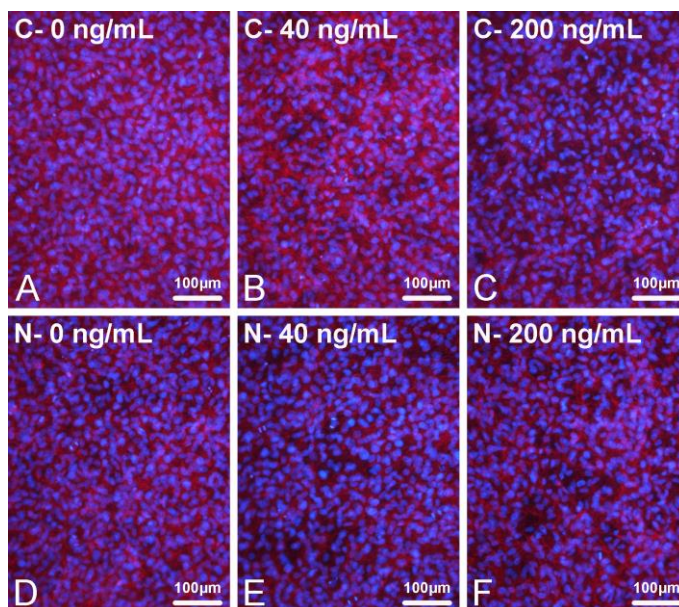
5.1 Estudo 1

Em 5 dias, as culturas de células MC3T3-E1 apresentavam-se confluentes em todos os grupos (Figura 1), com início de formação de multicamadas e figuras mitóticas. Para as culturas expostas à BMP-7, notou-se tendência à redução da quantidade de células, sobretudo para a concentração de 200 ng/mL (Figuras 1B, C, E e F; Figura 2).

Células Ki-67 positivas eram observadas em todos os grupos (Figura 3), em parte associadas a figuras mitóticas, mas em menor número em culturas sobre Ti-Controle expostas à BMP-7 e sobre Nano-Ti, em comparação ao grupo Ti-Controle (comparem-se Figuras 3B-F com A; Figura 4).

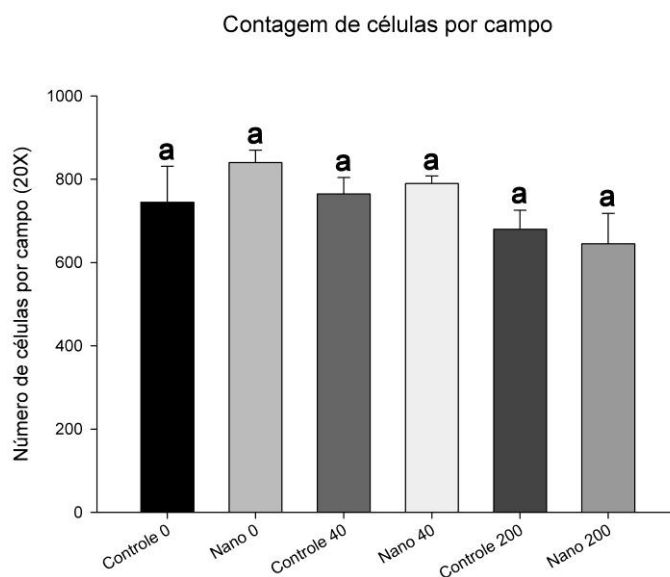
A atividade de ALP *in situ* foi detectada em todas as culturas MC3T3-E1 expostas à BMP-7, em padrão de marcação que revelava a morfologia poligonal das células (Figura 5), mas com intensidade visualmente maior para a concentração de 200 ng/mL de BMP-7 em culturas crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti (Figura 5, comparem-se C com B e F com E).

Figura 1 - Fluorescência direta de cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. Em vermelho, marcação do citoesqueleto de actina com faloidina, e em azul, dos núcleos celulares com DAPI. (A) Ti Controle na ausência de BMP-7. (B) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (C) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (D) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (E) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (F) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Objetiva de 20X.



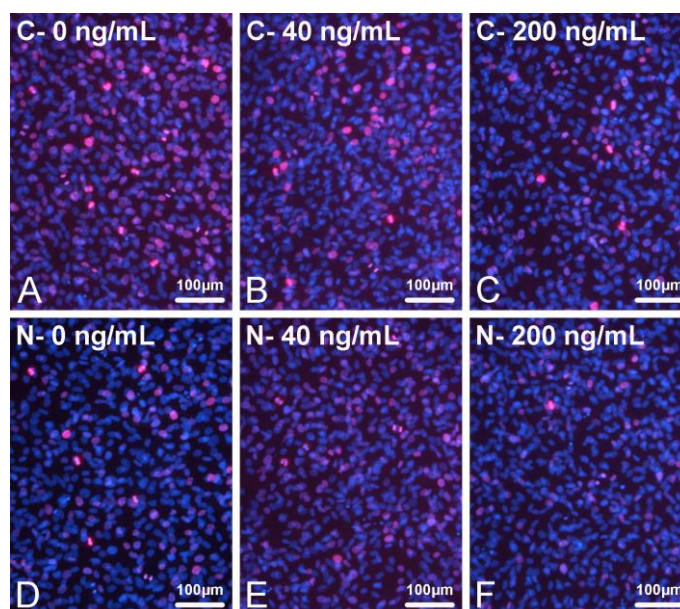
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 2 - Número de células, por campo microscópico, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



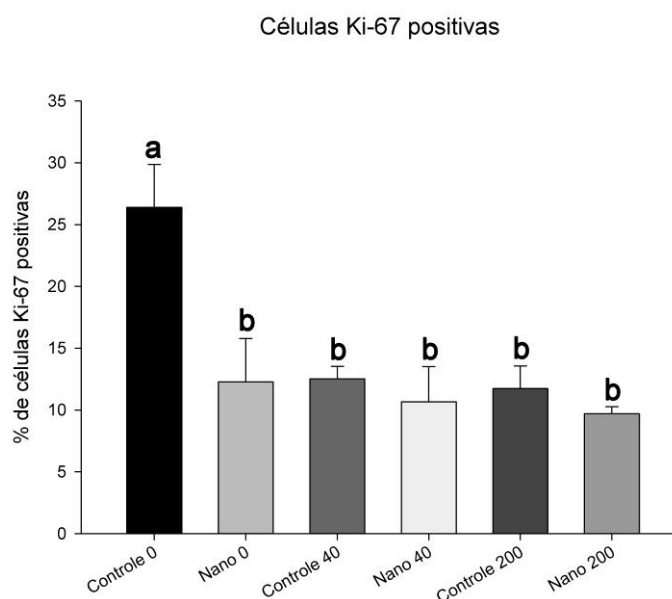
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 3 - Imunomarcagem para Ki-67 (fluorescência vermelha) em cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. Em azul, núcleos celulares marcados com DAPI. (A) Ti Controle na ausência de BMP-7. (B) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (C) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (D) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (E) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (F) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Objetiva de 20X.



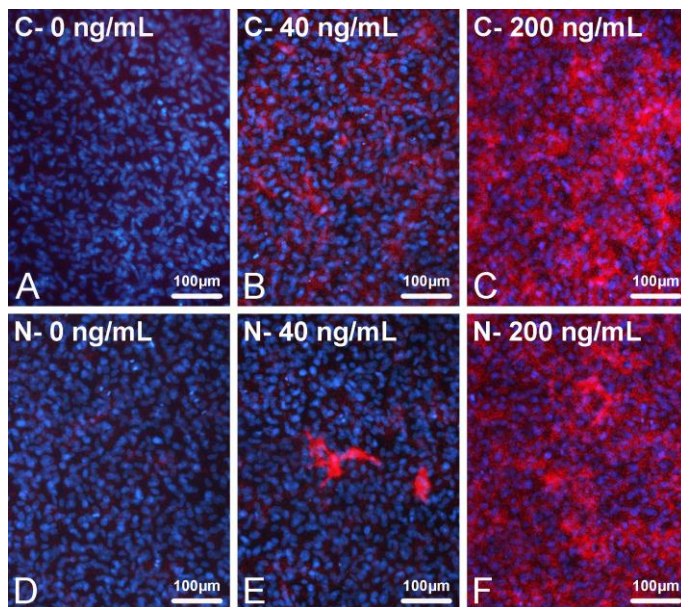
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 4 - Proporção de células Ki-67 positivas, por campo microscópico, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 5 - Atividade de ALP *in situ* (fluorescência vermelha), pelo método do Fast Red, em cultura de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle (A-C) e Nano-Ti (D-F) em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. Em azul, núcleos celulares marcados com DAPI. (A) Ti Controle na ausência de BMP-7. (B) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (C) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (D) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (E) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (F) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Objetiva de 20X.

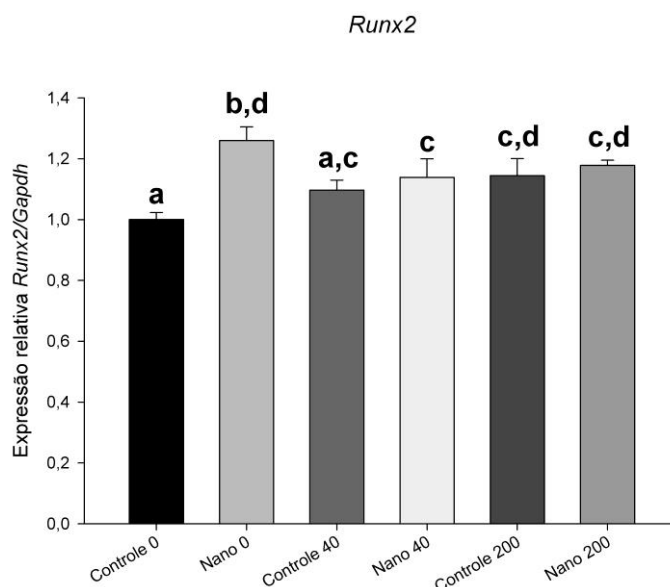


Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Para quantificar a expressão de marcadores osteoblásticos e de molécula envolvida em vias de sinalização de BMP-7, procedeu-se inicialmente à análise de integridade do RNA obtido, por meio da mensuração de duas subunidades ribossômicas características de células eucarióticas (18S e 28S), tendo sido consideradas amostras adequadas para o ensaio por PCR em tempo real as que apresentaram escores de RIN superiores a 8, em uma escala de 0 a 10 (vide APÊNDICE C).

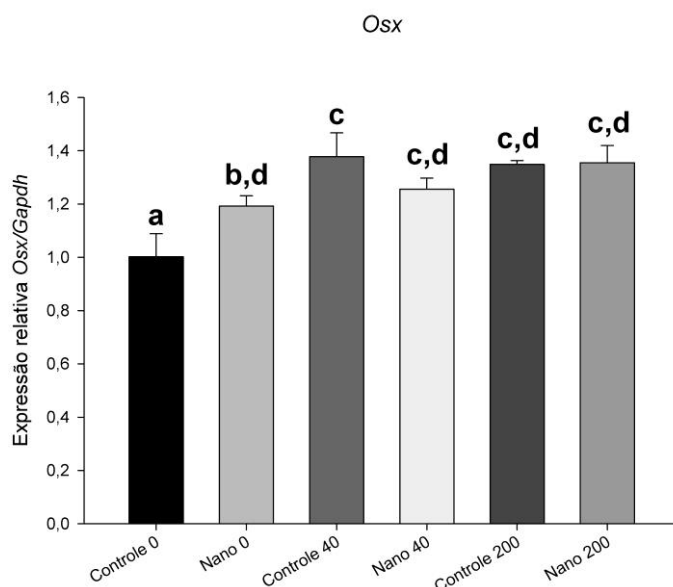
Confirmada a integridade do RNA, avaliaram-se as expressões do fator de transcrição 2 com domínio Runt (*Runx2*), osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), sialoproteína óssea (*Bsp*), osteopontina (*Opn*) e SMAD 1 (*Smad 1*), normalizadas em relação à expressão do gene constitutivo *Gapdh*, cujos resultados são apresentados nas Figuras 6 a 11.

Figura 6 - Expressão de *Runx2*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



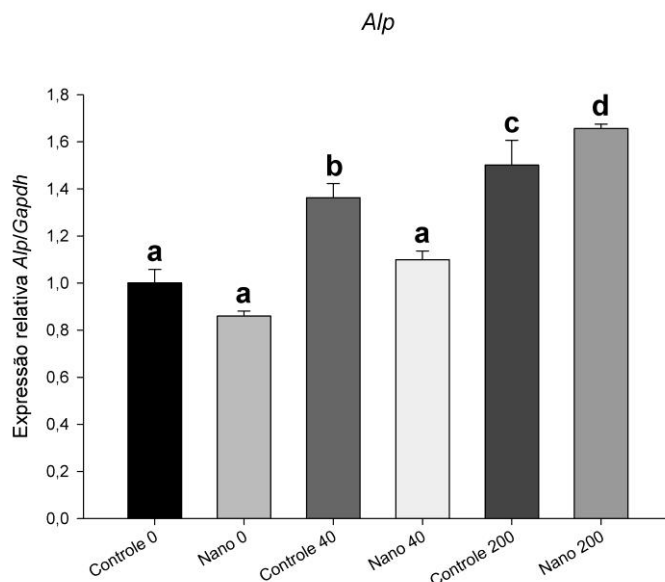
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 7 - Expressão de *Osx*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



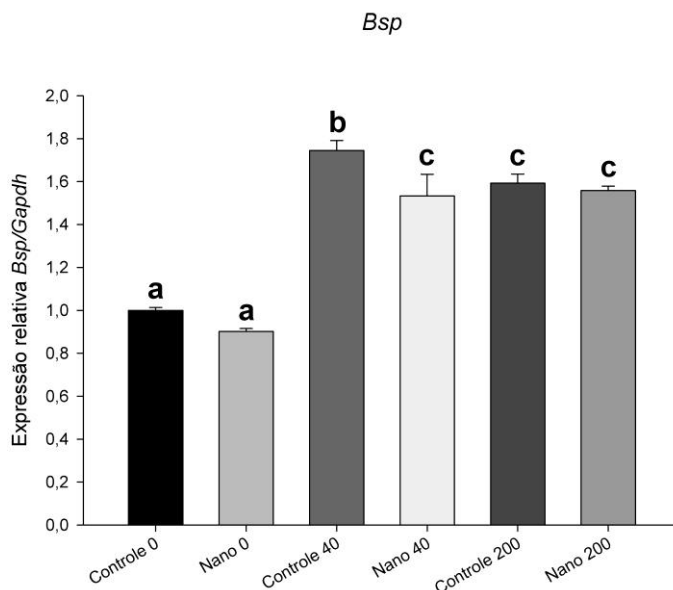
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 8 - Expressão de *Alp*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



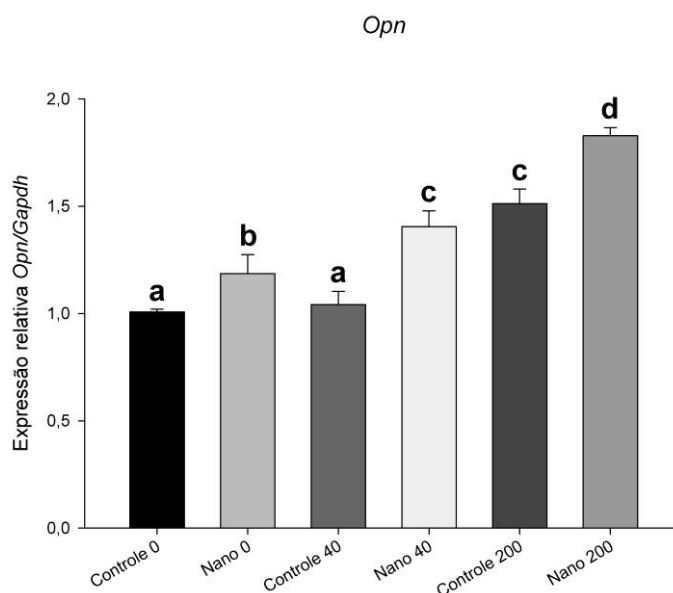
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 9 - Expressão de *Bsp*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



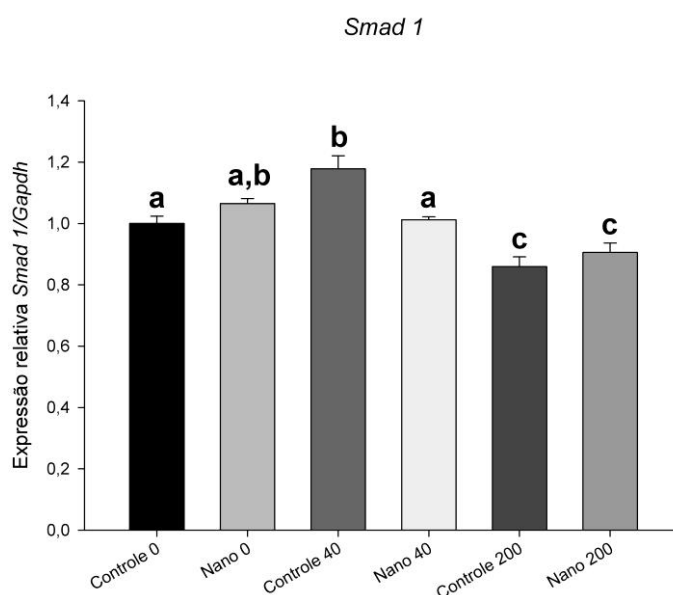
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 10 - Expressão de *Opn*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 11 - Expressão de *Smad 1*, normalizada em relação ao *Gapdh*, em culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).

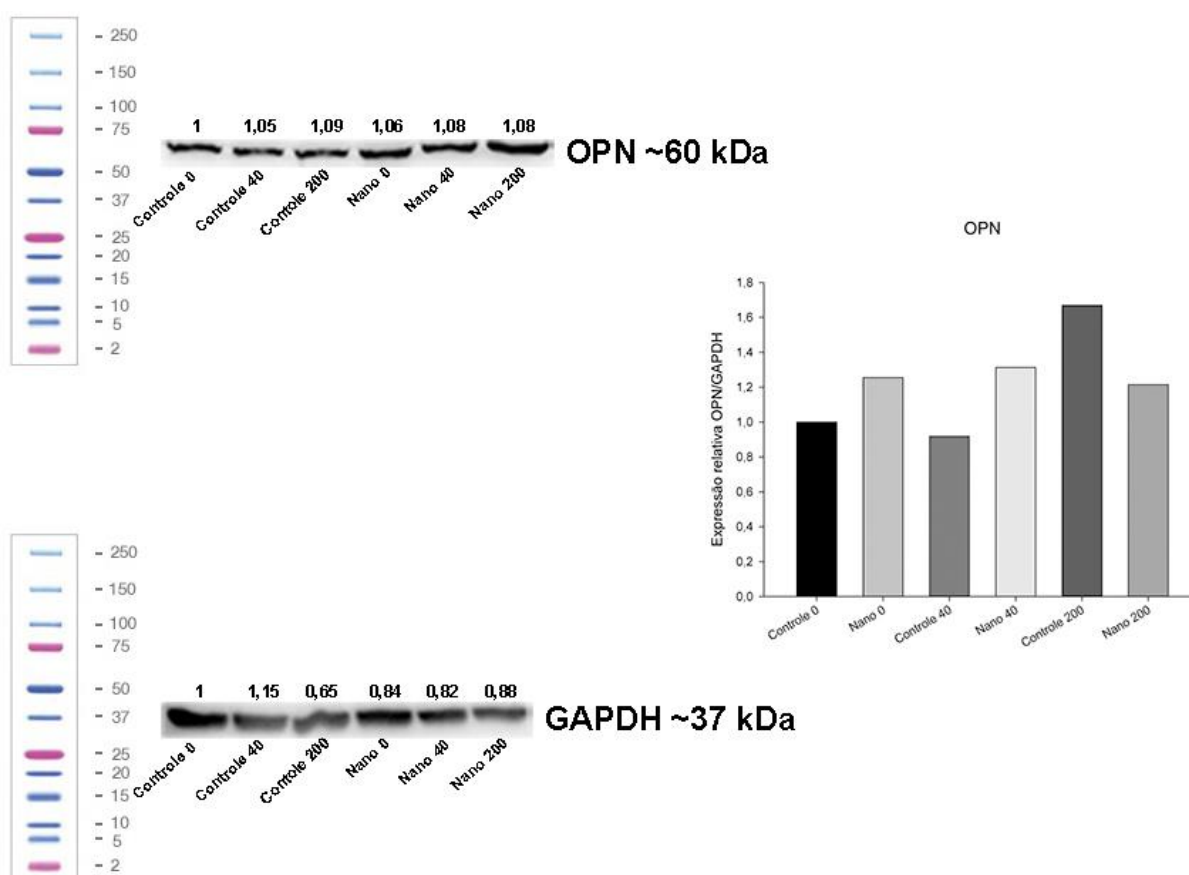


Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Ainda que as expressões de *Runx2* e *Osx* não tenham apresentado diferenças estatisticamente significantes entre as culturas expostas à BMP-7 sobre Ti Controle e Nano-Ti, estas foram maiores em comparação com a não suplementação de BMP-7 apenas para Ti-Controle (Figuras 6 e 7). A expressão de *Alp* em culturas sobre Ti Controle e Nano-Ti aumentou gradativamente com o aumento da concentração de BMP-7, sendo que para Ti Controle em comparação com Nano-Ti, era maior na concentração de 40 ng/mL e menor na de 200 ng/mL (Figura 8). A expressão de *Bsp* foi maior nas culturas expostas à BMP-7 para ambas as superfícies de Ti, sendo na concentração de 40 ng/mL significativamente maior para Ti Controle quando comparado com Nano-Ti (Figura 9). A expressão de *Opn* em culturas sobre Ti Controle e Nano-Ti aumentou gradativamente com o aumento da concentração de BMP-7, sendo significativamente maior em culturas sobre Nano-Ti em comparação com Ti Controle (Figura 10). A expressão de *Smad 1* foi maior em culturas expostas a 40 ng/mL de BMP-7 quando crescidas sobre Ti Controle em comparação com aquelas sobre Nano-Ti ou não expostas à BMP-7, reduzindo-se significativamente com a exposição das culturas à concentração de 200 ng/mL sobre as duas superfícies de Ti (Figura 11).

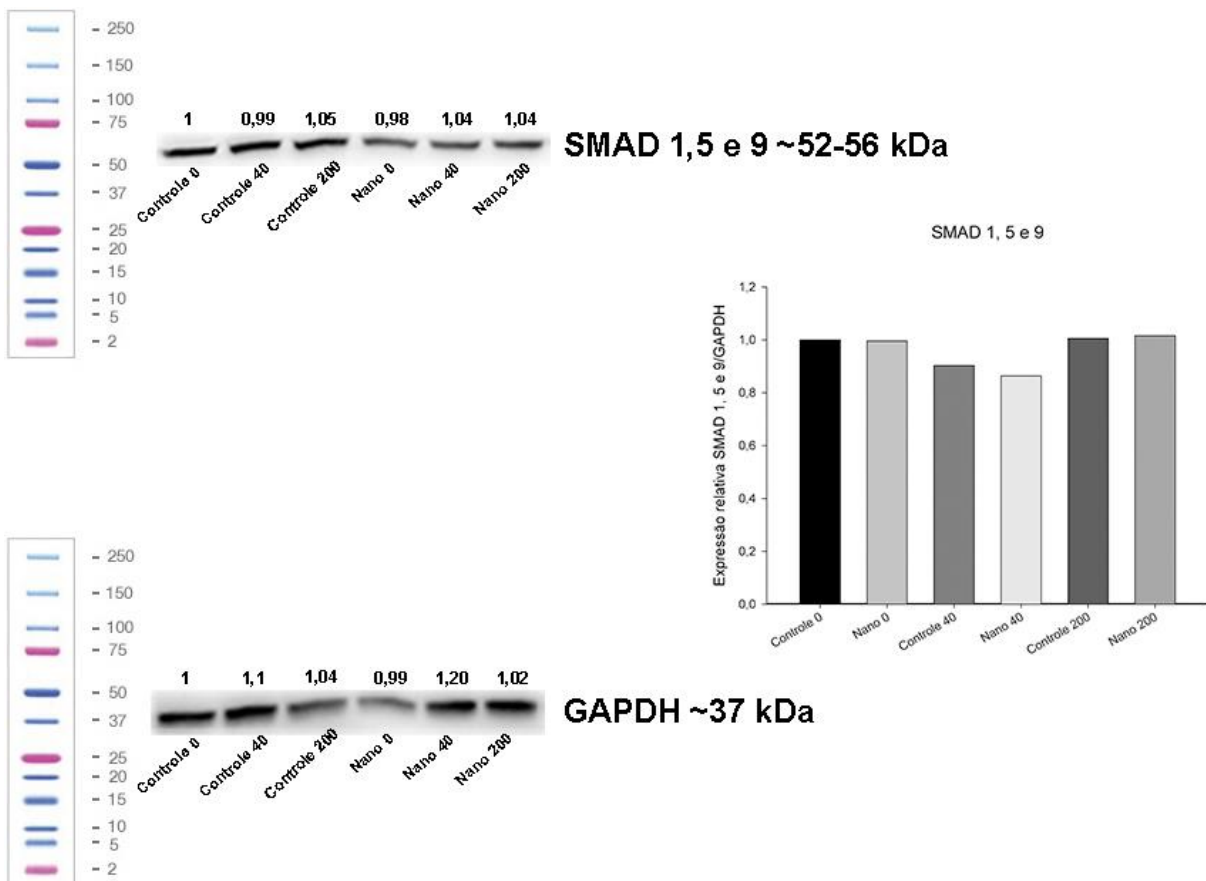
Os resultados de Western Blot para OPN (~60 kDa) e SMAD 1, 5 e 9 fosforilada (~52-56 kDa) estão apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. A OPN foi detectada em culturas MC3T3-E1 de todos os grupos, com maiores quantidades naquelas crescidas sobre Nano-Ti em comparação com Ti Controle, exceto para 200 ng/mL, quando Ti Controle apresentou o maior valor (Figura 12). Detectou-se o complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada nas culturas de todos os grupos, sem qualquer tendência a diferenças em sua quantidade entre Ti Controle e Nano-Ti, mas com valores menores para a concentração de 40 ng/mL (Figura 13).

Figura 12 - Western Blot para detecção e quantificação de OPN, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de OPN e de GAPDH relativa à membrana de OPN. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de OPN, normalizadas pela proteína GAPDH. Culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

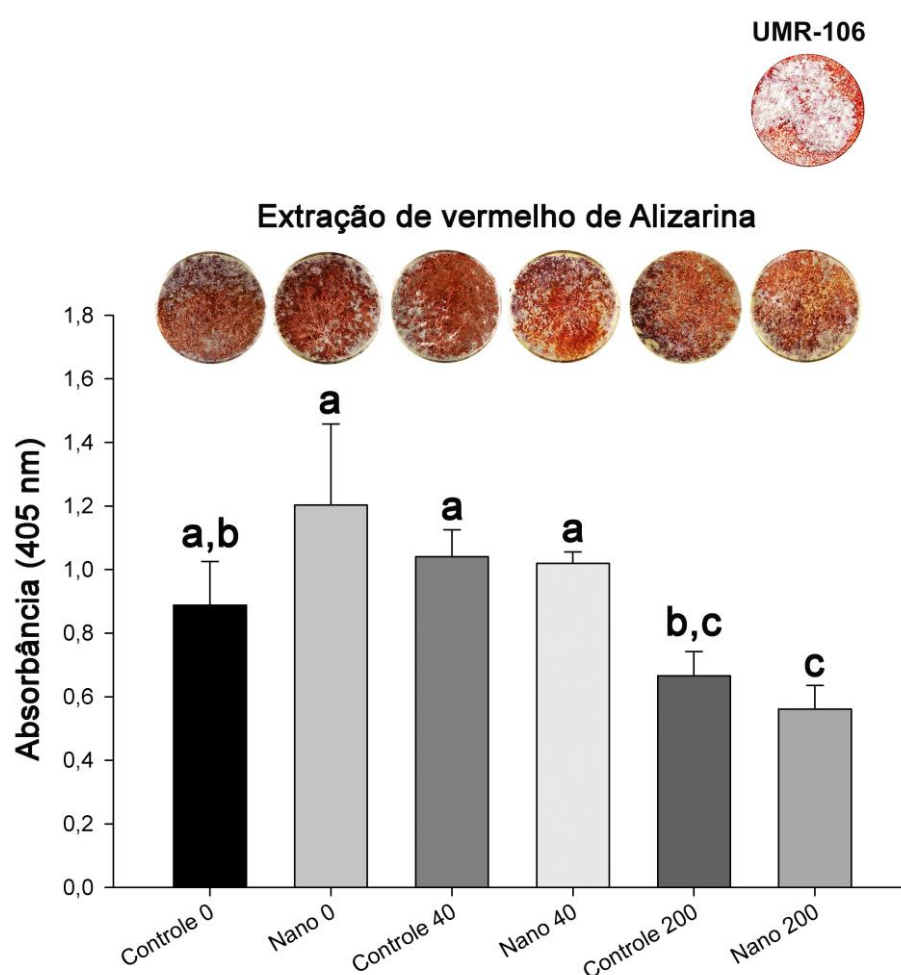
Figura 13 - Western Blot para detecção e quantificação do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e de GAPDH relativa à membrana de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, normalizadas pela proteína GAPDH. Culturas MC3T3-E1 crescidas sobre Ti Controle e Nano-Ti em 5 dias, expostas ou não à BMP-7 a 40 ng/mL e 200 ng/mL. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Os resultados de quantificação de vermelho de Alizarina mostraram não haver diferenças significantes entre os grupos com ausência ou suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 tanto para Ti Controle quanto para Nano-Ti. Apesar de a quantidade ser menor nos grupos Ti Controle e Nano-Ti na concentração de 200 ng/mL quando comparados aos demais, não houve diferenças significantes entre si (Figura 14).

Figura 14 - Aspectos macroscópicos e quantificação de formações de matriz mineralizada de culturas de células UMR-106 em 7 dias, coradas por vermelho de Alizarina. (Controle 0) Ti Controle na ausência de BMP-7. (Nano 0) Nano-Ti na ausência de BMP-7. (Controle 40) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Nano 40) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 40 ng/mL de BMP-7. (Controle 200) Ti Controle e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. (Nano 200) Nano-Ti e suplementação do meio de cultura com 200 ng/mL de BMP-7. Em destaque, cultura UMR-106 sobre poliestireno na ausência de BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019

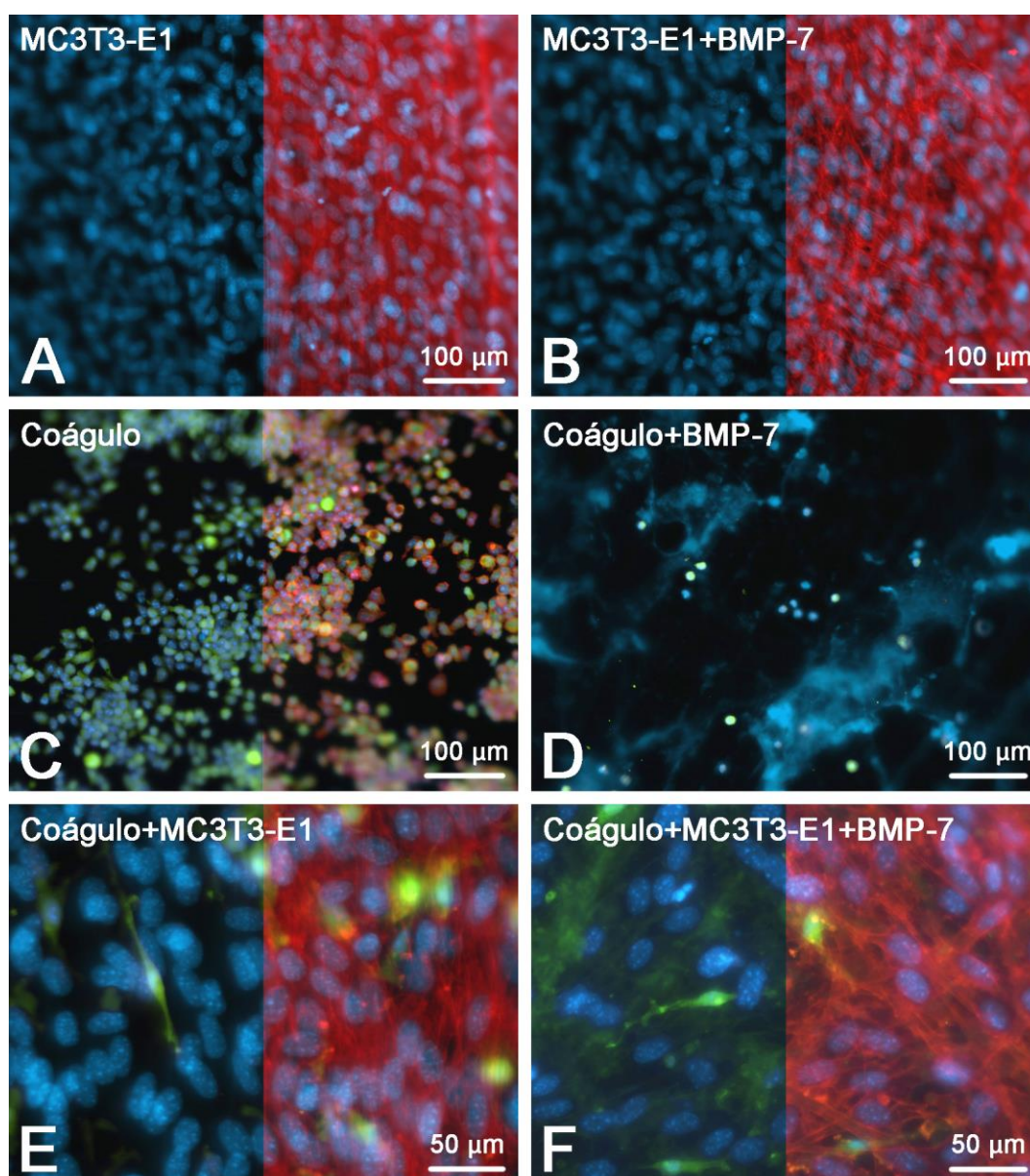
5.2 Estudo 2

Os aspectos morfológicos de superfícies de Nano-Ti, não funcionalizadas ou funcionalizadas com BMP-7, de discos implantados ou não no subcutâneo de camundongos e sobre os quais cultivaram-se células MC3T3-E1 por 5 dias foram obtidos por epifluorescência e MEV e estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Quando crescidas diretamente sobre superfícies de Nano-Ti, funcionalizadas ou não com BMP-7, culturas MC3T3-E1 apresentavam-se confluentes em 5 dias, com início de formação de multicamadas e figuras mitóticas ocasionais (Figuras 15A e B), cujas células exibiam morfologia poligonal alongada, com eventuais projeções citoplasmáticas delgadas (Figuras 16A e B). Não se observaram diferenças morfológicas nas culturas com a funcionalização de Nano-Ti com BMP-7.

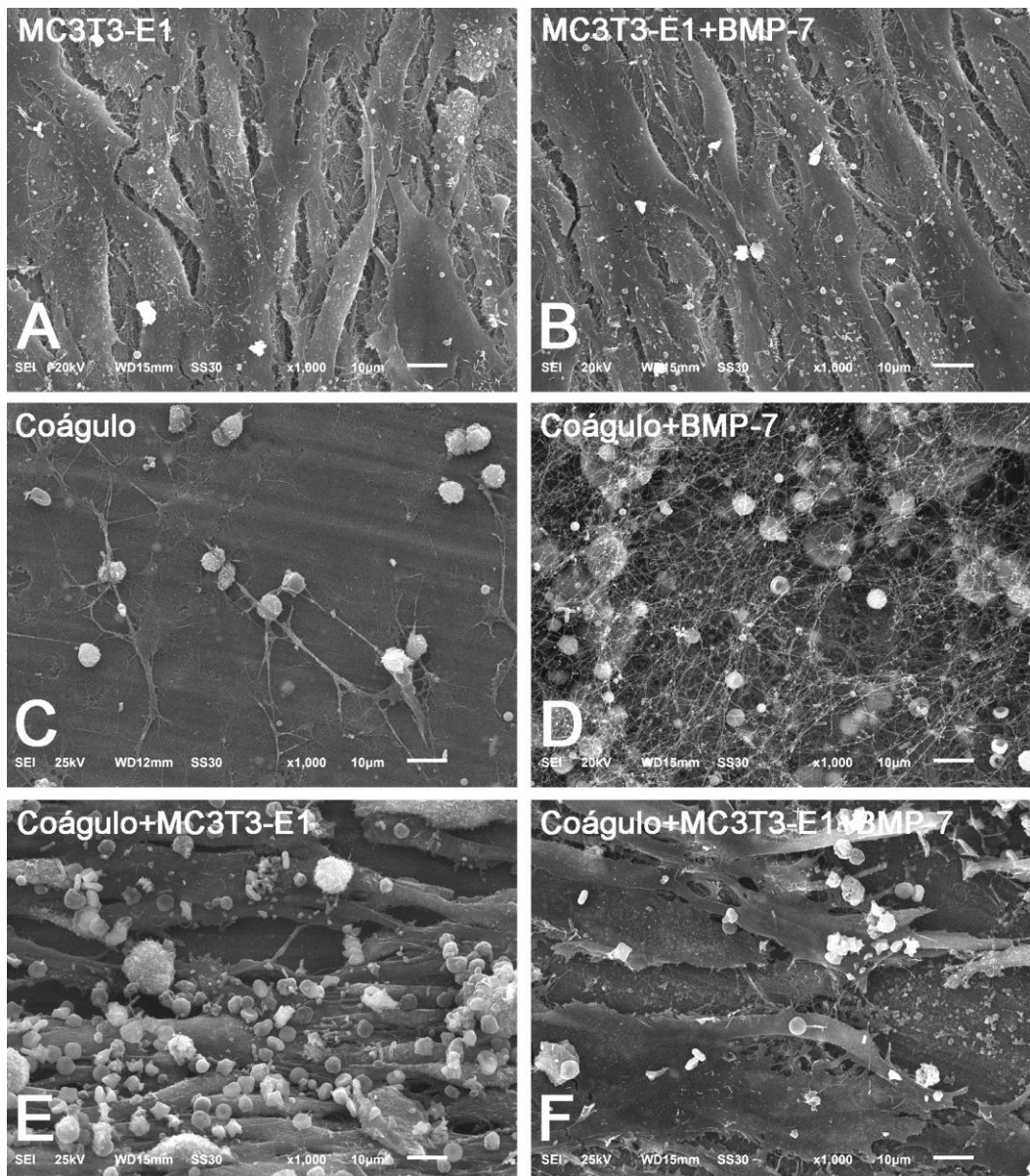
A formação de coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti, no momento que precedia o plaqueamento das células MC3T3-E1, mostrou-se relativamente inhomogênea, estruturada por rede de fibrina com a qual hemácias, leucócitos e plaquetas interagem (Figuras 15 e 16, C e D). Após 5 dias de cultura MC3T3-E1, persistiam os elementos do coágulo sanguíneo, mas em menor quantidade em relação às formações de camadas de células pré-osteoblásticas, as quais exibiam morfologia poligonal e maiores dimensões citoplasmática e nuclear (não determinadas) quando comparadas às de leucócitos GFP-positivos. As células MC3T3-E1 permeavam a estrutura do coágulo sanguíneo e se espalhavam sobre a superfície de Nano-Ti, notando-se leucócitos e hemácias em um plano superior das culturas (Figuras 15 e 16, E e F). Os leucócitos exibiam aspectos típicos de espalhamento celular, com extensões citoplasmáticas, mantendo-se eventualmente com morfologia esférica. A funcionalização de Nano-Ti com BMP-7 não promoveu alterações importantes tanto na formação de coágulo sanguíneo como nos aspectos morfológicos das células MC3T3-E1 crescidas em contato com sua estrutura (Figuras 15 e 16, comparem-se D com C e F com E).

Figura 15 - Epifluorescência de discos de titânio com nanotopografia (Nano-Ti), não funcionalizados (A, C e E) ou funcionalizados com BMP-7 (B, D e F), que foram implantados (C-F) ou não (A e B) no subcutâneo de camundongos e sobre os quais cresceram culturas MC3T3-E1 por 5 dias (A, B, E e F); C e D mostram a estrutura do coágulo sanguíneo previamente ao plaqueamento das células. Fluorescência vermelha indica o citoesqueleto de actina (A-C, E e F), verde, leucócitos do coágulo sanguíneo, GFP-positivos (C-F), e azul, os núcleos celulares (A-F) e a rede de fibrina (D). A fluorescência vermelha foi omitida nas metades esquerdas de A-C, E e F para a melhor visualização dos núcleos celulares e das células GFP-positivas. (A-D) objetiva de 20X; (E-F) objetiva de 40X.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de discos de titânio com nanotopografia (Nano-Ti) não funcionalizados (A, C e E) ou funcionalizados com BMP-7 (B, D e F), que foram implantados (C-F) ou não (A e B) no subcutâneo de camundongos e sobre os quais cresceram culturas MC3T3-E1 por 5 dias (A, B, E e F); C e D mostram a estrutura do coágulo sanguíneo previamente ao plaqueamento das células, com destaque para a rede de fibrina, leucócitos e hemácias ocasionais. Em E e F, notem-se diferentes aspectos que revelam interações entre as células MC3T3-E1 e os elementos do coágulo sanguíneo *ex vivo* que persistiram durante os 5 dias de cultura; o volume das células MC3T3-E1 é substancialmente maior do que o de leucócitos e hemácias. A funcionalização de Nano-Ti com BMP-7 parece não promover alterações morfológicas detectáveis por MEV em células MC3T3-E1 em contato com o coágulo sanguíneo (compare-se F com E) ou mesmo em células MC3T3-E1 ou coágulo sanguíneo individualmente (B e D, respectivamente).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2019.

Os resultados de quantificação de RNAm estão apresentados nas Figuras 17 a 24.

Observou-se inibição na expressão de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp* e *Oc* quando as células MC3T3-E1 cresciam sobre o coágulo sanguíneo *ex vivo*, com valores mínimos e/ou quantidades não detectáveis para o grupo Coágulo. Com a funcionalização de BMP-7, notou-se aumento da expressão desses genes, com significância estatística apenas para *Osx*. Entretanto, os valores de expressão de RNAm aumentados eram menores do que os dos grupos sem coágulo sanguíneo. Nesses grupos, a funcionalização com BMP-7 proporcionou menor expressão de *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp* e *Oc*, apesar de não ser significativa para *Runx2* (Figuras 17-21).

Para *Opn*, *Smad 1* e *Smad 4*, os resultados diferiram dos demais. A presença de coágulo sanguíneo resultou no aumento da expressão de *Opn* em relação aos demais grupos, e a funcionalização com BMP-7 inibiu a sua expressão (Figura 22). No geral, para as expressões de *Smad 1* e *Smad 4*, não se observaram diferenças importantes entre os grupos (Figuras 23 e 24). No grupo Coágulo, detectou-se expressão importante de *Opn*, *Smad 1* e *Smad 4* (Figuras 22-24).

Figura 17 - Expressão de *Runx2*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).

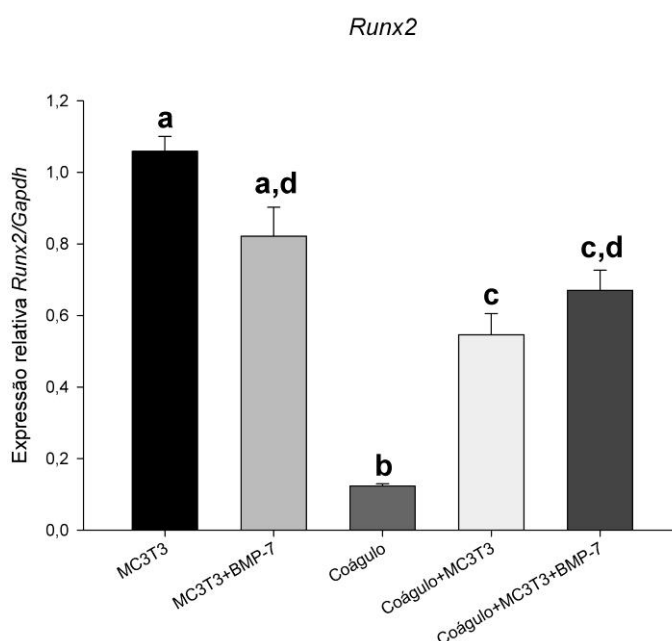
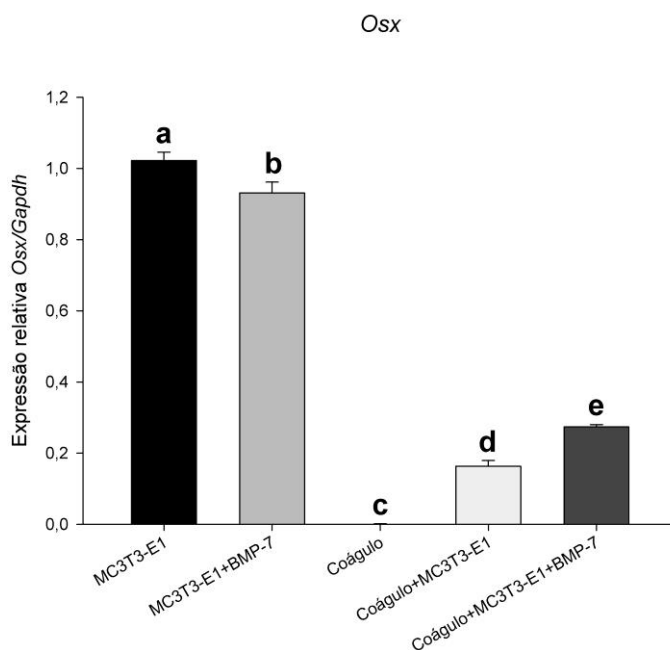
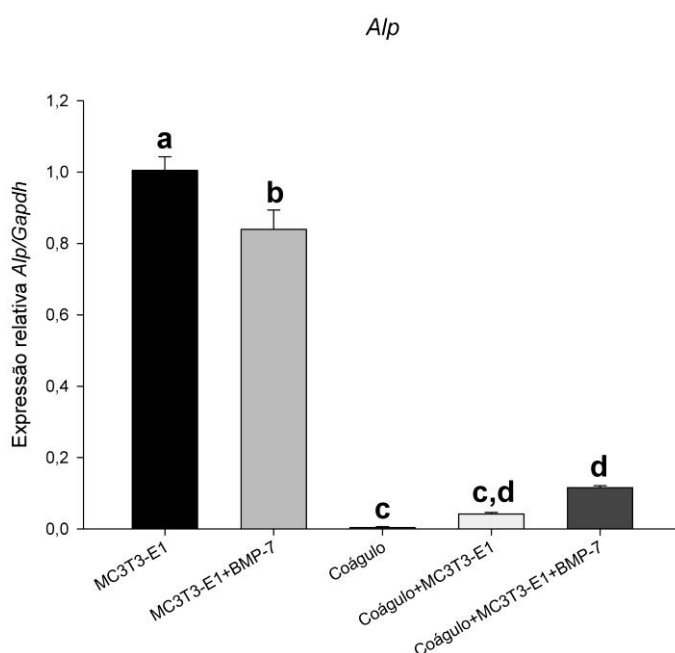


Figura 18 - Expressão de *Osx*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$).



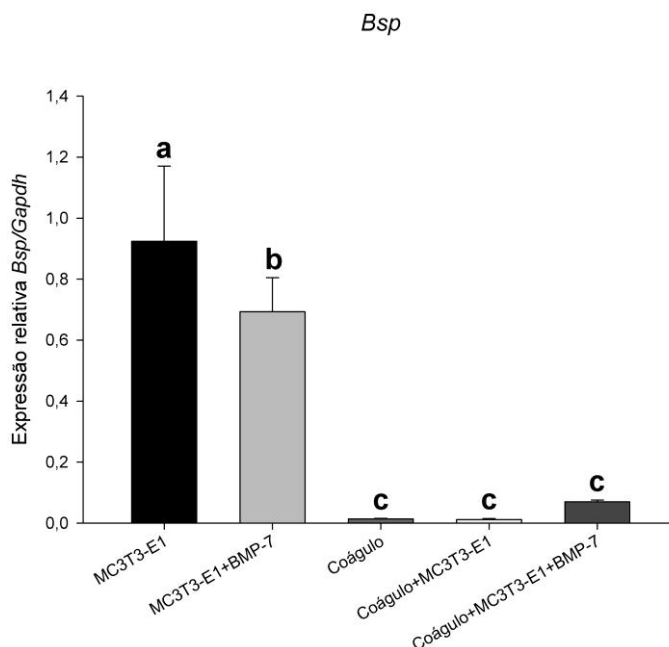
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 19 - Expressão de *Alp*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p>0,05$).



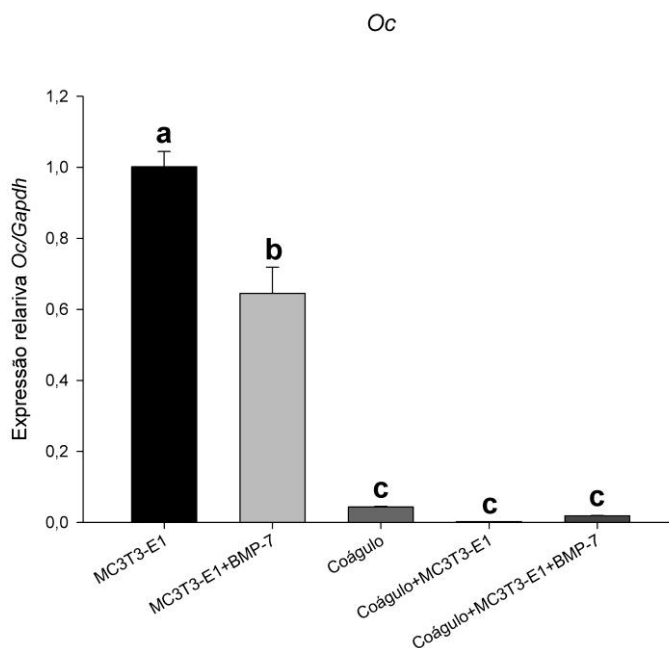
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 20 - Expressão de *Bsp*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



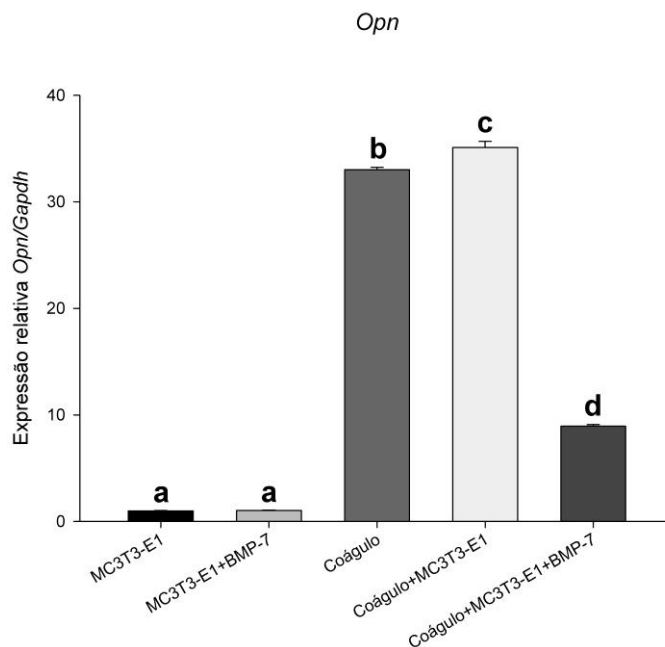
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 21 - Expressão de *Oc*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



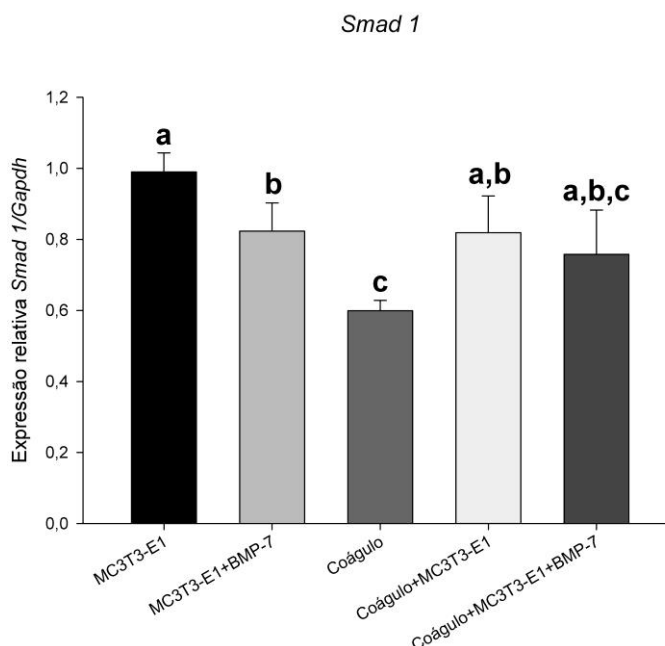
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019

Figura 22 - Expressão de *Opn*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



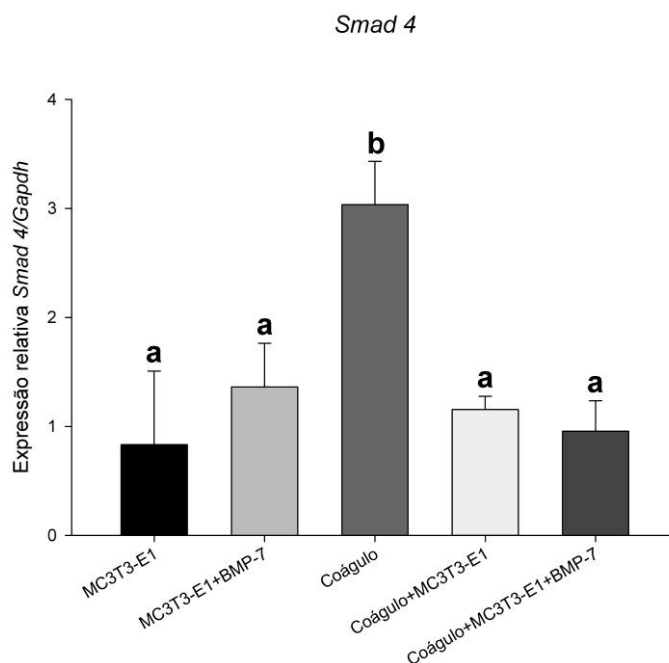
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 23 - Expressão de *Smad 1*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 24 - Expressão de *Smad 4*, normalizada em relação a *Gapdh*, em: (MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Barras que compartilham pelo menos uma letra igual são estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Os resultados de Western Blot para RUNX2 (65 kDa), OPN (60 kDa), complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada (52-56 kDa) e SMAD 4 (65-70 kDa), com a proteína constitutiva GAPDH (37 kDa), estão apresentados nas Figuras 25 a 28.

Observou-se aumento de RUNX2 em células MC3T3-E1 quando expostas à superfície de Nano-Ti funcionalizada com BMP-7, tanto na presença como na ausência de coágulo sanguíneo, apresentando-se em níveis não detectáveis no grupo Coágulo (Figura 25).

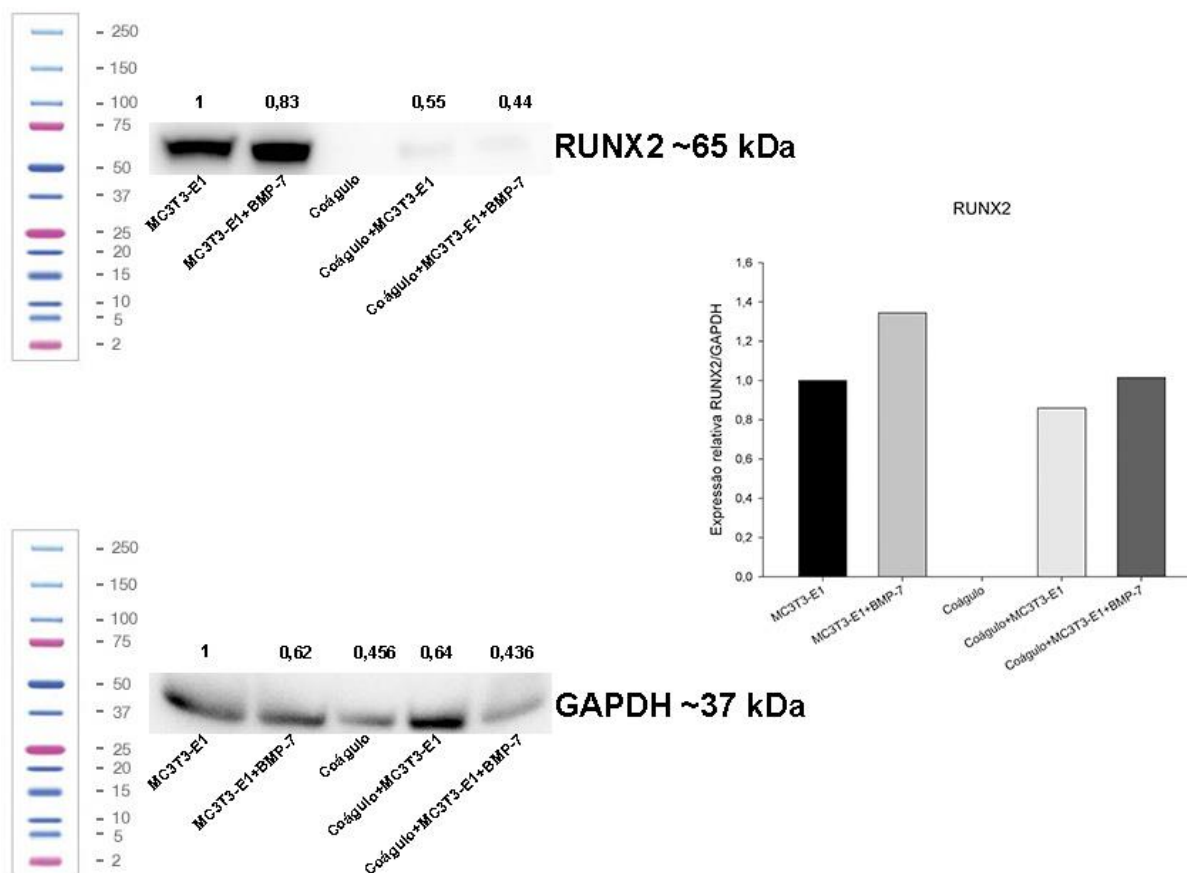
Em relação à OPN, maior quantidade foi observada nas culturas expostas à BMP-7 apenas na ausência de coágulo sanguíneo. Quando as células cresciam sobre o coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti com BMP-7, a OPN não era detectada. Para o grupo Coágulo, notava-se apenas a forma clivada de OPN (Figura 26).

A quantidade de complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada estava aumentada nas culturas MC3T3-E1 crescidas sobre coágulo sanguíneo, mas com peso molecular menor se comparado ao de sua forma nativa, o que ocorria também para o grupo

Coágulo. A presença de BMP-7 resultava em tendência de redução de sua quantidade, tanto na forma nativa como na degradada (Figura 27).

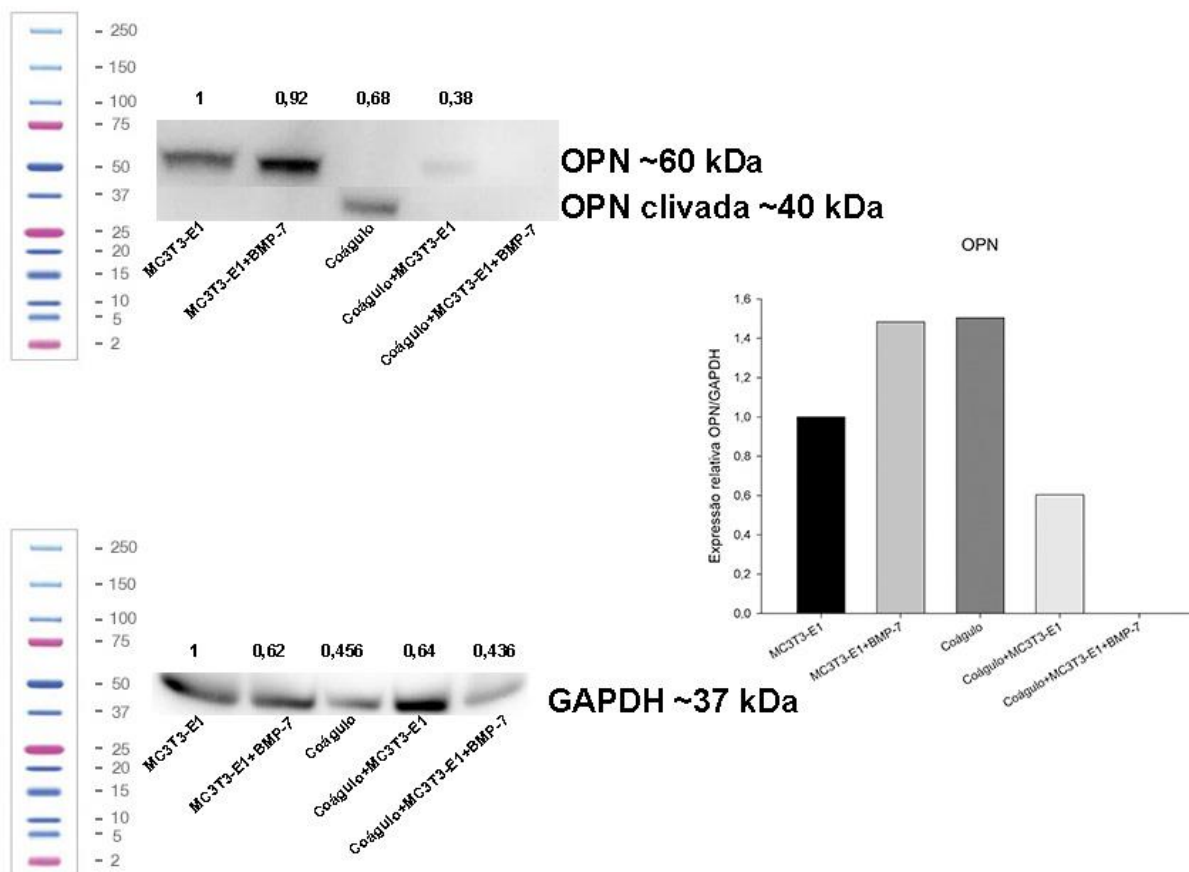
A SMAD 4 estava quantitativamente reduzida nas culturas MC3T3-E1 crescidas sobre o coágulo sanguíneo em comparação com aquelas diretamente sobre Nano-Ti e naquelas expostas à funcionalização com BMP-7, com quantidades não detectáveis apenas para o grupo com coágulo sanguíneo. SMAD 4 com peso molecular menor do que o de sua forma nativa foi detectada apenas no grupo Coágulo (Figura 28).

Figura 25 - Western Blot para detecção e quantificação de RUNX2, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de RUNX2 e de GAPDH relativa à membrana de RUNX2. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de RUNX2, normalizadas pela proteína GAPDH. (MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) Coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7.



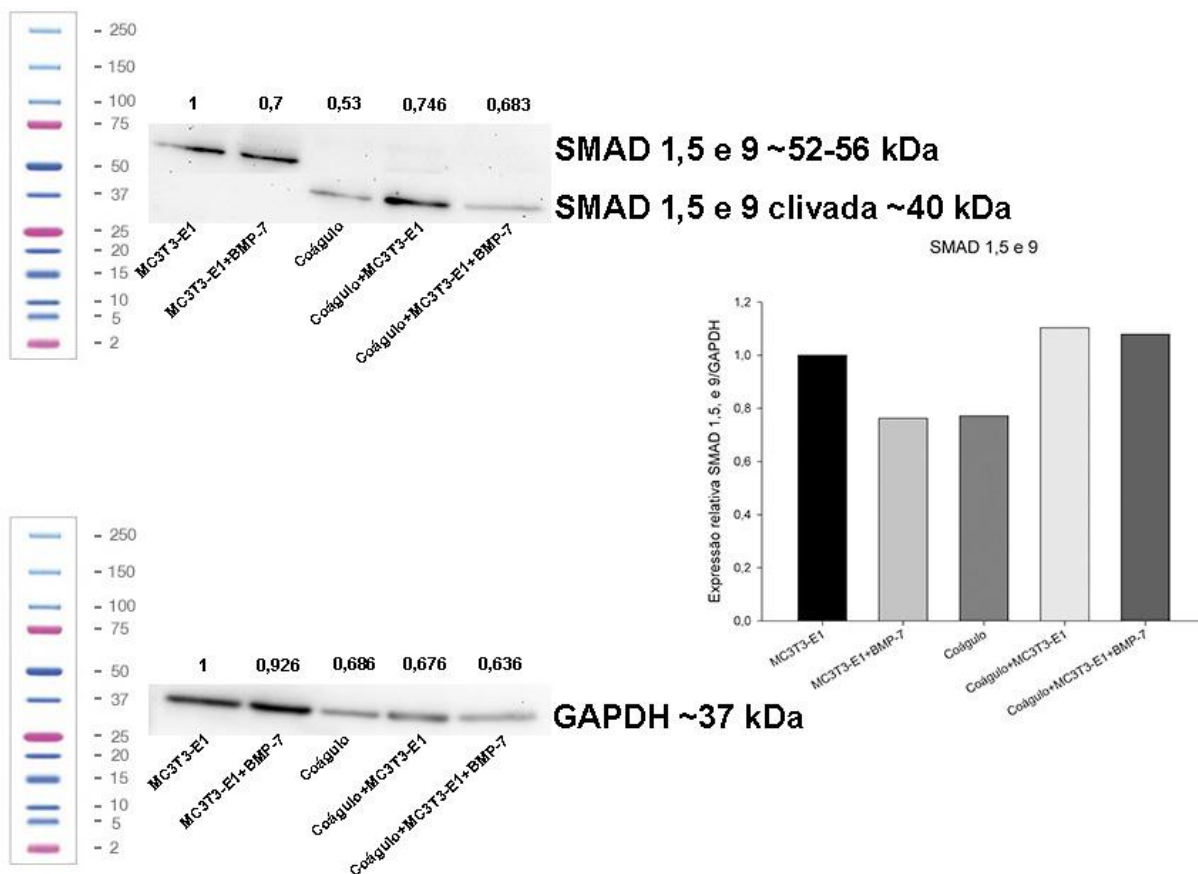
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 26 - Western Blot para detecção e quantificação de OPN, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de OPN e de GAPDH relativa à membrana de OPN. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de OPN, normalizadas pela proteína GAPDH. (MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) Coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7.



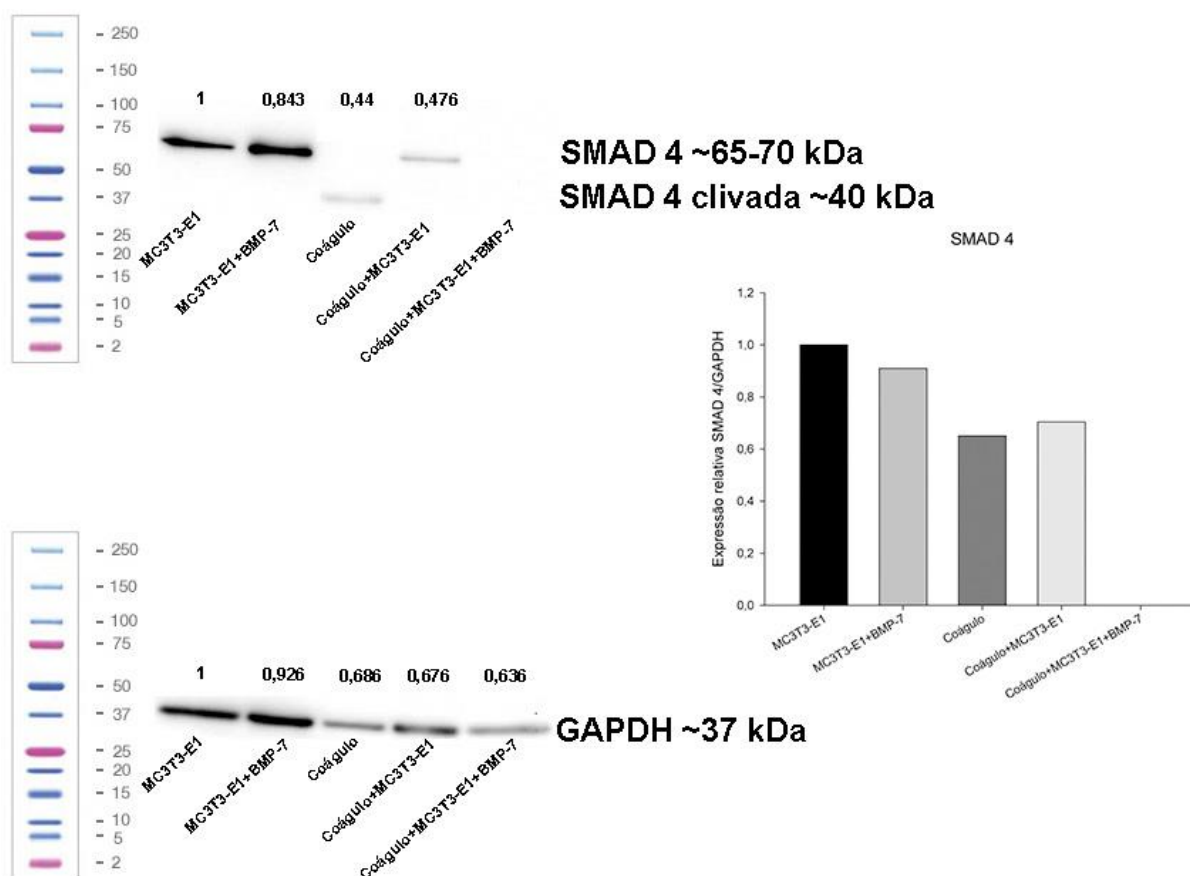
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 27 - Western Blot para detecção e quantificação do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e de GAPDH relativa à membrana de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada, normalizadas pela proteína GAPDH. (MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) Coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 28 - Western Blot para detecção e quantificação de SMAD 4, utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Marcações de SMAD 4 e de GAPDH relativa à membrana de SMAD 4. O gráfico apresenta a quantificação, por número de pixels, das bandas de SMAD 4, normalizadas pela proteína GAPDH. (MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7; (Coágulo) Coágulo sanguíneo *ex vivo*, obtido de camundongos GFP positivos, sobre Nano-Ti; (Coágulo+MC3T3-E1) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti na ausência de BMP-7; (Coágulo+MC3T3-E1+BMP-7) Cultura MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo 1

Os resultados do Estudo 1 mostraram que células osteoblásticas *in vitro* apresentam responsabilidades diferentes às concentrações de BMP-7 de 40 ng/mL e 200 ng/mL em meio de cultura quando crescidas sobre superfícies de titânio com topografias distintas na nanoescala. Enquanto que efeitos osteogênicos significativos foram observados sobre Ti Controle em relação aos parâmetros proliferação celular, expressão dos genes avaliados- *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Bsp*, *Opn* e *Smad 1*, e atividade de ALP *in situ*, sobre Nano-Ti o estímulo à diferenciação osteogênica foi notado apenas com o aumento da expressão de *Alp*, *Bsp* e *Opn* e da atividade de ALP *in situ*; majoritariamente, esses efeitos ocorriam já com a exposição das culturas celulares a 40 ng/mL de BMP-7. A análise de mineralização das culturas revelou que a exposição a 40 ng/mL de BMP-7 não alterava o seu potencial osteogênico tanto em Ti Controle como em Nano-Ti, enquanto que a de 200 ng/mL promovia a sua redução, da ordem de 40%.

O estímulo à diferenciação osteogênica na região interfacial de implantes osseointegráveis por meio de diferentes estratégias tem sido um dos objetivos principais da Implantodontia ao longo das últimas décadas, sobretudo visando a aplicação dessa terapia em sítios de menor densidade óssea (TRUHLAR et al., 1997; WENG et al., 2003; GANELES et al., 2008; JAVED; ROMANOS, 2010). Em nosso estudo *in vitro*, optamos por disponibilizar BMP-7 no meio de cultura, em duas concentrações distintas, durante a fase inicial de proliferação de células da linhagem MC3T3-E1, de fenótipo pré-osteoblástico (WANG et al., 1999), avaliando seus efeitos sobre parâmetros osteogênicos chaves no contexto do crescimento das culturas sobre topografias distintas na nanoescala. As concentrações utilizadas, de 40 e 200 ng/mL, foram definidas com base em estudos de cultura de células em diferentes modelos, disponibilizando para células osteoblásticas a BMP-7 em meio de cultura em concentrações que variavam entre 10 e 400 ng/mL, com efeitos estimuladores e/ou inibidores da diferenciação osteogênica, predominando os estimuladores até 200 ng/mL, quando os resultados passam a ser controversos (MALIAKAL et al., 1994; TOGASHI et al., 2007; 2009; KANN et al., 2009; ZHANG et

al., 2012; TAN et al., 2013; CIRANO et al., 2014; BARANOWSKI et al., 2016), com relatos de efeitos inibidores entre 200 e 400 ng/mL (ZHANG et al., 2012).

A estratégia de avaliar os efeitos da BMP-7 sobre Nano-Ti baseou-se em estudos anteriores de nosso grupo, que revelaram que células osteogênicas mostravam maior responsividade a BMP-2 exógena e maior produção de BMP-2 endógena quando crescidas sobre esta nanotopografia (KATO et al., 2014; M S CASTRO-RAUCCI et al., 2016). Nossos resultados mostraram que nas condições *in vitro* utilizadas, os efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre células MC3T3-E1, semelhantes aos observados por Zhang et al. (2012) sobre poliestireno, foram mais expressivos sobre Ti Controle, ainda que inequívocos também para Nano-Ti. Uma possível explicação para esses achados baseia-se no fato de serem reconhecidos os efeitos de potencialização da osteogênese proporcionados por Nano-Ti *per se* (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; ROSA et al., 2014), como revelados com a comparação entre os grupos destituídos de BMP-7 em relação à atividade proliferativa, expressão de *Runx2*, *Osx*, *Opn*, quantificação de OPN e de matriz mineralizada. Assim, o estímulo à diferenciação osteogênica proporcionado pela disponibilização de BMP-7 poderia ser considerado mais expressivo sobre Ti Controle do que sobre Nano-Ti, o que está de acordo com o conceito de que se esperam benefícios relevantes também com a funcionalização de superfícies de Ti planas na micro e nanoescala (discutido em PEREIRA et al., 2013). No entanto, estratégias de funcionalização de superfície com moléculas bioativas como a BMP-7, desejáveis para aplicações *in vivo* visando a benefícios à formação óssea na região interfacial, deverão considerar vantagens adicionais de se utilizarem superfícies de Ti modificadas na micro e/ou nanoescala, como por exemplo o controle da extensão da área superficial, com efeito direto sobre a quantidade de moléculas bioativas disponibilizadas.

A avaliação de marcadores osteoblásticos chave em nosso estudo permitiu identificar, apenas para *Opn*, um progressivo aumento da expressão de RNAm com o aumento da concentração de BMP-7 sobre as duas superfícies de Ti, em parte correspondendo com os dados de detecção proteica por Western Blot, o que permitiria utilizá-la como um marcador de responsividade à BMP-7 em nosso modelo. Entretanto, ainda que seja amplamente reconhecida a importância dessa proteína multifuncional para a aquisição do fenótipo osteogênico (CAO; CHEN, 2005), deve-se ressaltar que a sua sobre-expressão em células MC3T3-E1 resulta

em inibição da diferenciação osteoblástica *in vitro*, como demonstrado por Huang et al. (2004).

Com o objetivo de detectar a ativação de vias de sinalização de BMP-7 em células MC3T3-E1, procedemos à quantificação de RNAm para *Smad 1* e à detecção do complexo SMAD 1, 5 e 9 fosforilada. Com efeito, a expressão citoplasmática dessas SMADs está aumentada com a ativação de receptores de BMPs, e sua translocação para o núcleo resulta na transcrição de genes alvos críticos para a indução da diferenciação osteoblástica, como *Runx2* (MIYAZONO et al., 2010). Os nossos resultados não permitiram identificar uma correspondência direta entre a presença de BMP-7 no meio de cultura e os níveis de expressão de *Smad 1*, senão para as células crescidas sobre Ti Controle expostas a 40 ng/mL de BMP-7, o que não correspondia com a quantidade de SMAD 1, 5 e 9 fosforilada no mesmo tempo experimental; a redução na expressão de *Smad 1* na concentração de 200 ng/mL também não correspondeu aos resultados de Western Blot. Ainda que a literatura reconheça que a relação entre transcrição e tradução seja complexa e que pode haver a não correlação entre expressão de RNAm e da proteína que codifica (discutido em DE OLIVEIRA et al., 2008), os resultados obtidos surpreendem e devem ser objeto de análises futuras.

Para avaliar a aquisição do fenótipo osteogênico, optamos por utilizar a linhagem de células UMR-106 (PARTRIDGE et al., 1983; MIDURA et al., 1990), reconhecidamente competente para produzir matriz colágena e mineralizá-la em um curto período de cultura, de 7 dias. Com efeito, células UMR-106 encontram-se em estágio mais avançado de diferenciação osteoblástica se comparadas às MC3T3-E1 (PARTRIDGE et al., 1983; KIM et al., 2005). Mantendo o mesmo protocolo de exposição às concentrações de BMP-7 de 40 e 200 ng/mL, os resultados não revelaram benefícios à diferenciação osteogênica, senão por uma discreta tendência, da ordem de 10%, à maior mineralização sobre Ti Controle quando as células eram expostas à BMP-7 a 40 ng/mL; para ambas as superfícies, a redução no potencial osteogênico das culturas foi marcante quando expostas à BMP-7 a 200 ng/mL. Esses resultados não são surpreendentes quando se considera o sistema *in vitro* utilizado, em que não há renovação da população celular ao longo do período de seu cultivo. Como a BMP-7 reduz a capacidade proliferativa de células MC3T3-E1, como observado em nosso estudo e por Zhang et al. (2012), o que resulta em tendência a populações celulares menores com o aumento da concentração de

BMP-7 no meio, é lícito supor que esse efeito ocorreria também em células UMR-106, limitando a extensão de formações de matriz mineralizada. Ressalte-se, no entanto, que esse fenômeno deve ser atenuado em modelos biológicos *in vivo* de reparo ósseo, em que ocorre renovação celular e os efeitos da disponibilização de BMP-7 reconhecidamente resultam em benefícios ao processo de neoformação óssea em contato com biomateriais (MANTRIPRAGADA; JAYASURIYA, 2016; ZANG et al., 2019). Nesse contexto, a concentração de BMP-7 exógena no meio extracelular da região interfacial durante o processo de reparo decorre de sua dessorção para o fluido intersticial, atingindo níveis inferiores aos da concentração utilizada para a funcionalização de superfícies de Ti em períodos subsequentes à implantação, o que deve ser levado em consideração em estratégias futuras de desenvolvimento de implantes metálicos funcionalizados com moléculas bioativas visando a aplicações clínicas.

6.2 Estudo 2

Os resultados do Estudo 2 mostraram que a presença do coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti inibe, durante a fase proliferativa de cultura de células MC3T3-E1, a expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica, com exceção para *Opn*, mantendo inalterada a de *Smad 1* e *Smad 4*. A funcionalização com BMP-7 resultou em tendência à maior diferenciação osteoblástica sobre o coágulo, mas em menor grau em comparação ao de culturas crescidas diretamente sobre Nano-Ti, o que foi corroborado pela quantificação de RUNX2, sem, no entanto, alterar a expressão das *Smads* avaliadas. Para as demais proteínas estudadas- OPN, SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e SMAD 4, notaram-se quantidades menores em culturas expostas à BMP-7, exceto para OPN quando as células cresciam diretamente sobre a superfície metálica. A forma clivada de OPN e bandas de menor peso molecular reconhecidas pelos anticorpos anti-SMAD 1, 5 e 9 fosforilada e anti-SMAD 4 foram observadas apenas na presença de coágulo sanguíneo.

Estudos sobre respostas de células eucarióticas quando em contato com biomateriais, funcionalizados ou não com moléculas bioativas, estabelecem a estratégia do cultivo bidimensional diretamente sobre suas superfícies, o que representa a quase totalidade dos experimentos *in vitro* publicados até o momento. No entanto, essa estratégia não leva em consideração a formação de coágulo

sanguíneo a partir do processo hemorrágico, cujos elementos, *in vivo*, são os primeiros a interagirem com a superfície do biomaterial no momento subsequente à sua implantação, com efeitos importantes durante a fase inicial do processo de reparo tecidual; a rede de fibrina que se estabelece dinamicamente, por exemplo, constitui-se em arcabouço transitório para a migração celular na região interfacial (DAVIES, 2003). Na literatura, observam-se iniciativas que passam a incluir, em diferentes modelos, esta formação, entre as quais a deposição de sangue humano total (KOPF et al., 2015), fibrinogênio e trombina (SPEAR et al., 2015) e fibrina (RAO et al., 2019). No modelo que utilizamos, adaptado de Monroe & Hoffman (2012) e utilizado pela primeira vez em estudos de biomateriais, obteve-se a formação fisiológica de coágulo sanguíneo, incluindo rede de fibrina com as quais plaquetas, hemácias e leucócitos interagem, como observado nos resultados das análises morfológicas por epifluorescência e MEV.

Em nosso estudo, a inibição da expressão de marcadores-chaves de osteoblastos observada em células MC3T3-E1 crescidas sobre o coágulo sanguíneo *ex vivo* permite considerar que se apresentavam em menor grau de diferenciação quando comparadas com aquelas cultivadas diretamente sobre Nano-Ti, o que pode ser atribuído a diversos fatores e/ou elementos que constituem a estrutura do coágulo sanguíneo, atuando simultânea e/ou sequencialmente. Com efeito, estudos demonstram que a rede de fibrina, com sua estrutura tridimensional, pode estimular a proliferação de osteoblastos e inibir a sua diferenciação (SPEAR et al., 2015). Nesse contexto, a ativação de plaquetas resulta na liberação de fatores de crescimento, como TGF- β e isoformas de PDGF, cujos efeitos são mitogênicos sobre células pré-osteoblásticas e inibidores da mineralização óssea (DE OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVA et al., 2009; discutido em GIOVANINI et al., 2013). Além disso, é possível a participação de leucócitos no processo de diferenciação osteogênica (LORENZO et al., 2008). Como demonstrado *in vitro* por Bastian et al. (2018), neutrófilos inibem parâmetros indicativos da diferenciação de células derivadas da medula óssea humana, enquanto que em relação a linfócitos T, subtipos específicos estão relacionados ao estímulo (T helper 17) ou à inibição (CD8⁺) da formação óssea (discutido em CROES et al., 2016). O espriamento de leucócitos em sua interação com células MC3T3-E1, observado em nosso estudo, é sugestivo da modulação de seu estado funcional (OAKES et al., 2009), com potenciais efeitos parácrinos sobre células osteoblásticas.

No modelo *in vitro* que adaptamos, a funcionalização de Nano-Ti com BMP-7 apresentou resultados promissores, como no estudo de Baranowski et al. (2016). Diferentemente da inibição da expressão de marcadores osteoblásticos observada com a interação das células diretamente com a superfície de Nano-Ti, notou-se tendência ao estímulo da diferenciação osteoblástica na presença do coágulo sanguíneo, o que pode ser atribuído a estágios distintos de diferenciação que essas células assumiam nas duas condições, alterando sua responsividade à BMP-7 (CHEN et al., 1998; SENTA et al., 2009). Além disso, a ação de proteases presentes no coágulo sanguíneo, incluindo trombina e plasmina, possivelmente resultou em clivagem da BMP-7 funcionalizada (WAGNER et al., 2017), com potencial impacto na sinalização celular e atividade proliferativa durante as primeiras horas de cultivo celular. Essa interpretação é corroborada pelos resultados de Western Blot para SMADs relacionadas à sinalização de BMP-7, distintos daqueles obtidos para culturas crescidas diretamente sobre Nano-Ti, tanto em relação à sua quantidade, menor, como aos pesos moleculares referentes às suas bandas, menores, indicativos de sua degradação (SENTA et al., 2009). Dada a complexidade desse fenômeno, os mecanismos de sinalização de osteoblastos por BMP-7 na presença de coágulo sanguíneo deverão ser objeto de análises futuras.

No Estudo 1, a expressão de *Opn* mostrou-se regulada positivamente pela BMP-7 diluída em meio de cultura em células crescidas sobre Nano-Ti. Assim, os resultados de Western Blot para OPN no Estudo 2 devem ser analisados conjuntamente com os de expressão de seu RNAm e contextualizados com a interpretação de que as culturas sobre o coágulo sanguíneo *ex vivo* exibiam menor diferenciação osteoblástica em 5 dias. Quantidades relativamente altas de OPN em sua forma nativa (~60 kDa) nas culturas crescidas diretamente sobre Nano-Ti provavelmente estavam relacionadas à sua presença majoritária na matrix extracelular, considerando os níveis mínimos de expressão do RNAm correspondente, conseqüentemente mínimos da proteína em compartimentos citoplasmáticos. Por sua vez, no grupo Coágulo, notou-se a presença da forma clivada de OPN (~40 kDa), reconhecidamente resultado da ação de proteases séricas como a trombina e plasmina (CHRISTENSEN et al., 2010), o que não era detectável, mesmo se existente, após 5 dias de cultivo das células MC3T3-E1 sobre o coágulo sanguíneo. Os níveis altos de expressão de *Opn* observados nas culturas crescidas sobre coágulo sanguíneo na ausência de BMP-7 eram correspondentes

com a quantidade de OPN em sua forma nativa, a qual não foi detectada nas culturas sobre coágulo sanguíneo e expostas à BMP-7; nesse caso, a inibição de OPN, ainda que possivelmente transitória, permitiria a indução a um estágio mais adiantado de diferenciação osteoblástica (HUANG et al., 2004). Ressalte-se que as células MC3T3-E1 cultivadas sobre o coágulo sanguíneo estiveram submetidas, pelo menos nas primeiras horas pós-plaqueamento, a formas clivadas de OPN (RANGASWAMI et al., 2006), não avaliadas em nossos experimentos, as quais modulam processos de sinalização celular via integrinas (CHRISTENSEN et al., 2012).

Em conclusão, os resultados do presente estudo, avaliando a resposta de células MC3T3-E1 à superfície de Nano-Ti funcionalizada com BMP-7, mostraram efeitos importantes da formação de coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre parâmetros osteogênicos *in vitro* e a relevância da disponibilização de fatores de crescimento como a BMP-7, por funcionalização de superfície, na indução da diferenciação osteoblástica. O modelo experimental que adaptamos deverá contribuir para estudos futuros de respostas de osteoblastos a biomateriais funcionalizados com moléculas bioativas, orgânicas e/ou inorgânicas, proporcionando condições *in vitro* que se assemelhem a fenômenos fisiológicos que ocorrem em modelos animais.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A disponibilização de BMP-7 em meio de cultura para células MC3T3-E1 durante sua fase proliferativa alterou o perfil de expressão de marcadores osteoblásticos chave já para a concentração de 40 ng/mL, indicativo de aquisição de um estágio mais avançado de diferenciação osteoblástica, com efeitos mais pronunciados em superfície de Ti Controle quando comparados aos obtidos sobre Nano-Ti;
2. Dos marcadores osteoblásticos utilizados, a *Opn* foi a única a exibir aumento da sua expressão correspondente ao aumento da concentração de BMP-7 no meio de cultura, sobretudo para Nano-Ti;
3. O potencial osteogênico de células UMR-106 sobre Ti Controle e Nano-Ti, determinado pelo ensaio de mineralização, manteve-se inalterado com a exposição à BMP-7 a 40 ng/mL e reduziu-se com BMP-7 a 200 ng/mL;
4. A formação de coágulo sanguíneo *ex vivo* sobre Nano-Ti reduziu a diferenciação de células MC3T3-E1 durante sua fase proliferativa, com tendência a uma reversão para o estímulo à diferenciação osteoblástica com a funcionalização de BMP-7;
5. Tomados em conjunto, os efeitos da disponibilização de BMP-7 sobre a diferenciação de células osteogênicas *in vitro* variam substancialmente com a concentração do fator de crescimento no meio extracelular, o substrato sobre o qual as culturas se desenvolvem e a presença de coágulo sanguíneo formado *in vivo*, o que deve ser considerado em estudos futuros de interação de osteoblastos com biomateriais funcionalizados com molécula(s) bioativa(s).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, R.; BABAJI, P.; NATHAN, S.S.; ATTOKARAN, G.; SANTOSH KUMAR, S.M.; SATHNOORKAR S. Comparative clinicoradiographical evaluation of effect of aminobisphosphonate (sodium alendronate) on peri-implant bone status: Controlled clinical trial. **J Int Soc Prev Community Dent**, v. 6, p. 285-90, 2016.
- ANITUA, E.; PRADO, R.; ORIVE, G.; TEJERO, R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, p. 969-80, 2015.
- BARANOWSKI, A.; KLEIN, A.; RITZ, U.; ACKERMANN, A.; ANTHONISSEN, J.; KAUFMANN, K.B.; BRENDDEL, C.; GÖTZ, H.; ROMMENS, P.M.; HOFMANN, A. Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein. **PLoS One**, v. 11, e0153978, 2016.
- BASTIAN, O.W.; CROES, M.; ALBLAS, J.; KOENDERMAN, L.; LEENEN, L.P.H.; BLOKHUIS, T.J. Neutrophils inhibit synthesis of mineralized extracellular matrix by human bone marrow-derived stromal cells in vitro. **Front Immunol**, v. 9, 945, 2018.
- BEGAM, H.; NANDI, S.K.; KUNDU, B.; CHANDA, A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 70, p. 856-69, 2017.
- BEI, K.; DU, Z.; XIONG, Y.; LIAO, J.; SU, B.; WU, L. BMP7 can promote osteogenic differentiation of human periosteal cells in vitro. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 8845-51, 2012.
- BENGLIS, D.; WANG, M.Y.; LEVI, A.D. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. **Neurosurgery**, v. 62, p. 423-31, 2008.
- BEUTNER, R.; MICHAEL, J.; SCHWENZER, B.; SCHARNWEBER, D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. **J R Soc Interface**, v. 7, p. S93-S105, 2010.
- BOUCHARD, B.A.; TRACY, P.B. Platelets, leukocytes, and coagulation. **Curr Opin Hematol**, v. 8, p. 263-9, 2001.
- BRAGDON, B.; MOSEYCHUK, O.; SALDANHA, S.; KING, D.; JULIAN, J.; NOHE, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. **Cell Signal**, v. 23, p. 609-20, 2011.

- BROEGE, A.; PHAM, L.; JENSEN, E.D.; EMERY, A.; HUANG, T.H.; STEMIG, M.; BEPPU, H.; PETRYK, A.; O'CONNOR, M.; MANSKY, K.; GOPALAKRISHNAN, R. Bone morphogenetic proteins signal via SMAD and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways at distinct times during osteoclastogenesis. **J Biol Chem**, v. 288, p. 37230-40, 2013.
- BROWN, P.T.; SQUIRE, M.W.; LI, W.J. Characterization and evaluation of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. **Cell Tissue Res**, v. 358, p. 149-64, 2014.
- BRUNSKI, J.B.; PULEO, D.A.; NANCI, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, p. 15-46, 2000.
- BUENO, R. B.; ADACHI, P.; CASTRO-RAUCCI, L.M.; ROSA, A.L.; NANCI, A.; OLIVEIRA, P.T. Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promotes production and extracellular accumulation of osteopontin. **Braz Dent J**, v. 22, p. 179-84, 2011.
- BUENO, R.B.; TEIXEIRA, L.N.; DE ALMEIDA A.L.; SOARES, A.C.; BELOTI, M.M.; SVERZUT, C.E.; DE OLIVEIRA O.N.; NANCI, A.; ROSA, A.L.; TAMBASCO DE OLIVEIRA P. Growth and differentiation factor 5 (GDF-5)-functionalized, nanostructured titanium surfaces: in vitro and in vivo studies. **Front Bioeng Biotechnol**, Conference Abstract, 10th World Biomaterials Congress, 2016, Montréal. doi: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.00071.
- CAO, X.; CHEN, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. **Gene**, v. 357, p. 1-8, 2005.
- CECCHI, S.; BENNET, S.J.; ARORA, M. Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing. **J Orthop Translat**, v. 4, p. 28-34, 2015.
- CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocr Rev**, v. 23, p. 787-823, 2002.
- CHEN, D.; JI, X.; HARRIS, M.A.; FENG, J.Q.; KARSENTY, G.; CELESTE, A.J.; ROSEN, V.; MUNDY, G.R.; HARRIS, S.E. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. **J Cell Biol**, v. 142, p. 295-305, 1998.
- CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, v. 22, p. 233-41, 2004.

- CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y.P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **Int J Biol Sci**, v. 8, p. 272-88, 2012.
- CHRISTENSEN, B.; KLÄNING, E.; NIELSEN, M.S.; ANDERSEN, M.H.; SØRENSEN, E.S. C-terminal modification of osteopontin inhibits interaction with the α V β 3-integrin. **J Biol Chem**, v. 287, p. 3788-97, 2012.
- CHRISTENSEN, B.; SCHACK, L.; KLÄNING, E.; SØRENSEN, E.S. Osteopontin is cleaved at multiple sites close to its integrin-binding motifs in milk and is a novel substrate for plasmin and cathepsin D. **J Biol Chem**, v. 285, p. 7929-37, 2010.
- CICIONE, C.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; HERMIDA-GÓMEZ, T.; FUENTES-BOQUETE, I.; DÍAZ-PRADO, S.; BLANCO, F.J. Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: transforming growth factor- β superfamily. **Cell Tissue Bank**, v. 16, p. 195-207, 2014.
- CIRANO, F.R.; TOGASHI, A.; MARQUES, M.; PUSTIGLIONI, F.; LIMA, L. Role of rhBMP-2 and rhBMP-7 in the metabolism and differentiation of osteoblast-like cells cultured on chemically modified titanium surfaces. **J Oral Implantol**, v. 40, p. 655-9, 2014.
- COSTA, D.G.; FERRAZ, EP, ABUNA, R.P.F.; DE OLIVEIRA, P.T.; MORRA, M.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. The effect of collagen coating on titanium with nanotopography on in vitro osteogenesis. **J Biomed Mater Res A**, v. 105, p. 2783-8, 2017.
- CROES, M.; ÖNER, F.C.; VAN NEERVEN, D.; SABIR, E.; KRUYT, M.C.; BLOKHUIS, T.J.; DHERT, W.J.A.; ALBLAS, J. Proinflammatory T cells and IL-17 stimulate osteoblast differentiation. **Bone**, v. 84, p. 262-70, 2016.
- DAVIES, J.E. Understanding peri-implant endosseous healing. **J Dent Educ**, v. 67, p. 932-49, 2003.
- DE OLIVA, M.A.; MAXIMIANO, W.M.; DE CASTRO. L.M.; DA SILVA, P.E. JR, FERNANDES, R.R.; CIANCAGLINI, P.; BELOTI M.M.; NANJI, A.; ROSA, A.L.; DE OLIVEIRA, P.T. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. **J Histochem Cytochem**, v. 57, p. 265-76, 2009.
- DE OLIVEIRA, P.T.; DE OLIVA, M.A.; MAXIMIANO, W.M.; SEBASTIÃO. K.E.; CRIPPA, G.E.; CIANCAGLINI, P.; BELOTI, M.M.; NANJI, A.; ROSA, A.L. 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**, v. 56, p. 629-38, 2008.

- DE OLIVEIRA, P.T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, p. 403-13, 2004.
- DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L.; NANJI, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J Biomed Mater Res A**, v. 80, p. 554-64, 2007.
- DUNN, C.A.; JIN, Q.; TABA, M. JR; FRANCESCHI, R.T.; BRUCE RUTHERFORD, R.; GIANNOBILE, W.V. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects. **Mol Ther**, v. 11, p. 294-9, 2005.
- ELIAS, K.L.; PRICE, R.L.; WEBSTER, T.J. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. **Biomaterials**, v. 23, p. 3279-87, 2002.
- ERIKSSON, C.; NYGREN, H. Polymorphonuclear leukocytes in coagulating whole blood recognize hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces by different adhesion receptors and show different patterns of receptor expression. **J Lab Clin Med**, v. 137, p. 296-302, 2001.
- ERIKSSON, C.; NYGREN, H.; OHLSON, K. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. **Biomaterials**, v. 25, p. 4759-66, 2004.
- FERRARIS, S.; CAZZOLA, M.; ZUARDI, L.R.; TAMBASCO DE OLIVEIRA, P. Metal nanoscale systems functionalized with organic compounds. In: Guarino, V.; Lafisco, M.; Spriano, S. **Nanostructured biomaterials for regenerative medicine**. 1. ed. Elsevier, Amsterdã, 2020. Cap. 15, p. 407-36.
- GANELES, J.; ZÖLLNER, A.; JACKOWSKI, J.; TEN BRUGGENKATE, C.; BEAGLE, J.; GUERRA, F. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, p. 1119-28, 2008.
- GARCIA, A.J.; REYES, C.D. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. **J Dent Res**, v. 84, p. 407-13, 2005.
- GIANNOBILE, W.V.; RYAN, S.; SHIH, M.S.; SU, D.L.; KAPLAN, P.L.; CHAN, T.C. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. **J Periodontol**, v. 69, p. 129-37, 1998.

- GIOVANINI, A.F.; DELIBERADOR, T.M.; TANNURI NEMETH, J.E.; CRIVELLARO, V.R.; PORTELA, G.S.; DE OLIVEIRA FILHO, M.A.; DE ARAUJO, M.R.; ZIELAK, J.C.; GONZAGA, C.C. Leukocyte-platelet-rich plasma (L-PRP) impairs the osteoconductive capacity of the autograft associated to changes in the immunolocalization of TGF- β 1 and its co-expression with Wnt10b and CD34 cells. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 41, p. 180-6, 2013.
- GITTENS, R.A.; SCHEIDELER, L.; RUPP, F.; HYZY, S.L.; GEIS-GERSTORFER, J.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects. **Acta Biomater**, v. 10, p. 2907-18, 2014.
- GOMEZ-PUERTO, M.C.; IYENGAR, P.V.; GARCÍA DE VINUESA, A.; TEN DIJKE, P.; SANCHEZ-DUFFHUES, G. Bone morphogenetic protein receptor signal transduction in human disease. **J Pathol**, v. 247, p. 9-20, 2019.
- GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, v. 329, p. 77-84, 2004.
- HO, S.K.; PEEL, S.A.; HU, Z.M.; SÁNDOR, G.K.; CLOKIE, C.M. Augmentation of the maxillary sinus: comparison of bioimplants containing bone morphogenetic protein and autogenous bone in a rabbit model. **J Can Dent Assoc**, v. 76, a108, 2010.
- HUANG, H.H.; CHEN, J.Y.; LIN, M.C.; WANG, Y.T.; LEE, T.L.; CHEN, L.K. Blood responses to titanium surface with TiO₂ nano-mesh structure. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 379-83, 2012.
- HUANG, W.; CARLSEN, B.; RUDKIN, G.; BERRY, M.; ISHIDA, K.; YAMAGUCHI, D.T.; MILLER, T.A. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. **Bone**, v. 34, p. 799-808, 2004.
- HYZY, S.L.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; HUTTON, D.L.; TAN, C.; BOYAN, B.D.; SCHWARTZ, Z. Microstructured titanium regulates interleukin production by osteoblasts, an effect modulated by exogenous BMP-2. **Acta Biomater**, v. 9, p. 5821-9, 2013.
- JAVED, F.; ROMANOS, G.E. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. **J Dent**, v. 38, p. 612-20, 2010.
- JUNKER, R.; DIMAKIS, A.; THONEICK, M.; JANSEN, J.A. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, p. 185-206, 2009.

- KANN, S.; CHIU, R.; MA, T.; GOODMAN, S.B. OP-1 (BMP-7) stimulates osteoprogenitor cell differentiation in the presence of polymethylmethacrylate particles. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, p. 485-8, 2010.
- KASHIWAGI, K.; TSUJI, T.; SHIBA, K. Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces. **Biomaterials**, v. 30, p. 1166-75, 2009.
- KATO, R.B.; ROY, B.; DE OLIVEIRA, F.S.; FERRAZ, E.P.; DE OLIVEIRA, P.T.; KEMPER, A.G.; HASSAN, M.Q.; ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. **J Cell Physiol**, v. 229, p. 1690-6, 2014.
- KAWABATA, M.; IMAMURA, T.; MIYAZONO, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 9, p. 49-61, 1998.
- KIM, E.C.; KIM, T.H.; JUNG, J.H.; HONG, S.O.; LEE, D.W. Enhanced osteogenic differentiation of MC3T3-E1 on rhBMP-2-immobilized titanium via click reaction. **Carbohydr Polym**, v. 103, p. 170-8, 2014.
- KIM, H.J.; IM, G.I. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Eng Part A**, v. 15, p. 1543-51, 2009.
- KIM, S.W.; HER, S.J.; PARK, S.J.; KIM, D.; PARK, K.S.; LEE, H.K.; HAN, B.H.; KIM, M.S.; SHIN, C.S.; KIM, S.Y. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Bone**, v. 37, p. 359-69, 2005.
- KOPF, B.S.; SCHIPANSKI, A.; ROTTMAR, M.; BERNER, S.; MANIURA-WEBER, K. Enhanced differentiation of human osteoblasts on Ti surfaces pre-treated with human whole blood. **Acta Biomater**, v. 19, p. 180-90, 2015.
- LAI, M.; CAI, K.; ZHAO, L.; CHEN, X.; HOU, Y.; YANG, Z. Surface functionalization of TiO₂ nanotubes with bone morphogenetic protein 2 and its synergistic effect on the differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1097-105, 2011.
- LAI, M.; JIN, Z.; SU, Z. Surface modification of TiO₂ nanotubes with osteogenic growth peptide to enhance osteoblast differentiation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 73, p. 490-7, 2017.
- LAVERY, K.; SWAIN, P.; FALB, D.; ALAOU-ISMALI, M.H. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Biol Chem**, v. 283, p. 20948-58, 2008.

- LE GUEHENNEC, L.; MARTIN, F.; LOPEZ-HEREDIA, M.A.; LOUARN, G.; AMOURIQ, Y.; COUSTY, J.; LAYROLLE, P. Osteoblastic cell behavior on nanostructured metal implants. **Nanomedicine (Lond)**, v. 3, p. 61-71, 2008.
- LEE, S.W.; HAHN, B.D.; KANG, T.Y.; LEE, M.J.; CHOI, J.Y.; KIM, M.K.; KIM, S.G. Hydroxyapatite and collagen combination-coated dental implants display better bone formation in the peri-implant area than the same combination plus bone morphogenetic protein-2-coated implants, hydroxyapatite only coated implants, and uncoated implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, p. 53-60, 2014.
- LI, Y.; LI, B.; SONG, Y.; MA, A.; LI, C.; ZHANG, X.; LI, H.; ZHANG, Q.; ZHANG, K. Improved osteoblast adhesion and osseointegration on TiO₂ nanotubes surface with hydroxyapatite coating. **Dent Mater J**, v. 38, p. 278-86, 2018.
- LI, Y.; SONG, Y.; MA, A.; LI, C. Surface immobilization of TiO₂ nanotubes with bone morphogenetic protein-2 synergistically enhances initial preosteoblast adhesion and osseointegration. **Biomed Res Int**, v. 2019, 5697250, 2019.
- LIN, S.; SVOBODA, K.K.; FENG, J.Q.; JIANG, X. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. **Bone Res**, v. 4, 16005, 2016.
- LIN, Z.; RIOS, H.F.; VOLK, S.L.; SUGAI, J.V.; JIN, Q.; GIANNOBILE, W.V. Gene expression dynamics during bone healing and osseointegration. **J Periodontol**, v. 82, p. 1007-17, 2011.
- LIU, Y.; HUSE, R.O.; DE GROOT, K.; BUSER, D.; HUNZIKER, E.B. Delivery mode and efficacy of BMP- in association with implants. **J Dent Res**, v. 86, p. 84-9, 2007.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-8, 2001.
- LOLLOBRIGIDA, M.; MARITATO, M.; BOZZUTO, G.; FORMISANO, G.; MOLINARI, A.; DE BIASE, A. Biomimetic implant surface functionalization with liquid L-PRF products: in vitro study. **Biomed Res Int**, v. 2018, 9031435, 2018.
- LONG, J.; BADAL, S.S.; WANG, Y.; CHANG, B.H.; RODRIGUEZ, A.; DANESH, F.R. MicroRNA-22 is a master regulator of bone morphogenetic protein-7/6 homeostasis in the kidney. **J Biol Chem**, v. 288, p. 36202-14, 2013.
- LORD, M.S.; FOSS, M.; BESENBACHER, F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. **Nano Today**, v. 5, p. 66-78, 2010.

LORENZO, J.; HOROWITZ, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. **Endocr Rev**, v. 29, p. 403-40, 2008.

LUTZ, R.; SROUR, S.; NONHOFF, J.; WEISEL, T.; DAMIEN, C.J.; SCHLEGEL, K.A. Biofunctionalization of titanium implants with a biomimetic active peptide (P-15) promotes early osseointegration. **Clin Oral Implants Res**, v. 21, p. 726-34, 2010.

M.S. CASTRO-RAUCCI, L.; S. FRANCISCHINI, M.; N. TEIXEIRA, L.; P. FERRAZ, E.; B. LOPES, H.; T. DE OLIVEIRA, P.; HASSAN, M.Q.; LOSA, A.L.; BELOTI, M.M. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. **J Cell Biochem**, v. 117, p. 1718-26, 2016.

MALIAKAL, J.C.; ASAHINA, I.; HAUSCHKA, P.V.; SAMPATH, T.K. Osteogenic protein-1 (BMP-7) inhibits cell proliferation and stimulates the expression of markers characteristic of osteoblast phenotype in rat osteosarcoma (17/2.8) cells. **Growth Factors**, v. 11, p. 227-34, 1994.

MANTRIPRAGADA, V.P.; JAYASURIYA, A.C. Bone regeneration using injectable BMP-7 loaded chitosan microparticles in rat femoral defect. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 63, p. 596-608, 2016.

MARTINEZ, E.F.; ISHIKAWA, G.J.; DE LEMOS, A.B.; BARBOSA BEZERRA, F.J.; SPERANDIO, M.; NAPIMOGA, M.H. Evaluation of a titanium surface treated with hydroxyapatite nanocrystals on osteoblastic cell behavior: an in vitro study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 33, p. 597-602, 2018.

MAURER, T.; ZIMMERMANN, G.; MAURER, S.; STEGMAIER, S.; WAGNER, C.; HÄNSCH, G.M. Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. **Mediators Inflamm**, v. 2012, 171209, 2012.

MEIRELLES, L.; MELIN, L.; PELTOLA, T.; KJELLIN, P.; KANGASNIEMI, I.; CURRIE, F.; ANDERSSON, M.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. **Clin Implant Dent Relat Res**, v. 10, p. 245-54, 2008.

MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D.B.; ARAGÃO, F.J.; COOPER, L.F. The combination of micron and nanotopography by H(2)SO(4)/H(2)O(2) treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, p. 169-79, 2010.

MENDONÇA, G.; MENDONÇA, D.B.; SIMÕES, L.G.; ARAÚJO, A.L.; LEITE, E.R.; DUARTE, W.R.; COOPER, L.F.; ARAGÃO, F.J. Nanostructured alumina-coated implant surface: effect on osteoblast-related gene expression and bone-to-implant contact in vivo. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 24, p. 205-15, 2009.

- MIDURA, R.J.; MCQUILLAN, D.J.; BENHAM, K.J.; FISHER, L.W.; HASCALL, V.C. A rat osteogenic cell line (UMR 106-01) synthesizes a highly sulfated form of bone sialoprotein. **J Biol Chem**, v. 265, p. 5285-91, 1990.
- MILLERET, V.; TUGULU, S.; SCHLOTTING, F.; HALL, H. Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clot formation. **Eur Cell Mater**, v. 21, p. 430-44, 2011.
- MIYAZONO, K.; KAMIYA, Y.; MORIKAWA, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. **J Biochem**, v. 147, p. 35-51, 2010.
- MONROE, D.M.; HOFFMAN, M. The clotting system - a major player in wound healing. **Haemophilia**, v. 18, p. 11-6, 2012.
- MORRA, M.; CASSINELLI, C.; CASCARDO, G.; CAHALAN, P.; CAHALAN, L.; FINI, M.; GIARDINO, R. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. **Biomaterials**, v. 24, p. 4639-54, 2003.
- MORRA, M. Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins. **Eur Cell Mater**, v. 12, p. 1-15, 2006.
- MORRA, M. Biomolecular modification of implant surfaces. **Expert Rev Med Devices**, v. 4, p. 361-72, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NANCI, A.; WUEST, J.D.; PERU, L.; BRUNET, P.; SHARMA, V.; ZALZAL, S.; MCKEE, M.D. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. **J Biomed Mater Res**, v. 40, p. 324-35, 1998.
- NAYAK, S.; DEY, T.; NASKAR, D.; KUNDU, S.C. The promotion of osseointegration of titanium surfaces by coating with silk protein sericin. **Biomaterials**, v. 34, p. 2855-64, 2013.
- OAKES, P.W.; PATEL, D.C.; MORIN, N.A.; ZITTERBART, D.P.; FABRY, B.; REICHNER, J.S.; TANG, J.X. Neutrophil morphology and migration are affected by substrate elasticity. **Blood**, v. 114, p. 1387-95, 2009.

- OLIVARES-NAVARRETE, R.; HYZY, S.L.; PAN, Q.; DUNN, G.; WILLIAMS, J.K.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D. Osteoblast maturation on microtextured titanium involves paracrine regulation of bone morphogenetic protein signaling. **J Biomed Mater Res A**, v. 103, p. 1721-31, 2015.
- ORSINI, E.; SALGARELLO, S.; MARTINI, D.; BACCHELLI, B.; QUARANTA, M.; PISONI, L.; BELLEI, E.; JOECHLER, M.; OTTANI, V. Early healing events around titanium implant devices with different surface microtopography: a pilot study in an in vivo rabbit model. **Sci World J**, v. 2012, 349842, 2012.
- OTA-TSUZUKI, C.; DATTE, C.E.; NOMURA, K.A.; GOUVEA CARDOSO, L.A.; SHIBLI, J.A. Influence of titanium surface treatments on formation of the blood clot extension. **J Oral Implantol**, v. 37, p. 641-7, 2011.
- O'TOOLE, G.C.; SALIH, E.; GALLAGHER, C.; FITZPATRICK, D.; O'HIGGINS, N.; O'ROURKE, S.K. Bone sialoprotein-coated femoral implants are osteoinductive but mechanically compromised. **J Orthop Res**, v. 22, p. 641-6, 2004.
- PARTRIDGE, N.C.; ALCORN, D.; MICHELANGELI, V.P.; RYAN, G.; MARTIN, T.J. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. **Cancer Res**, v. 43, p. 4308-14, 1983.
- PENG, X.B.; ZHANG, Y.; WANG, Y.Q.; HE, Q.; YU, Q. IGF-1 and BMP-7 synergistically stimulate articular cartilage repairing in the rabbit knees by improving chondrogenic differentiation of bone-marrow mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem**, v. 120, p. 5570-82, 2019.
- PEREIRA, K.K.; ALVES, O.C.; NOVAES, A.B. JR.; DE OLIVEIRA, F.S.; YI, J.H.; ZANIQUELLI, O.; WOLF-BRANDSTETTER, C.; SCHARNWEBER, D.; VARIOLA, F.; NANJI, A.; ROSA, A.L.; DE OLIVEIRA, P.T. Progression of osteogenic cell cultures grown on microtopographic titanium coated with calcium phosphate and functionalized with a type I collagen-derived peptide. **J Periodontol**, v. 84, p. 1199-210, 2013.
- PRICE, R.L.; HABERSTROH, K.M.; WEBSTER, T.J. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. **Med Biol Eng Comput**, v. 41, p. 372-5, 2003.
- RAMMELT, S.; SCHULZE, E.; BERNHARDT, R.; HANISCH, U.; SCHARNWEBER, D.; WORCH, H.; ZWIPP, H.; BIEWENER, A. Coating of titanium implants with type-I collagen. **J Orthop Res**, v. 22, p. 1025-34, 2004.
- RANGASWAMI, H.; BULBULE, A.; KUNDU, G.C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. **Trends Cell Biol**, v. 16, p. 79-87, 2006.

- RAO, S.; HASHEMI ASTANEH, S.; VILLANUEVA, J.; SILVA, F.; TAKOUDIS, C.; BIJUKUMAR, D.; SOUZA, J.C.M.; MATHEW M.T. Physicochemical and in-vitro biological analysis of bio-functionalized titanium samples in a protein-rich medium. **J Mech Behav Biomed Mater**, v. 96, p. 152-64, 2019.
- RETTING, K.N.; SONG, B.; YOON, B.S.; LYONS, K.M. BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation. **Development**, v. 136, p. 1093-104, 2009.
- REZANIA, A.; JOHNSON, R.; LEFKOW, A.R.; HEALY, K.E. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. **Langmuir**, v. 15, p. 6931-9, 1999.
- RIEDEL, T.; SUTTNAR, J.; BRYNDA, E.; HOUSKA, M.; MEDVED, L.; DYR, J.E. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation. **Blood**, v. 117, p. 1700-6, 2011.
- ROESSLER, S.; BORN, R.; SCHARNWEBER, D.; WORCH, H.; SEWING, A.; DARD, M. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. **J Mater Sci Mater Med**, v. 12, p. 871-7, 2001.
- ROSA, A.L.; KATO, R.B.; CASTRO RAUCCI, L.M.; TEIXEIRA, L.N.; DE OLIVEIRA, F.S.; BELLESINI, L.S.; DE OLIVEIRA, P.T.; HASSAN, M.Q.; BELOTI, M.M. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha 1\beta 1$ integrin signaling pathway. **J Cell Biochem**, v. 115, p. 540-8, 2014.
- SALOU, L.; HOORNAERT, A.; LOUARN, G.; LAYROLLE, P. Enhanced osseointegration of titanium implants with nanostructured surfaces: an experimental study in rabbits. **Acta Biomater**, v. 11, p. 494-502, 2015.
- SCHARNWEBER, D.; BORN, R.; FLADE, K.; ROESSLER, S.; STOELZEL, M.; WORCH, H. Mineralization behaviour of collagen type I immobilized on different substrates. **Biomaterials**, v. 25, p. 2371-80, 2004.
- SCHLIEPHAKE, H.; AREF, A.; SCHARNWEBER, D.; BIERBAUM, S.; ROESSLER, S.; SEWING, A. Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. **Clin Oral Implants Res**, v. 16, p. 563-9, 2005.
- SCHOUTEN, C.; MEIJER, G.J.; VAN DEN BEUCKEN, J.J.; SPAUWEN, P.H.; JANSEN, J.A. Effects of implant geometry, surface properties, and TGF-beta1 on peri-implant bone response: an experimental study in goats. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, p. 421-9, 2009.

- SCHWARTZ FO, H.O.; NOVAES, A.B. JR; DE CASTRO, L.M.; ROSA, A.L.; DE OLIVEIRA, P.T. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, p. 333-44, 2007.
- SENTA, H.; PARK, H.; BERGERON, E.; DREVELLE, O.; FONG, D.; LEBLANC, E.; CABANA, F.; ROUX, S.; GRENIER, G.; FAUCHEUX, N. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, p. 213-22, 2009.
- SEVILLA, P.; VINING, K.V.; DOTOR, J.; RODRIGUEZ, D.; GIL, F.J.; APARICIO, C. Surface immobilization and bioactivity of TGF- β 1 inhibitor peptides for bone implant applications. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 104, p. 385-94, 2016.
- SHEKARAN, A.; GARCIA, A.J. Nanoscale engineering of extracellular matrix-mimetic bioadhesive surfaces and implants for tissue engineering. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, p. 350-60, 2011.
- SHIU, H.T.; GOSS, B.; LUTTON, C.; CRAWFORD, R.; XIAO, Y. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. **Tissue Eng Part B Rev**, v. 20, p. 697-712, 2014.
- SOUZA, J.C.M.; SORDI, M.B.; KANAZAWA, M.; RAVINDRAN, S.; HENRIQUES, B.; SILVA, F.S.; APARICIO, C.; COOPER, L.F. Nano-scale modification of titanium implant surfaces to enhance osseointegration. **Acta Biomater**, v. 94, p. 112-31, 2019.
- SPEAR, R.L.; SRIGENGAN, B.; NEELAKANTAN, S.; BOSBACH, W.; BROOKS, R.A.; MARKAKI, A.E. Physical and biological characterization of ferromagnetic fiber networks: effect of fibrin deposition on short-term in vitro responses of human osteoblasts. **Tissue Eng Part A**, v. 21, p. 463-74, 2015.
- SURMENEV, R.A.; SURMENEVA, M.A.; IVANOVA, A.A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis – a review. **Acta Biomater**, v. 10, p. 557-79, 2014.
- SUSIN, C.; QAHASH, M.; POLIMENI, G.; LU, P.H.; PRASAD, H.S.; ROHRER, M.D.; HALL, J.; WIKESJÖ, U.M. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-7(rhBMP-7/rhOP-1): histological observations. **J Clin Periodontol**, v. 37, p. 574-81, 2010.
- TAN, H.C.; POH, C.K.; CAI, Y.; WANG, W. Anti-fibrosis effect of BMP-7 peptide functionalization on cobalt chromium alloy. **J Orthop Res**, v. 31, p. 983-90, 2013.

- TANDON, A.; SHARMA, A.; RODIER, J.T.; KLIBANOV, A.M.; RIEGER, F.G.; MOHAN, R.R. BMP7 gene transfer via gold nanoparticles into stroma inhibits corneal fibrosis in vivo. **PLoS One**, v. 8, e66434, 2013.
- TEJERO, R.; ANITUA, E.; ORIVE, G. Toward the biomimetic implant surface: Biopolymers on titanium-based implants for bone regeneration. **Prog Polym Sci**, v. 39, p. 1406-47, 2014.
- TENG, F.Y.; TAI, I.C.; HO, M.L.; WANG, J.W.; WENG, L.W.; WANG, Y.J.; WANG, M.W.; TSENG, C.C. Controlled release of BMP-2 from titanium with electrodeposition modification enhancing critical size bone formation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 105, 109879, 2019.
- TOGASHI, A.Y.; CIRANO, F.R.; MARQUES, M.M.; PUSTIGLIONI, F.E.; DE LIMA, L.A. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. **J Appl Oral Sci**, v. 15, p. 442-7, 2007.
- TOGASHI, A.Y.; CIRANO, F.R.; MARQUES, M.M.; PUSTIGLIONI, F.E.; LANG, N.P.; LIMA, L.A. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rhBMP-7) on the viability, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells cultured on a chemically modified titanium surface. **Clin Oral Implants Res**, v. 20, p. 452-7, 2009.
- TOMAIUOLO, M.; BRASS, L.F.; STALKER, T.J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis. **Interv Cardiol Clin**, v. 6, p. 1-12, 2017.
- TOSATTI, S.; SCHWARTZ, Z.; CAMPBELL, C.; COCHRAN, D.L.; VANDEVONDELE, S.; HUBBELL, J.A.; DENZER, A.; SIMPSON, J.; WIELAND, M.; LOHMANN, C.H.; TEXTOR, M.; BOYAN, B.D. RGD-containing peptide GCRGYGRGDSPG reduces enhancement of osteoblast differentiation by poly(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)-coated titanium surfaces. **J Biomed Mater Res A**, v. 68, p. 458-72, 2004.
- TRUHLAR, R.S.; ORENSTEIN, I.H.; MORRIS, H.F.; OCHI, S. Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 55, p. 38-45, 1997.
- VAN DEN BERGH, J.P.; TEN BRUGGENKATE, C.M.; GROENEVELD, H.H.; BURGER, E.H.; TUINZING, D.B. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 in maxillary sinus floor elevation surgery in 3 patients compared to autogenous bone grafts. A clinical pilot study. **J Clin Periodontol**, v. 27, p. 627-36, 2000.

- VAN DEN DOLDER, J.; JANSEN, J.A. The response of osteoblast-like cells towards collagen type I coating immobilized by p-nitrophenylchloroformate to titanium. **J Biomed Mater Res A**, v. 83, p. 712-9, 2007.
- VETRONE, F.; VARIOLA, F.; DE OLIVEIRA P.T.; ZALZAL, S.F.; YI, J.H.; SAM, J.; BOMBONATO-PRADO, K.F.; SARKISSIAN, A.; PEREPICHKA, D.F.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANCI, A. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. **Nano Lett**, v. 9, p. 659-65, 2009.
- WAGNER, I.; WANG, H.; WEISSERT, P.M.; STRAUBE, W.L.; SHEVCHENKO, A.; GENTZEL, M.; BRITO, G.; TAZAKI, A.; OLIVEIRA, C.; SUGIURA, T.; SHEVCHENKO, A.; SIMON, A.; DRECHSEL, D.N.; TANAKA, E.M. Serum proteases potentiate BMP-induced cell cycle re-entry of dedifferentiating muscle cells during newt limb regeneration. **Dev Cell**, v. 40, p. 608-17, 2017.
- WANG, D.; CHRISTENSEN, K.; CHAWLA, K.; XIAO, G.; KREBSBACH, P.H.; FRANCESCHI, R.T. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. **J Bone Miner Res**, v. 14, p. 893-903, 1999.
- WANG, R.N.; GREEN, J.; WANG, Z.; DENG, Y.; QIAO, M.; PEABODY, M.; ZHANG, Q.; YE, J.; YAN, Z.; DENDULURI, S.; IDOWU, O.; LI, M.; SHEN, C.; HU, A.; HAYDON, R.C.; KANG, R.; MOK, J.; LEE, M.J.; LUU, H.L.; SHI, L.L. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes Dis**, v. 1, p. 87-105, 2014.
- WATSON, S.P. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. **Curr Pharm Des**, v. 15, p. 1358-72, 2009.
- WENG, D.; HOFFMEYER, M.; HÜRZELER, M.B.; RICHTER, E.J. Osseotite vs. machined surface in poor bone quality. A study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v. 14, p. 703-8, 2003.
- WIKESJÖ, U.M.; HUANG, Y.H.; XIROPAIDIS, A.V.; SORENSEN, R.G.; ROHRER, M.D.; PRASAD, H.S.; WOZNEY, J.M.; HALL, J. Bone formation at recombinant human bone morphogenetic protein-2-coated titanium implants in the posterior maxilla (Type IV bone) in non-human primates. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 992-1000, 2008.
- WU, M.; CHEN, G.; LI, Y.P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone Res**, v. 4, 16009, 2016.

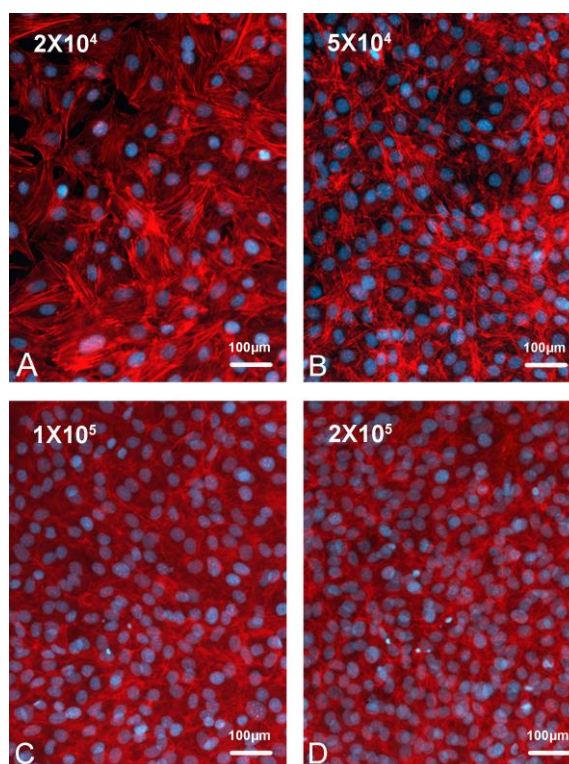
- YANG, G.L.; HE, F.M.; HU, J.A.; WANG, X.X.; ZHAO, S.F. Biomechanical comparison of biomimetically and electrochemically deposited hydroxyapatite-coated porous titanium implants. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 68, p. 420-7, 2010.
- YANG, G.L.; HE, F.M.; HU, J.A.; WANG, X.X.; ZHAO, S.F. Effects of biomimetically and electrochemically deposited nano-hydroxyapatite coatings on osseointegration of porous titanium implants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, p. 782-9, 2009.
- YANG, J.; ZHOU, Y.; WEI, F.; XIAO, Y. Blood clot formed on rough titanium surface induces early cell recruitment. **Clin Oral Implants Res**, v. 27, p. 1031-8, 2016.
- YAO, C.; SLAMOVICH, E.B.; WEBSTER, T.J. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. **J Biomed Mater Res A**, v. 85, p. 157-66, 2008.
- YI, J-H.; BERNARD, C.; VARIOLA, F.; ZALZAL, S.F.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANCI, A. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. **Surf Sci**, v. 60, p. 4613-21, 2006.
- YOON, B.S.; LYONS, K.M. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. **J Cell Biochem**, v. 93, p. 93-103, 2004.
- ZAKY, S.H.; CANCEDDA, R. Engineering craniofacial structures: facing the challenge. **J Dent Res**, v. 88, p. 1077-91, 2009.
- ZANG, S.; MU, R.; CHEN, F.; WEI, X.; ZHU, L.; HAN, B.; YU, H.; BI, B.; CHEN, B.; WANG, Q.; JIN, L. Injectable chitosan/ β -glycerophosphate hydrogels with sustained release of BMP-7 and ornidazole in periodontal wound healing of class III furcation defects. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 99, p. 919-28, 2019.
- ZHANG, F.; REN, L.F.; LIN, H.S.; YIN, M.N.; TONG, Y.Q.; SHI, G.S. The optimal dose of recombinant human osteogenic protein-1 enhances differentiation of mouse osteoblast-like cells: an in vitro study. **Arch Oral Biol**, v. 57, p. 460-8, 2012.

APÊNDICES

9 APÊNDICES

APÊNDICE A - *Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de lamínulas de Thermanox®*

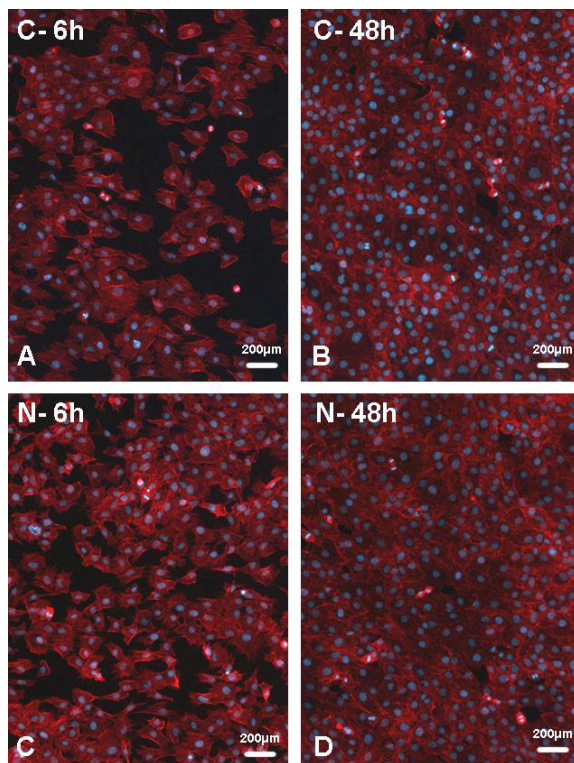
Figura 29 - Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de lamínulas de Thermanox®, em período de 48 h de cultura. Densidade de (A) 2×10^4 células/poço; (B) 5×10^4 células/poço; (C) 1×10^5 células/poço e (D) 2×10^5 células/poço. Fluorescência direta para detecção do citoesqueleto de actina (em vermelho) e núcleos celulares (azul). Note-se progressivo aumento do número de células com o aumento da densidade de plaqueamento. Objetiva de 20X



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

APÊNDICE B - Cultura de células MC3T3-E1 sobre superfície de titânio

Figura 30 - Cultura de células MC3T3-E1 na densidade de plaqueamento de 5×10^4 células/poço em discos de Ti Controle (A e B) e Nano-Ti (C e D) nos tempos de 6 h (A e C) e 48 h (B e D). Fluorescência direta para detecção do citoesqueleto de actina (em vermelho) e núcleos celulares (azul). Note-se aumento da população celular para os dois substratos em 48 h. Objetiva de 10X.

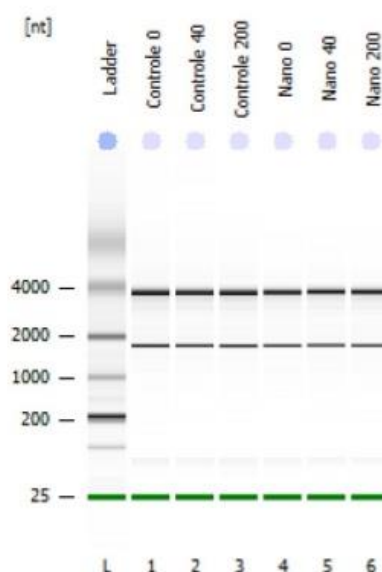


Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

APÊNDICE C - Integridade do RNA referente ao Estudo 1

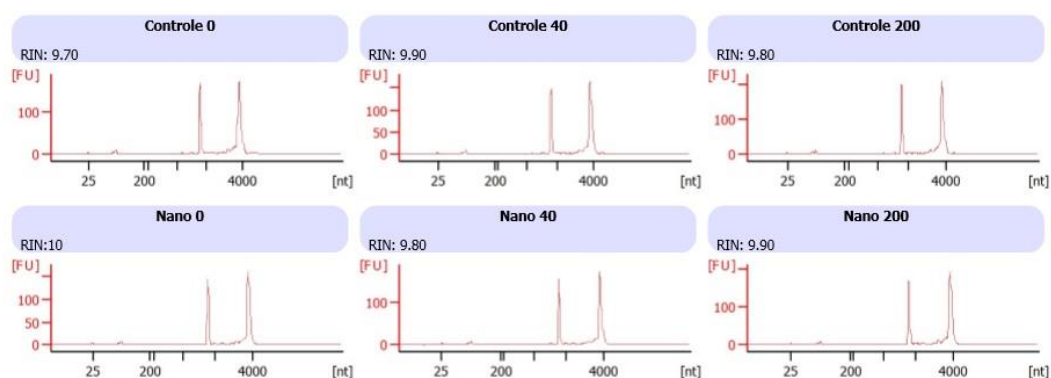
Figura 31 - Integridade do RNA ribossômico. Amostras: (Ladder) Padrão. (Controle 0) Ti Controle sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Controle 40) Ti Controle com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Controle 200) Ti Controle com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 0) Nano-Ti sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Nano 40) Nano-Ti com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 200) Nano-Ti com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio.

Electrophoresis File Run Summary



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 32 - Eletroferograma do gel de integridade do RNA ribossômico. Presença dos picos referentes às bandas 18S e 28S. (Controle 0) Ti Controle sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Controle 40) Ti Controle com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Controle 200) Ti Controle com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 0) Nano-Ti sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Nano 40) Nano-Ti com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 200) Nano-Ti com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 33 - Escores de RIN para amostras: (Controle 0) Ti Controle sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Controle 40) Ti Controle com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Controle 200) Ti Controle com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 0) Nano-Ti sem suplementação de BMP-7 ao meio. (Nano 40) Nano-Ti com suplementação de 40 ng/mL de BMP-7 ao meio. (Nano 200) Nano-Ti com suplementação de 200 ng/mL de BMP-7 ao meio.

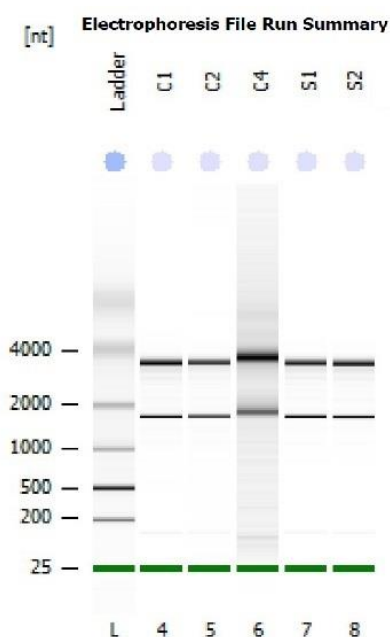
Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
Controle 0		✓	RIN: 9.70	
Controle 40		✓	RIN: 9.90	
Controle 200		✓	RIN: 9.80	
Nano 0		✓	RIN:10	
Nano 40		✓	RIN: 9.80	
Nano 200		✓	RIN: 9.90	

Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

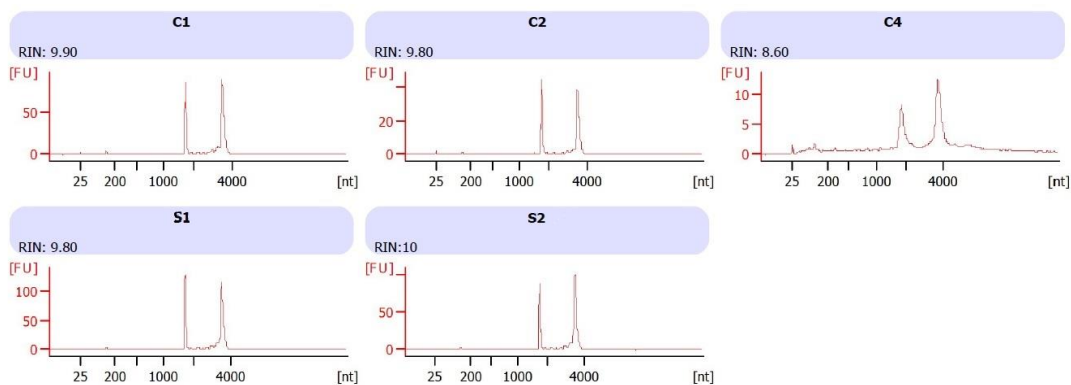
APÊNDICE D - Integridade do RNA referente ao Estudo 2

Figura 34 - Integridade do RNA ribossômico. Amostras: (Ladder) Padrão. (C1) BMP-7+Coágulo+MC3T3-E1; (C2) Coágulo+MC3T3-E1; (C4) Coágulo; (S1) BMP-7+MC3T3-E1; (S2) MC3T3-E1.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 35 - Eletroferograma do gel de integridade do RNA ribossômico. Presença dos picos referentes às bandas 18S e 28S. Amostras: (C1) BMP-7+Coágulo+MC3T3-E1; (C2) Coágulo+MC3T3-E1; (C4) Coágulo; (S1) BMP-7+MC3T3-E1; (S2) MC3T3-E1.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

Figura 36 - Escores de RIN para amostras: (C1) BMP-7+Coágulo+MC3T3-E1; (C2) Coágulo+MC3T3-E1; (C4) Coágulo; (S1) BMP-7+MC3T3-E1; (S2) MC3T3-E1.

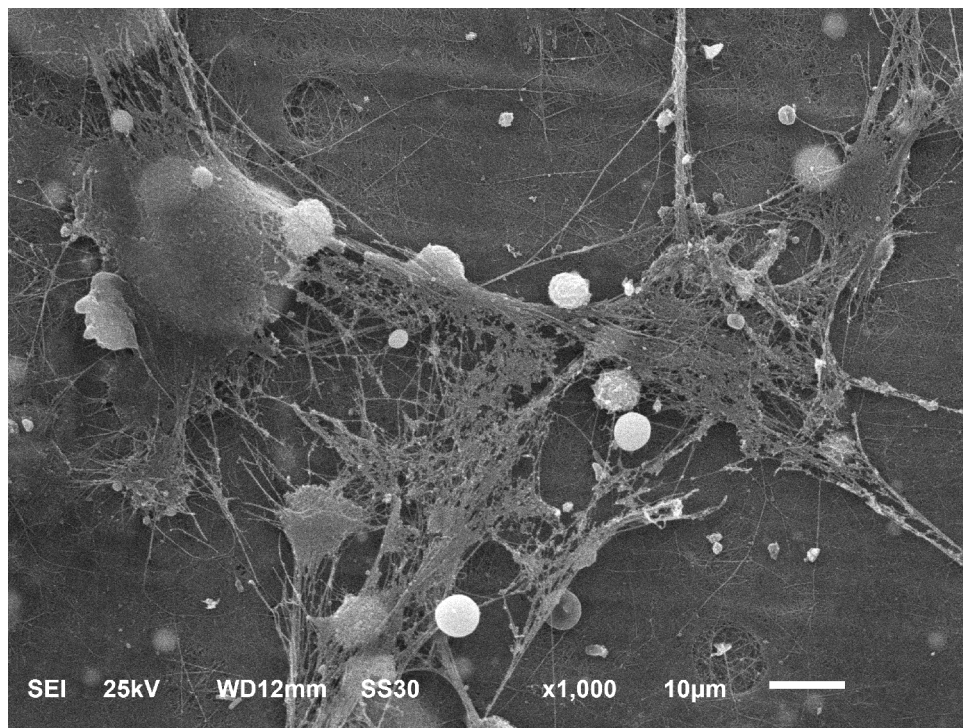
Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
C1		✓	RIN: 9.90	
C2		✓	RIN: 9.80	
C4		✓	RIN: 8.60	
S1		✓	RIN: 9.80	
S2		✓	RIN:10	

Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

APÊNDICE E - Aspectos morfológicos do coágulo sanguíneo ex vivo

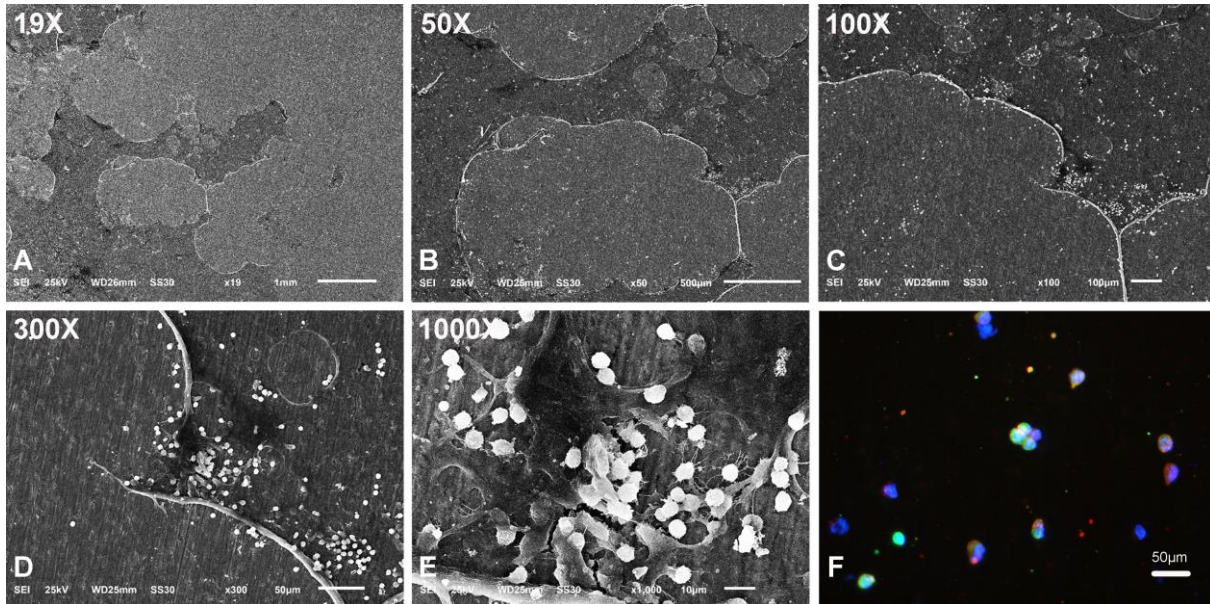
Figura 37 - Imagem de MEV de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18 h pós-implantação no subcutâneo do dorso de camundongo da linhagem C57Bl/6, GFP positivo. Espécime fixado após ter sido removido do animal no Hemocentro da FMRP-USP e conduzido até o Laboratório de Cultura de Células da FORP-USP. Notem-se leucócitos, hemácia e plaquetas associados à rede de fibrina. Aumento de 1000X.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2019.

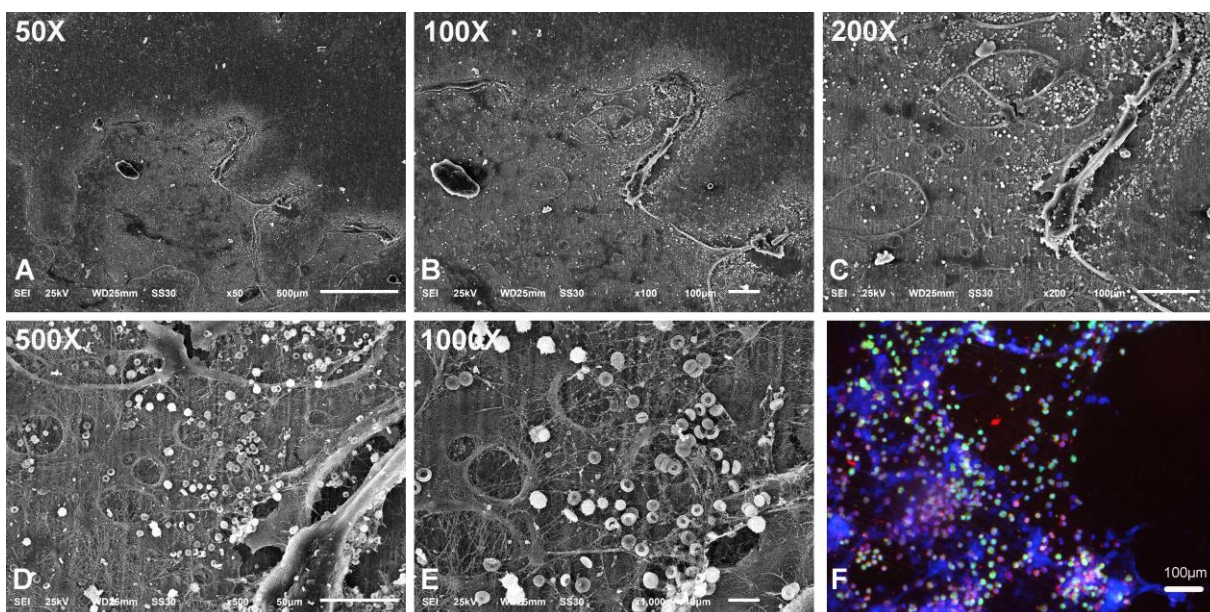
APÊNDICE F - Viabilidade do transporte do coágulo sanguíneo *ex vivo*

Figura 38 - Imagens de MEV (A-E) e epifluorescência (F) de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18 h pós-implantação subcutânea no dorso de camundongos. Espécimes fixados imediatamente após terem sido removidos do animal. (A) Aumento de 19X. (B) Aumento de 50X. (C) Aumento de 100X. (D) Aumento de 300X. (E) Aumento de 1000X. (F) Objetiva de 40X.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FMRP-USP/ FORP-USP; 2019.

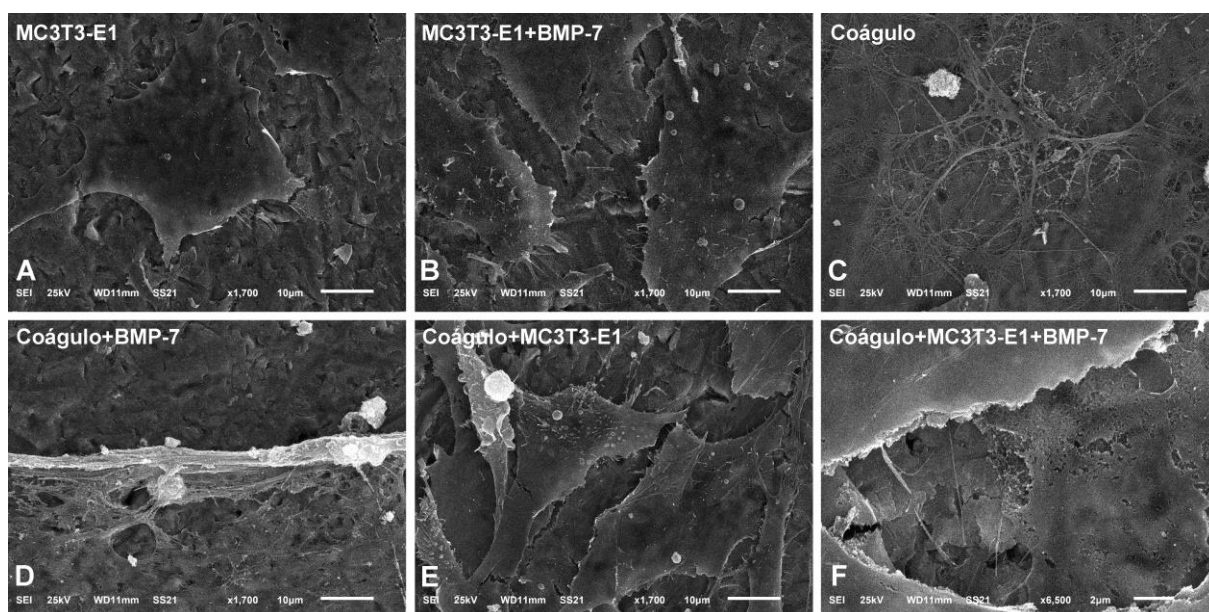
Figura 39 - Imagens de MEV (A-E) e epifluorescência (F) de coágulo sanguíneo formado sobre Nano-Ti no tempo de 16-18h pós-implantação subcutânea no dorso de camundongos. Espécimes removidos do animal no Hemocentro da FMRP-USP e conduzidos até o Laboratório de Cultura de Células da FORP-USP, quando então eram submetidos à fixação. (A) Aumento de 50X. (B) Aumento de 100X. (C) Aumento de 200X. (D) Aumento de 500X. (E) Aumento de 1000X. (F) Objetiva de 20X.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FMRP-USP/ FORP-USP; 2019.

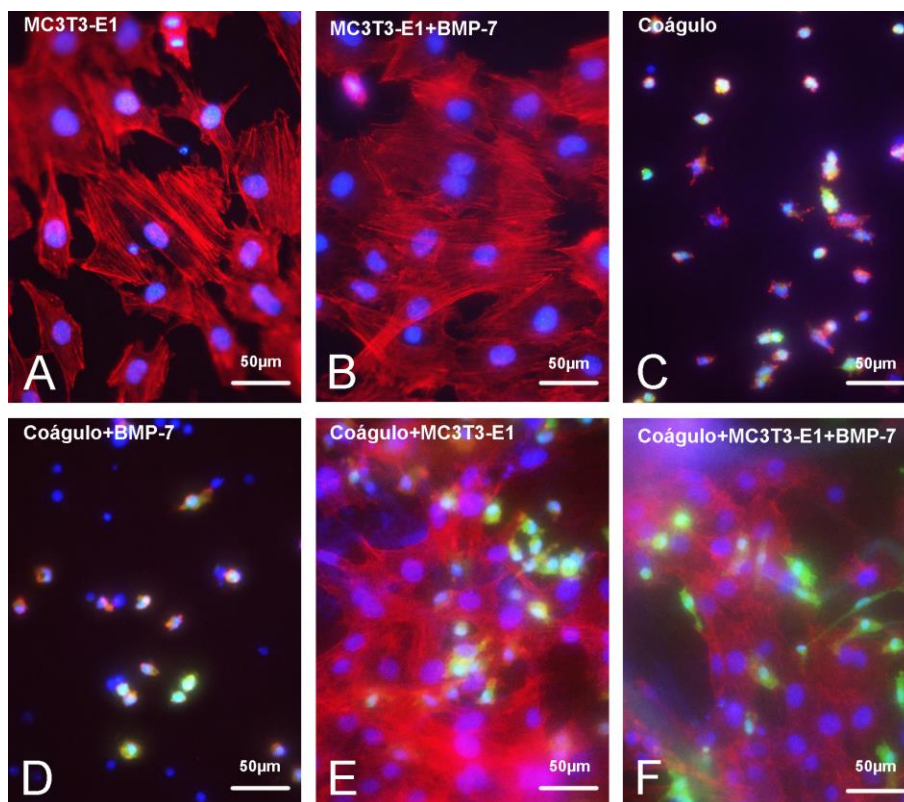
APÊNDICE G - Cultura de células MC3T3-E1 em 48 h pós-plaqueamento nos diferentes grupos experimentais

Figura 40 - Imagens de MEV de células MC3T3-E1 cultivadas por 48 h sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* nos diferentes grupos experimentais. (A) Cultura de células MC3T3-E1 sobre Nano-Ti sem BMP-7. (B) Cultura de células MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. (C) Coágulo sanguíneo formado em camundongos GFP positivos sobre Nano-Ti por 16-18 h. (D) Coágulo sanguíneo formado em camundongos GFP positivos sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7 por 16-18 h. (E) Cultura de células MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo previamente formado sobre Nano-Ti sem BMP-7. (F) Cultura de células MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo previamente formado sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. (A-E) Aumento de 1700X. (F) Aumento de 5550X.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2019.

Figura 41 - Imagens de epifluorescência de células MC3T3-E1 (citoesqueleto de actina em vermelho) cultivadas por 48 h sobre coágulo sanguíneo *ex vivo* nos diferentes grupos experimentais. Leucócitos presentes no coágulo sanguíneo são GFP positivos (em verde). Os núcleos celulares exibem fluorescência azul (DAPI). (A) Cultura de células MC3T3-E1 sobre Nano-Ti sem BMP-7. (B) Cultura de células MC3T3-E1 sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. (C) Coágulo sanguíneo formado em camundongos GFP positivos sobre Nano-Ti por 16-18 h. (D) Coágulo sanguíneo formado em camundongos GFP positivos sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7 por 16-18 h. (E) Cultura de células MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo previamente formado sobre Nano-Ti sem BMP-7. (F) Cultura de células MC3T3-E1 sobre coágulo sanguíneo previamente formado sobre Nano-Ti funcionalizado com BMP-7. Objetiva de 40X.



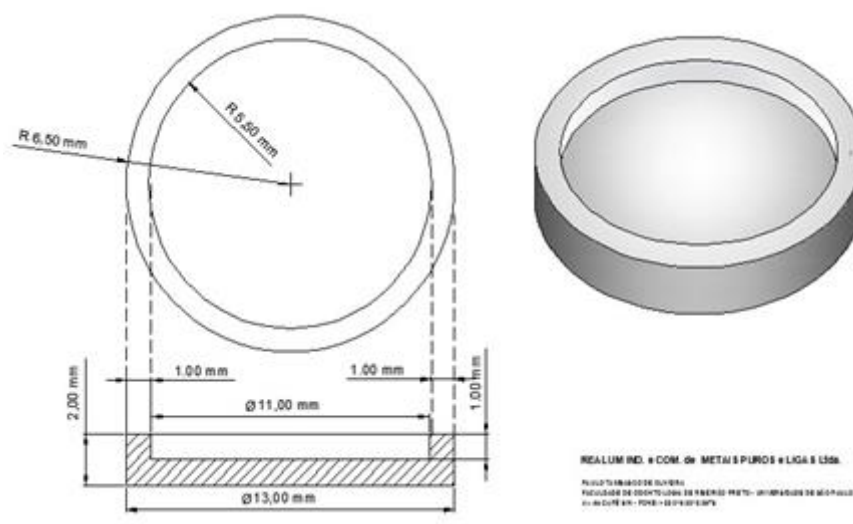
Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

ANEXOS

10 ANEXOS

ANEXO A - *Desenho técnico do disco de Ti com rebaixo circular plano*

Figura 42 - Desenho técnico e modelo tridimensional da modificação do disco de Ti visando à retenção do coágulo sanguíneo e preservação de sua estrutura tridimensional sobre a superfície de Nano-Ti. O espaço criado apresentava volume de aproximadamente 95 mm³.



Fonte: Zuardi, L.R.; de Oliveira, P.T.; Zuardi, P.C. Ribeirão Preto: FORP-USP; 2019.

ANEXO B - Folha de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP

Figura 43 - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP. Note-se a aprovação do uso de 10 animais para estudo piloto. O mesmo registro foi utilizado para a permissão do uso de 72 animais para a realização do Estudo 2 (consulte-se Figura 44).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos do coágulo sanguíneo sobre a diferenciação de células osteoblásticas crescidas sobre nanotopografia de titânio funcionalizada com BMP-7*”, registrado com o número **173/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 28 de novembro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 10 camundongos C57Bl/6 fêmeas pesando 22g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 28/11/2016 a 22/11/2020.

We certify that the Protocol *nº 173/2016*, entitled “*Effects of blood clot formation on osteoblastic cell differentiation on a BMP-7- functionalized nanostructured titanium surface*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/28/2016. This protocol involves the production, aintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 10 female C57Bl/6 mice weighing 22g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 11/22/2020.


Ribeirão Preto, 28 de novembro de 2016

Leonardo Forp


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP


Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(16)3315-3301

Figura 44 - Adendo da Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP-USP. Note-se a aprovação do uso de 72 animais para a realização do Estudo 2.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS





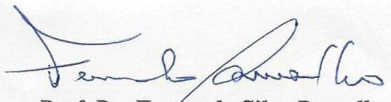
DECLARAÇÃO

Declaramos que o Adendo ao Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **173/2016** sobre o projeto intitulado “*Efeitos do coágulo sanguíneo sobre a diferenciação de células osteoblásticas crescidas sobre nanotopografia de titânio funcionalizada com BMP-7*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego**, está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO ad referendum** na data de 28 de janeiro de 2019.

O presente adendo refere-se à solicitação de 72 camundongos C57Bl/6J fêmeas pesando 20g.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 173/2016, entitled “*Effects of blood clot formation on osteoblastic cell differentiation on a BMP-7- functionalized nanostructured titanium surface*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved *ad referendum* in 01/28/2019 by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo. This Addendum refers to the request of 72 female C57Bl / 6J mice weighing 20g.

Ribeirão Preto, 28 de janeiro de 2019



Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA – FMRP – USP

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil - 14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315.3275 - e-mail: ceua@fmrp.usp.br

Fonte: Comissão de Ética no Uso de Animais. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2019.