



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



**JOSÉ BERNARDO DE SANTIS**

**Avaliação in vitro da pré-administração de licopeno na  
atividade funcional e na manutenção da morfologia das células  
osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio  
nanotexturizado e submetidas ao estresse oxidativo.**

Ribeirão Preto  
2022



**JOSÉ BERNARDO DE SANTIS**

**Avaliação in vitro da pré-administração de licopeno na atividade funcional e na manutenção da morfologia das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizado e submetidas ao estresse oxidativo.**

**Versão Original**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

**Ribeirão Preto  
2022**

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

Catálogo na publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo

Santis, José Bernardo

Avaliação in vitro da pré-administração de licopeno na atividade funcional e na manutenção da morfologia das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados e submetidas ao estresse oxidativo. Ribeirão Preto, 2022.

92p.: il.; 30cm

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

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F

1. Osteoporose. 2. Titânio. 3. Licopeno.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Santis J.B. **Avaliação in vitro da pré-administração de licopeno na atividade funcional e na manutenção da morfologia das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados e submetidas ao estresse oxidativo.** 2022. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a) Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.(a)  
Dr.(a).: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células, Biologia Molecular, Anatomia e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral, todos pertencentes à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.





*Dedicatória*

---



À minha família, que mesmo distante pode me apoiar, e em especial à  
minha mãe **Andréa Maria Mendes** que sempre apoiou e compreendeu todo o  
meu esforço.



## *Agradecimientos*

---



Ao meu companheiro e amigo **Gabriel Manarin** que esteve ao meu lado durante todo o processo de formação me dando incentivo e me compreendendo em todos os momentos difíceis.

Ao programa de pós-graduação da Biologia Básica e Oral da FORP-USP onde eu me identifiquei desde o início dos trabalhos e sou grato por todo o conhecimento das disciplinas e linhas de pesquisa as quais eu tive contato.

À Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, por ter me aceitado ser seu aluno e me orientado para esta pesquisa.

Ao técnico do laboratório de cultura celular Roger Rodrigo Fernandes pela amizade, por toda a ajuda e colaboração com os ensinamentos passados a mim.

À especialista de laboratório Fabíola Singaretti de Oliveira pela amizade e ensinamentos passados a mim que foram de grande importância para o meu aprendizado dentro do laboratório de biologia molecular.

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

À Imaculada Janaíra Miguel, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP-USP.

A todas as pessoas que estiveram comigo durante a realização deste trabalho e que ajudaram de certa forma a chegar onde estou.







O presente trabalho foi realizado com os seguintes apoios:

-Bolsa de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



“Se você é capaz de ser feliz quando está sozinho, você aprendeu o segredo de ser feliz”

**Osho**

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

**Albert Einstein**



*Resumo*

---



## RESUMO

SANTIS, José Bernardo. **Avaliação in vitro da pré-administração de licopeno na atividade funcional e na manutenção da morfologia das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados e submetidas ao estresse oxidativo.** 2022. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2022.

Muitas tentativas têm sido feitas para modificar as propriedades da superfície de biomateriais para favorecer a integração e a fixação de implantes ortopédicos e dentários em pacientes saudáveis e com doenças crônicas ósseas como a osteoporose. A patogênese da osteoporose está associada com o estresse oxidativo e com isso a associação de estratégias terapêuticas com antioxidantes com efeitos colaterais mínimos tem sido investigada. Entre as diversas substâncias antioxidantes, o licopeno é um importante carotenoide com alta capacidade de eliminar moléculas de oxigênio singlete, podendo atuar na redução do estresse oxidativo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial estimulatório do licopeno na atividade funcional de células osteoblásticas cultivadas sobre a superfície de discos de titânio nanotexturizado e submetidas a estresse oxidativo. Foram utilizadas células imortalizadas MC3T3-E1 cultivadas em garrafas de cultura até a subconfluência. Em seguida, as células foram colocadas em placas de 24 poços em uma concentração de  $2 \times 10^4$  (n=5) e divididas nos grupos: Controle (C), Controle + Estresse Oxidativo (C + EO), Licopeno (L), Licopeno + Estresse Oxidativo (L + EO). O EO foi realizado por meio da adição de 120  $\mu\text{mol/L}$  de peróxido de hidrogênio nos poços por 4 horas antes dos ensaios bioquímicos. Foram realizados os seguintes ensaios: adesão celular após 24 horas e 3 dias; viabilidade celular (MTT) e atividade da fosfatase alcalina in situ (ALP) após 3, 7 e 10 dias; quantificação de nódulos de mineralização por vermelho de alizarina após 14 dias; análise da morfologia e integridade celular e detecção intracelular de espécies reativas de oxigênio após 24 horas e 3 dias. Os dados obtidos foram analisados por meio do teste estatístico ANOVA no software Graph Pad Prism 5.0 com nível de significância

de 5%. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo da viabilidade celular aos 3 dias para o grupo L em quando comparado aos outros grupos experimentais. A detecção de ALP in situ foi significativamente menor no grupo C+EO aos 10 dias de cultura. A quantificação de nódulos mineralizados foi similar para todo os grupos experimentais. A adesão celular foi qualitativamente maior nos grupos C, L e L+EO quando comparado ao grupo C+EO, sendo que a contagem de células mostrou uma diminuição significativa no grupo C+EO quando comparado aos grupos C e L nos períodos experimentais. A análise da morfologia celular mostrou manutenção do volume citoplasmático e integridade nuclear, com maior organização da arquitetura citoesquelética no grupo L+EO quando comparado ao grupo C+EO após 24 horas e 3 dias de cultura. Os dados obtidos sugerem a pré-administração do licopeno na concentração selecionada em cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1 em discos de titânio nanotexturizados, associada à exposição ao peróxido de hidrogênio, favoreça a integridade morfológica celular e adesão à superfície de biomateriais. O uso do licopeno para estimular a atividade funcional celular deve ser investigado em outras concentrações, para avaliar seu potencial em casos de alterações do metabolismo ósseo associado ao estresse oxidativo, como ocorre na osteoporose.

**Palavras-chave:** Osteoporose, Licopeno, Titânio.





*Abstract*

---



## ABSTRACT

SANTIS, José Bernardo. **In vitro evaluation of lycopene pre-administration on the functional activity and maintenance of the morphology of osteoblastic cells MC3T3-E1 cultured on nanotextured titanium disks and subjected to oxidative stress.** 2022. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2022.

Many attempts have been made to modify the surface properties of biomaterials to improve the integration and fixation of orthopedic and dental implants in healthy patients and those with chronic bone diseases such as osteoporosis. The pathogenesis of osteoporosis is associated with oxidative stress and therefore the association of therapeutic strategies with antioxidants with minimal side effects has been investigated. Among the various antioxidant substances, lycopene is an important carotenoid with a high capacity to eliminate singlet oxygen molecules, which may act to reduce oxidative stress. Thus, the objective of this work was to evaluate the stimulatory potential of lycopene on the functional activity of osteoblastic cells cultivated on the surface of nanotextured titanium discs and subjected to oxidative stress. Immortalized MC3T3-E1 cells grown in culture bottles to subconfluence were used. Then, the cells were placed in 24-well plates at a concentration of  $2 \times 10^4$  (n=5) and divided into groups: Control (C), Control + Oxidative Stress (C + EO), Lycopene (L), Lycopene + Oxidative Stress (L + EO). The EO was performed by adding 120  $\mu\text{mol/L}$  of hydrogen peroxide to the wells for 4 hours before the biochemical tests. There were evaluated the following parameters: cell adhesion after 24 hours and 3 days; cell viability and in situ detection of ALP after 3, 7, and 10 days; mineralization after 14 days; cell morphology and reactive oxygen species detection after 24 hours and 3 days. Data obtained were analyzed through ANOVA statistical tests in the software Graph Pad Prism 5.0 for  $p < 0.05$ . The results showed a significant increase in cell viability after 3 days for group L when compared to other experimental groups. The in situ ALP detection was

significantly decreased in the group C+EO after 10 days of culture. The quantification of mineralized nodules was similar among all the groups. Cell adhesion was qualitatively increased in the groups C, L, and L+EO, with a significantly decreased adhesion of cells from the group C+EO. The evaluation of cell morphology showed better maintenance of cytoplasmatic and nuclear volume, with better organization and spreading of cytoskeletal architecture in the group L+EO when compared to group C+EO after 24 hours and 3 days of culture. Data obtained suggest that pre-administration of the selected concentration of lycopene in the culture of MC3T3-E1 cells on nanotextured titanium disks, associated com exposition to hydrogen peroxide, favors the maintenance of cell morphology and integrity, as well as adhesion to biomaterial surfaces. The use of lycopene to stimulate functional activity must be investigated in other lycopene concentrations, to evaluate its potential in situations of bone metabolism injuries associated with oxidative stress, as it occurs in osteoporosis.

**Key words:** Osteoporosis, Lycopene, Titanium.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Processo de nanotexturização dos discos de titânio em ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio aquoso. Os discos foram mantidos por 4 horas sob agitação, dispostos na lateral do fundo do béquer com uma pulga central e a face lixada voltada para cima.

**Figura 2.** A - Delineamento experimental dos grupos, sendo “C” grupo controle, “C + EO” controle com estresse oxidativo, “L” licopeno e “L + EO” licopeno com estresse oxidativo. B – Linha do tempo a partir do plaqueamento celular sobre os discos de titânio com os períodos e ensaios realizados em cada tempo experimental.

**Figura 3.** Preparação da placa de 24 poços antes do plaqueamento. Os discos de titânio foram previamente esterilizados com a face nanotexturizada voltada para cima e colocados dentro dos poços com uma pinça de titânio grau 2.

**Figura 4.** Viabilidade das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO). As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

**Figura 5.** Viabilidade ao longo dos períodos experimentais das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO). As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

**Figura 6.** Gráfico da porcentagem de ALP corada em vermelho por Fast Red na cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO) durante os períodos de 3, 7 e 10 dias. As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

**Figura 7.** Quantificação do vermelho de alizarina extraído dos nódulos de mineralização. Grupos: Controle (C); Controle + Estresse Oxidativo (C + EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse Oxidativo (L + EO). Letras diferentes sobre os grupos indicam diferença estatística. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

**Figura 8.** **1.** Adesão celular de células MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO) durante os períodos de 24 horas e 3 dias. **2.** Gráfico da média entre os grupos. Letras diferentes sobre os grupos indicam diferença estatística. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

**Figura 9.** Fluorescência da morfologia celular osteoblástica MC3T3-E1 através da coloração nuclear com DAPI e citoesqueleto com faloidina 594 red. Grupos nas linhas: Controle (C); Controle + Estresse (C+EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse (L+EO). Períodos experimentais nas colunas: 24 horas e 3 dias.

**Figura 10.** Fluorescência das espécies reativas de oxigênio, comprimento de onda 535 nm, coradas em vermelho. Grupos nas linhas: Controle (C); Controle + Estresse (C+EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse (L+EO). Períodos experimentais nas colunas: 3, 7 e 10 dias.

## *SUMÁRIO*

---





<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>38</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	45
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
2.2.1. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	45
2.2.2. ENSAIOS MORFOLÓGICOS	45
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>49</b>
3.1. PREPARO DE OBTENÇÃO DOS DISCOS DE TITÂNIO NANOTEXTURIZADOS	49
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	50
3.3. CULTURA CELULAR	51
3.4. INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	52
3.5. ADMINISTRAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO LICOPENO	53
3.6. ENSAIOS BIOQUÍMICOS	53
3.6.1. VIABILIDADE CELULAR	53
3.6.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ALP <i>IN SITU</i>	54
3.6.3. FORMAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA	55
3.7. ANÁLISE MORFOLÓGICA	56
3.7.1. MORFOLOGIA CELULAR	56
3.7.2. ADESÃO CELULAR	57
3.7.3. DETECÇÃO INTRACELULAR DOS NÍVEIS DE EROS POR FLUORESCÊNCIA	57
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
4.1. VIABILIDADE CELULAR (MTT)	61
4.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) <i>IN SITU</i>	63
4.3. QUANTIFICAÇÃO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO	65
4.4. ENSAIO DE ADESÃO CELULAR	65
4.5. MORFOLOGIA CELULAR	69
4.6 ANÁLISE QUALITATIVA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	71
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>



# *INTRODUÇÃO*

---



## 1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são materiais naturais ou sintéticos usados para substituir a estrutura biológica perdida restaurando sua forma e função (GEETHA et al., 2009). Com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população mundial, os biomateriais estão cada vez mais presentes em nossa vida. Entre os diversos materiais disponíveis com finalidade biomédica, destacam-se atualmente o titânio e suas ligas, sendo objeto de estudo devido à sua crescente aplicação.

Na Odontologia o titânio é o material de escolha para fabricação de implantes dentários, pois apresenta propriedades que atendem a requisitos importantes para ocorrer a osseointegração, como excelente biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência, módulo de elasticidade relativamente baixo e usinabilidade (JEMAT et al., 2015). Apesar das suas excelentes características como biomaterial, a previsibilidade dos implantes dentários tem sido variável, uma vez que o titânio por si só é incapaz de induzir a aposição óssea, por isso, pesquisas recentes estão focadas na melhoria dos tratamentos de superfície para promover uma integração precoce, encurtando assim o tempo necessário para o tratamento (COSTA et al., 2015). Como a superfície do biomaterial é a única região em contato com o tecido ósseo, muitas tentativas têm sido feitas para modificar as propriedades da superfície para melhorar a integração e a fixação mecânica. A rugosidade da superfície desempenha um papel importante na fixação e diferenciação celular. O aumento da aspereza da superfície pode levar a um aumento na área disponível para a interação celular

e proteica com os implantes (AGARWAL; GARCÍA, 2015). Atualmente há uma variedade de tratamentos de superfície disponíveis visando melhorar e acelerar o processo de osseointegração, possibilitando uma instalação mais precoce da prótese e a reabilitação do paciente em um período reduzido. As superfícies dos implantes de titânio podem ser classificadas em cinco grupos: usinadas, macrotextrizadas, microtexturizadas, nanotextrizadas e biomiméticas (DE CARVALHO et al., 2009). As técnicas comerciais mais utilizadas são jateamento com areia, condicionamento ácido e pulverização de plasma de hidroxiapatita (LI et al., 2004). O condicionamento ácido é um dos métodos mais amplamente utilizados produzindo uma nanotextura na superfície de titânio sem deixar nenhum resíduo. Isso pode ser realizado com um único ácido ou uma combinação de ácidos (SOLA-RUIZ, M. F. et al, 2017).

O resultado da integração entre um biomaterial e o tecido ósseo saudável pode ser diferente quando comparado à osseointegração em um paciente com doenças crônicas degenerativas na presença de estresse oxidativo, como é o caso da osteoporose. Há evidências crescentes de que o estresse oxidativo, induzido por espécies reativas de oxigênio (EROs), aumenta com o envelhecimento e/ou processos inflamatórios, os quais podem afetar adversamente a homeostase óssea, induzindo à apoptose de osteoblastos e osteócitos, favorecendo a osteoclastogênese e inibindo a mineralização e osteogênese (DOMAZETOVIC et al., 2017). Estudos recentes sugerem que a perda óssea pós-menopausa pode ser causada por EROs, que induzem um microambiente ósseo mais oxidado, inibindo a diferenciação e proliferação de osteoblastos. Assim, um desequilíbrio nos níveis de EROs pode acelerar a

reabsorção óssea, resultando em fragilidade e fratura: em conformidade, eliminar EROs em excesso seria uma abordagem eficaz para manter a integridade óssea (ARDAWI et al., 2016). Dessa forma, antioxidantes que inativam as EROs e fornecem proteção contra danos oxidativos estão sendo considerados como importantes moléculas estratégicas preventivas (ARDAWI et al., 2016). Além disso, os macro e micronutrientes presentes na alimentação contribuem para a saúde do esqueleto, apoiando a produção e mineralização da matriz óssea (SACCO; HORCAJADA; OFFORD, 2013).

Entre os antioxidantes mais estudados estão os polifenóis (e.g. flavonoides, catequinas, epicatequinas, epigallocatequinas e antocianinas) e os carotenoides, exemplificados com o licopeno, luteína, zeaxantina e astaxantina. O licopeno é um importante carotenoide responsável pela cor vermelha nas frutas e que exibe vários benefícios, com dados epidemiológicos indicando a correlação entre a ingestão de licopeno e diminuição de várias doenças crônicas, incluindo certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (SAINI et al., 2020). Ainda não se sabe se os benefícios ocorrem devido à estrutura original do licopeno ou de seus metabólitos como os licopenais, licopenols e ácido licopenóico (ARBALLO; AMENGUAL; ERDMAN, 2021). Este carotenoide é sintetizado por plantas e microrganismos, mas não é sintetizado por animais ou seres humanos, no entanto está disponível em alimentos como tomate, melancia, toranja cor-de-rosa, damasco, goiaba cor-de-rosa e papaya (GAJOWIK; DOBRZYŃSKA, 2014; SACCO; HORCAJADA; OFFORD, 2013). A maior fonte de licopeno é derivada predominantemente dos tomates, sendo sua biodisponibilidade maior a partir de uma única dose de pasta de tomate do que a partir de uma dose igual de licopeno



de tomates frescos (Johnson, 2002). O licopeno ganhou atenção por sua forte capacidade antioxidante e por seu potencial para desempenhar um papel protetor contra uma série de doenças crônicas, incluindo osteoporose (Sacco et al., 2012). Sendo um dos antioxidantes mais potentes na natureza, de fácil disponibilidade e acesso para a população, apresenta uma capacidade de eliminação de moléculas de oxigênio singlete 100 vezes maior que a de outros carotenoides. Segundo KELKEL et al. (2011) o licopeno exerce seu efeito antioxidante principalmente por meio da ativação da resposta antioxidante ARE (element/electrophile response element) rompendo as interações citosólicas entre o major ARE-activating transcription factor, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) e seu inibidor, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Além disso, segundo ARDAWI et al. (2021) o licopeno pode aumentar a expressão da heme oxigenase (HO)-1, que é uma enzima com ação citoprotetiva na presença de EROs e importante no processo de diferenciação osteoblástica.

Um estudo recente *in vitro* mostrou que células da medula óssea indiferenciadas de ratas com osteoporose, quando colocadas em meio de cultura com licopeno, apresentaram uma maior diferenciação das células osteoblásticas diferenciadas aumentando a expressão da enzima fosfatase alcalina e também a formação de nódulos de mineralização quando comparado ao grupo onde não houve a administração do fitoterápico (SEMEGHINI et al., 2022). Assim, a suplementação e/ou tratamento com antioxidantes é uma abordagem eficaz para neutralizar e melhorar a produção excessiva de EROs.

Estudos in vivo observaram que o licopeno pode influenciar a atividade funcional de células da medula óssea do fêmur de ratas ovariectomizadas, assim como impedir a perda óssea na epífise femoral por meio da ingestão diária de licopeno por 30 e 60 dias em uma situação de osteoporose (OLIVEIRA et al., 2019). O único trabalho encontrado na literatura correlacionando o licopeno com o titânio é o de Li et al. (2018), que mostraram em um estudo in vivo que a ingestão por 12 semanas de licopeno favoreceu a osseointegração, fixação e formação óssea adjacente à implantes de titânio em ratas osteopênicas.

A simulação do estresse oxidativo que acontece na osteoporose pode ser feita in vitro por meio da adição de peróxido de hidrogênio à cultura. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa em modelo in vitro indicam que a pré-administração de substâncias antioxidantes como o extrato de erva-mate podem prevenir os efeitos deletérios da exposição celular ao peróxido de hidrogênio, simulando o estresse oxidativo (CEVERINO et al., 2021). Sendo assim, a hipótese este trabalho é a de que a administração do licopeno em meio de cultura com células osteoblásticas (MC3T3-E1) cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados e submetidas ao estresse oxidativo possa promover: 1) a atividade funcional celular e 2) a manutenção da morfologia celular.

## *OBJETIVOS*

---



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar em um modelo *in vitro*, por meio de parâmetros bioquímicos e morfológicos, a ação do licopeno diluído em meio de cultura em células de linhagem osteoblástica MC3T3-E1 cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados e expostas à indução experimental do estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os parâmetros analisados foram:

#### 2.2.1. *Ensaio Bioquímicos*

- Viabilidade celular (MTT)
- Detecção e quantificação *in situ* de fosfatase alcalina
- Detecção e quantificação de nódulos mineralizados

#### 2.2.2. *Ensaio Morfológicos*

- Integridade celular (citoplasma e núcleo)
- Adesão celular (qualitativo e quantitativo)
- Detecção intracelular de EROs



## *MATERIAL E MÉTODOS*

---

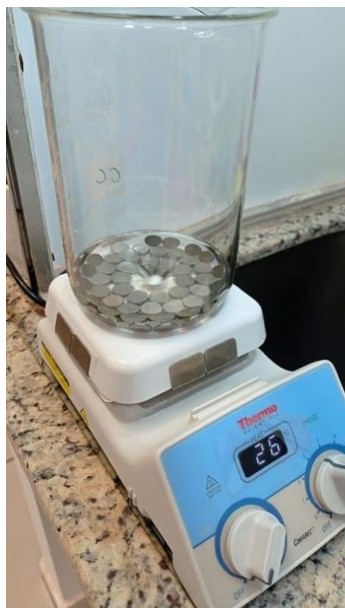




### 3. MATERIAL E MÉTODOS

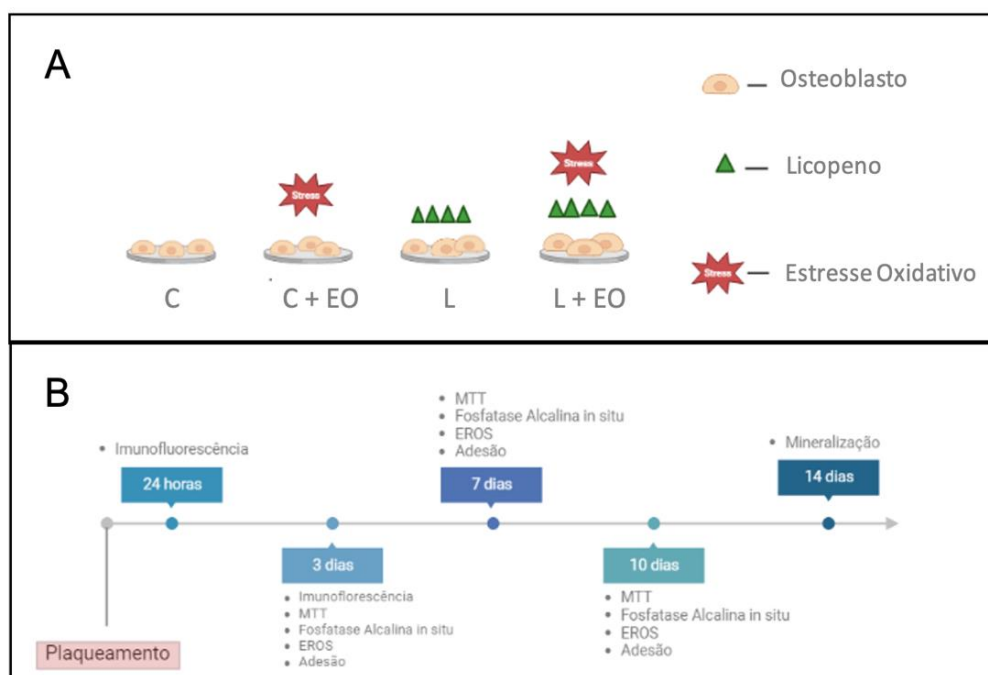
#### 3.1. Preparo de obtenção dos discos de titânio nanotexturizados

Discos de titânio (Ti) comercialmente puro de grau 2 de 13mm de diâmetro e 2mm de espessura foram polidos em papéis abrasivos de carboneto de silício (320 e 600 mesh). Posteriormente, todos os discos foram lavados em sabão, álcool 70° GL e água deionizada no ultrassom por ciclos de 30 minutos (cada passagem). Para obtenção das superfícies, foram utilizados volumes iguais de ácido sulfúrico concentrado P.A. (Sigma-Aldrich, USA) e 30% de peróxido de hidrogênio aquoso ( $H_2O_{2aq}$ ) (Sigma-Aldrich, USA). Em um béquer com os discos sob agitação, foram adicionados primeiramente o peróxido de hidrogênio e posteriormente na sequência sobre um recipiente com gelo, o ácido sulfúrico. Após isso, a solução foi transferida para outro béquer com os discos, mantida por 4 horas sob agitação contínua a temperatura ambiente, dentro da capela de exaustão, para obter a superfície nanotexturizada. Após o condicionamento, os discos foram lavados em ultrassom com água destilada por 20 minutos e secos na estufa para posteriormente serem esterilizados em autoclave para seu uso na cultura celular (TAVARES et al., 2007).



**Figura 1.** Processo de nanotexturização dos discos de titânio em ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio aquoso. Os discos foram mantidos por 4 horas sob agitação, dispostos na lateral do fundo do béquer com uma pulga central e a face lixada voltada para cima.

### 3.2. Delineamento Experimental

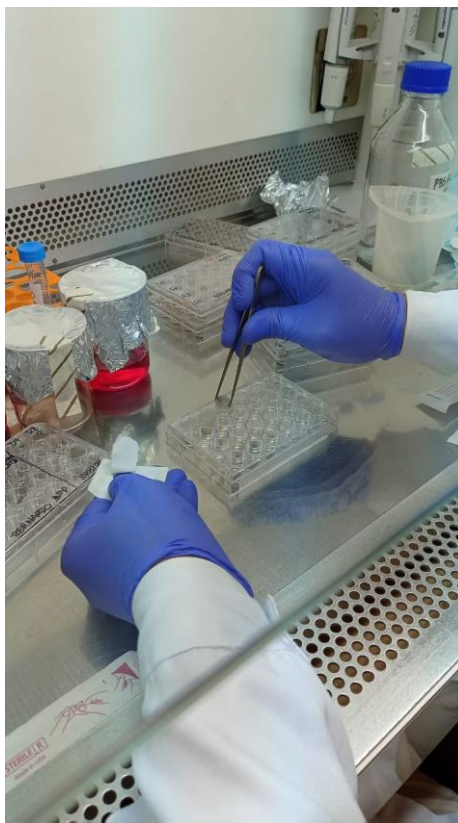


**Figura 2.** A - Delineamento experimental dos grupos, sendo “C” grupo controle, “C + EO” controle com estresse oxidativo, “L” licopeno e “L + EO” licopeno com estresse oxidativo. B – Linha do tempo a partir do plaqueamento celular sobre os discos de titânio com os períodos e ensaios realizados em cada tempo experimental.

### 3.3. Cultura Celular

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a MC3T3-E1. As células são conservadas em tubos criogênicos de 2 ml em tanques de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção das culturas.

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> com 10 ml de meio de alfa-MEM, 10% de soro fetal bovino e 2,75ml de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Durante todo o tempo de cultivo, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada dois dias. Após atingir a subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizados em meio osteogênico (com a adição de 5µg/mL de ácido ascórbico e 7mM de β-glicerofosfato) em placas de 24 poços em uma concentração de 2 x10<sup>4</sup> por poço e divididas nos grupos citados.



**Figura 3.** Preparação da placa de 24 poços antes do plaqueamento. Os discos de titânio foram previamente esterilizados com a face nanotexturizada voltada para cima e colocados dentro dos poços com uma pinça de titânio grau 2.

### 3.4. Indução do estresse oxidativo

Para realizar a indução do estresse oxidativo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), comumente utilizado em diferentes concentrações para promover o estresse oxidativo e apoptose. As concentrações que estressam as células em estudos *in vitro* e podem levar até à apoptose variam entre 300  $\mu M$  e 500  $\mu M$  (Dan et al., 2018). Foi seguido o protocolo de CEVERINO et al. (2021), adicionando-se 400  $\mu mol/L$   $H_2O_2$  à cultura e inicialmente partiu-se de uma solução de peróxido de hidrogênio a 30% (100 volumes). Nos primeiros experimentos, as células morreram sem a possibilidade de realizar qualquer ensaio. Assim, foi feita a diluição em água deionizada a 9% (30 volumes) na

proporção 3:10 e utilizado 1,01 ml de peróxido de hidrogênio juntamente com 98,99 ml de meio essencial mínimo, não suplementado, para uma solução de 100 ml, portanto foram adicionados 120  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na cultura. As placas foram retiradas da incubadora e o meio de cultura de cada poço foi descartado, seguido de adição de 1000  $\mu\text{L}$  por poço da solução de meio com peróxido. Em seguida a placa foi novamente colocada na incubadora a 37°C por 4 horas para indução do estresse oxidativo. Após este período, toda solução foi descartada dos poços e os ensaios realizados.

### **3.5. Administração *in vitro* do licopeno**

Foi utilizado o licopeno (Kangdou Biotech, China) na concentração de 10%, com certificado de análise de controle de qualidade emitido pela Via Farma (São Paulo, Brasil). Após sua solubilização em água destilada, o licopeno foi administrado na concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$ , seguindo protocolos já realizados em nosso laboratório e baseados na literatura (ZENG et al., 2017). A diluição foi preparada a cada troca de meio de cultura, que foi feita a cada dois dias.

### **3.6. Ensaio Bioquímicos**

#### *3.6.1. Viabilidade celular*

Após 3, 7 e 10 dias, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]) (Sigma®). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com

solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e estes foram lavados com 1mL de solução PBS aquecida. Em seguida, foi adicionado 1mL de solução de isopropanol ácido em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150µL foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Inc.) a 570nm. Os valores de absorbância obtidos foram submetidos à análise estatística.

### *3.6.2. Análise da atividade de ALP in situ*

Após 3, 7 e 10 dias, foi analisada a atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) in situ. Foram preparadas duas soluções: a solução 01 foi feita em um béquer com 320 mg de Triz (Sigma) dissolvidos em 20 ml de água deionizada, e a solução 02 foi preparada em outro béquer diluindo 7 mg de Naftol (AS-MX Phosphate) cat, N4875-1g (Sigma®) em 2 ml de dimetilformamida (Merck). Em seguida foram descartados 2 ml da solução 01, transferidos os 2 ml da solução 02 e dissolvido mais 2 mg de Fast Red (Sigma® cat. F8764-5g) para o béquer da solução 01 resultando assim na solução 03. Após o preparo da solução 03, as placas foram retiradas da incubadora, retirado o meio de cultura na bancada e cada poço lavado com cerca de 1,8 a 2 ml de PBS não filtrado aquecido por 2 vezes. Em seguida foi adicionado 1 ml da solução 03 em cada poço e a placa incubada por 30 minutos. Após esse período, a placa foi retirada da incubadora e descartada a solução 03 de cada poço. Ao final, após a secar a placa,

fotografou-se os discos sobre a tampa da placa para analisar quantidade de regiões coradas pelo Fast Red através do software ImageJ indicando a atividade da fosfatase alcalina in situ por meio dos pixels das imagens geradas.

### 3.6.3. Formação e quantificação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 14 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 2 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37°C, preenchidos álcool 70% e levados a geladeira por 1 hora. Após isso, foram lavados com PBS aquecido e água deionizada. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, ficaram evidenciadas pela coloração vermelha. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 150µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos *ependorf* de 1,5mL e agitadas em vórtex por 30 segundos e aquecida a 85°C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 20 minutos. Um volume de 150µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços (Corning) e 40µL de hidróxido de amônia a 10% (Quimibras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi adicionada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bio-Tek) em um comprimento de onda de 405nm.

### 3.7. Análise Morfológica

#### 3.7.1. Morfologia celular

A análise da morfologia celular por fluorescência foi realizada com o intuito de avaliar os osteoblastos quando induzidos ao estresse oxidativo e a ação antioxidante sobre sua morfologia através da coloração dos núcleos e citoesqueletos celulares. As células foram cultivadas sobre discos de titânio e após 24 horas e 3 dias de cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isso, as células foram mantidas em PB na geladeira até o dia do ensaio. Na fluorescência, as células foram processadas rotineiramente com é feito na imunofluorescência (TAMBASCO DE OLIVEIRA; NANCI, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguido de lavagem com PB 3 vezes 5 minutos cada. Não foi realizado o bloqueio com leite em pó pela ausência de anticorpos. Para a coloração do citoesqueleto celular, foi utilizada faloidina conjugada com Alexa Fluor 594 red (Molecular Probes, EUA) 2:400, por 50 minutos. Após isso, as amostras foram lavadas com PB 3 vezes 5 minutos cada e em seguida incubadas com DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1,5:400) por 5 minutos, sendo em seguida lavadas com água deionizada. Os discos foram colados em uma lâmina histológica com cola Super Bonder® (Loctite®) e em seguida foi colada uma lamínula de 14 mm sobre o disco com meio de montagem *anti-fade* (Prolong, Molecular Probes). As marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).



### 3.7.2. Adesão celular

A análise da adesão celular foi feita através de 15 fotos tiradas aleatoriamente de cada grupo no ensaio de fluorescência de 24 horas e 3 dias através da coloração pelo DAPI. O intuito deste ensaio foi avaliar a imagem das células e a quantidade média delas aderidas sobre o disco de titânio. Após a contagem foi calculada a média de cada amostra e realizados os testes estatísticos de comparação entre os grupos.

### 3.7.3. Detecção intracelular dos níveis de EROs por fluorescência

Este ensaio evidencia as EROs pelo método da dihidroetidina (DHE) cuja fórmula química é 2',7'-diclorodihidrofluoresceíndiacetato (H<sub>2</sub>DCFDA), sendo utilizada como um indicador de espécies reativas de oxigênio. Inicialmente preparou-se a solução mãe de DHE (25 mg de DHE para 396 µL de DMSO para se obter uma solução a 10<sup>-2</sup>). A partir desta solução, foi feita a diluição em 5µM de PBS através da proporção de 1 µl de solução mãe para 999 µL de PBS em um tubo envolto por papel alumínio na ausência de luz, para então utilizar 200 µL desta solução por amostra, preparando-se a quantidade total de 3 ml. Inicialmente, foi removido o meio de cultura das placas, e as amostras lavadas com PBS aquecido e transferidas para outra placa limpa. A partir deste momento todos os passos foram realizados no escuro com papel alumínio sobre a placa. Em seguida, foram colocados 200 µL de solução diluída de DHE por 15 minutos em temperatura ambiente, para em seguida lavar as amostras com PBS 3 vezes por 3 minutos cada lavagem. Feito isso, as amostras foram fixadas em

paraformaldeído 4% por 10 minutos na bancada e lavadas novamente mais 3 vezes por 3 minutos. As amostras foram aderidas em uma lâmina histológica com Super Bonder® (Loctite®) e a uma lamínula com meio de montagem *anti-fade* (Prolong, Molecular Probes). A fluorescência foi monitorada sob um microscópio de fluorescência invertido (DMI3000 B; Leica) usando comprimento de onda de excitação/emissão de 535 nm. Os aumentos de sinal foram apresentados como a razão pico/fluorescência basal (F/F<sub>0</sub>). Este protocolo segue o que foi descrito por ZHANG et al. (2019). As marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).

### **3.8. Análise estatística**

Os dados obtidos dos ensaios *in vitro* foram submetidos a análise dos dados paramétricos e não paramétricos com a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste para comparações múltiplas entre os grupos. O nível de significância foi de 5%, e foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0e*.

## *RESULTADOS*

---

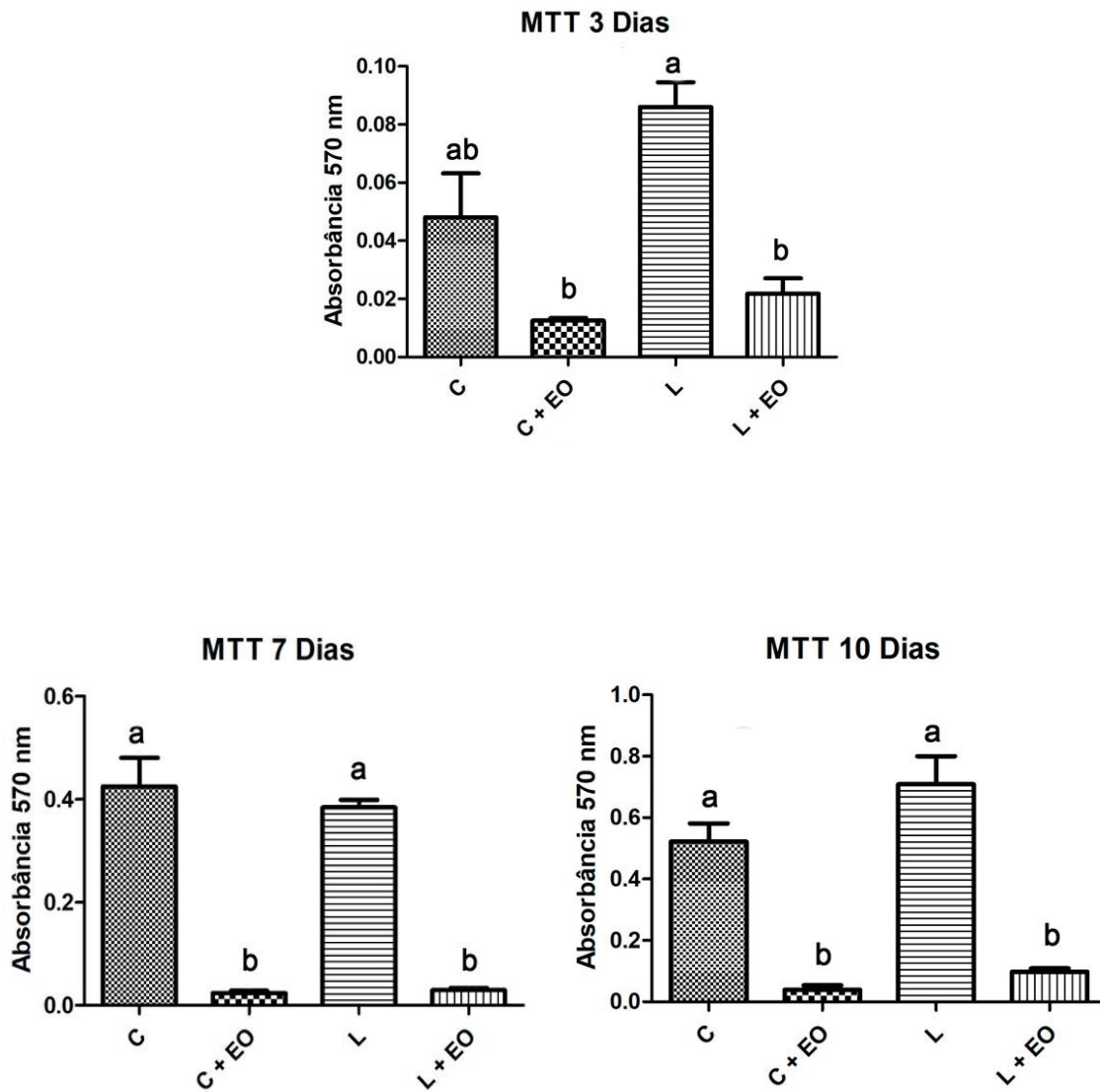


## **4. RESULTADOS**

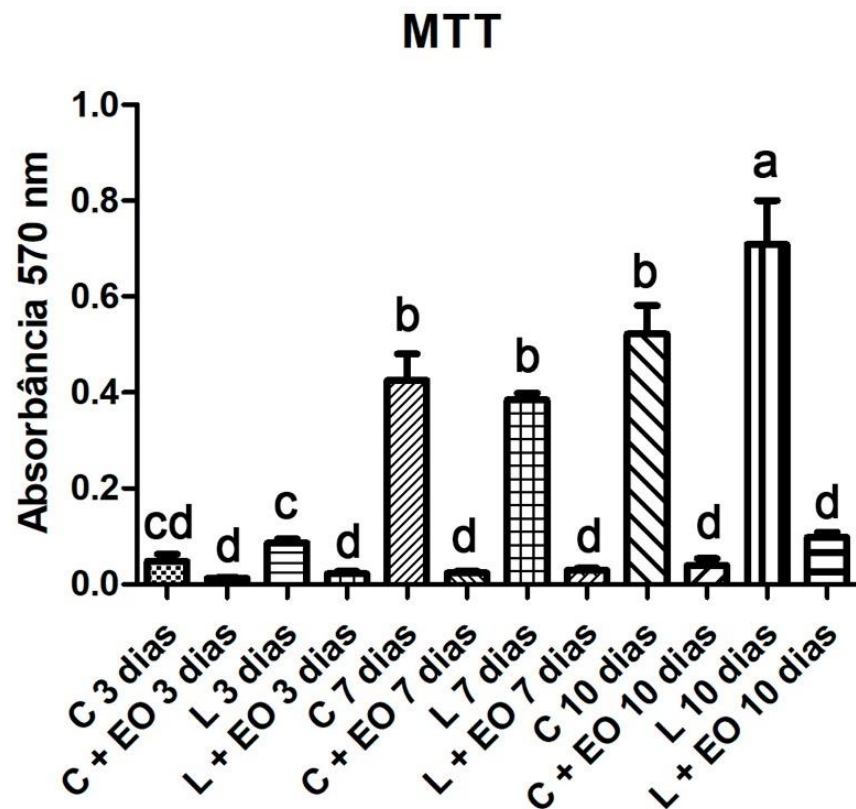
### **4.1. Viabilidade Celular (MTT)**

Os ensaios de MTT foram feitos nos períodos de 3, 7 e 10 dias, onde foi possível observar que a viabilidade celular foi significativamente maior nos grupos que não receberam peróxido de hidrogênio, independente da administração do licopeno (Figura 4).

Na análise comparativa dos períodos experimentais, pode ser observado que houve aumento da viabilidade celular ao longo do tempo no grupo C entre 3 e 7 dias de cultura e no grupo L entre 7 e 10 dias de cultura. Já os grupos C+EO e L+EO apresentaram baixa viabilidade sem aumento significativo ao longo do experimento (Figura 5).



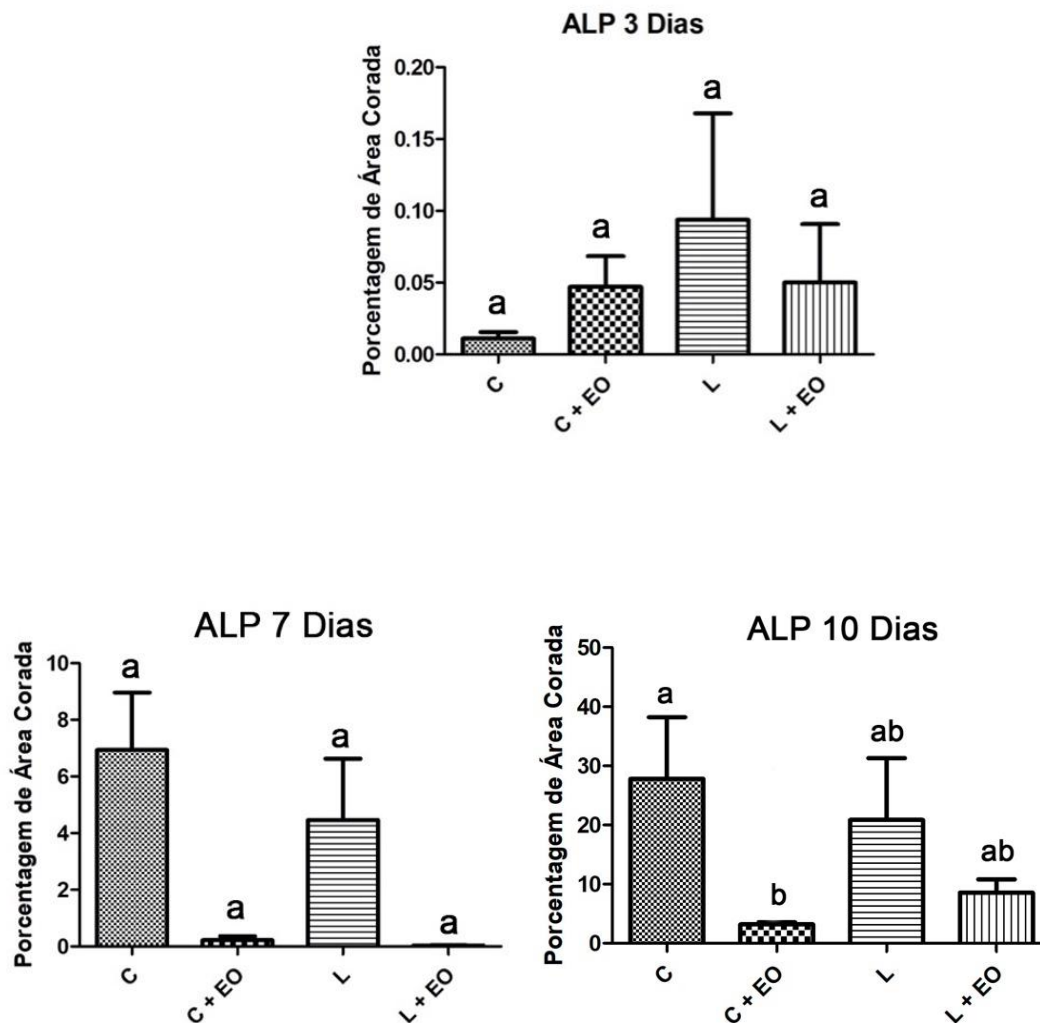
**Figura 4.** Viabilidade das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO). As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .



**Figura 5.** Viabilidade ao longo dos períodos experimentais das células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO). As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

#### 4.2. Análise da atividade da fosfatase alcalina (ALP) in situ

Os resultados deste ensaio foram coletados nos períodos de 3, 7 e 10 dias e posteriormente os discos foram fotografados e quantificados no programa ImageJ através da quantificação de pixels vermelhos obtidos pela coloração Fast Red (Sigma).



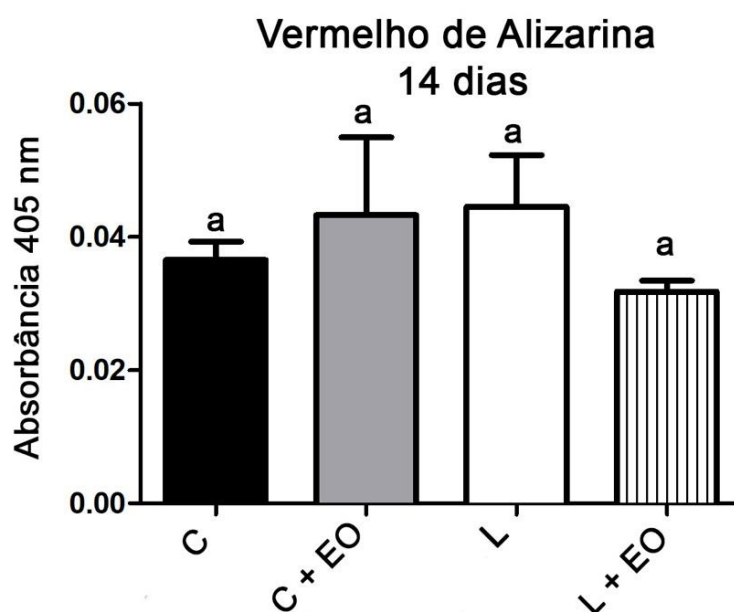
**Figura 6.** Gráfico da porcentagem de ALP corada em vermelho por Fast Red na cultura de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado e divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO) durante os períodos de 3, 7 e 10 dias. As colunas que não possuem a mesma letra indicam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

Nos períodos de 3 e 7 dias, não houveram diferenças significativas entre os grupos experimentais, apesar de um aumento qualitativo de detecção de ALP no grupo L aos 3 dias. Já aos 10 dias, foi observado uma diminuição significativa de fosfatase alcalina no grupo C+EO quando comparado ao grupo C (Figura 6).



### 4.3. Quantificação de Nódulos de Mineralização

Este ensaio foi realizado pelo método de Midura (STANFORD et al., 1995), no qual as células foram fixadas em álcool 70%. Os nódulos foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e feita a fotografia dos discos para análise qualitativa, para então posteriormente ser realizada a quantificação pelo método da extração deste pigmento. Foi observado que, após 14 dias de cultura, não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Figura 7).



**Figura 7.** Quantificação do vermelho de alizarina extraído dos nódulos de mineralização. Grupos: Controle (C); Controle + Estresse Oxidativo (C + EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse Oxidativo (L + EO). Letras diferentes sobre os grupos indicam diferença estatística. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

### 4.4. Ensaio de Adesão Celular

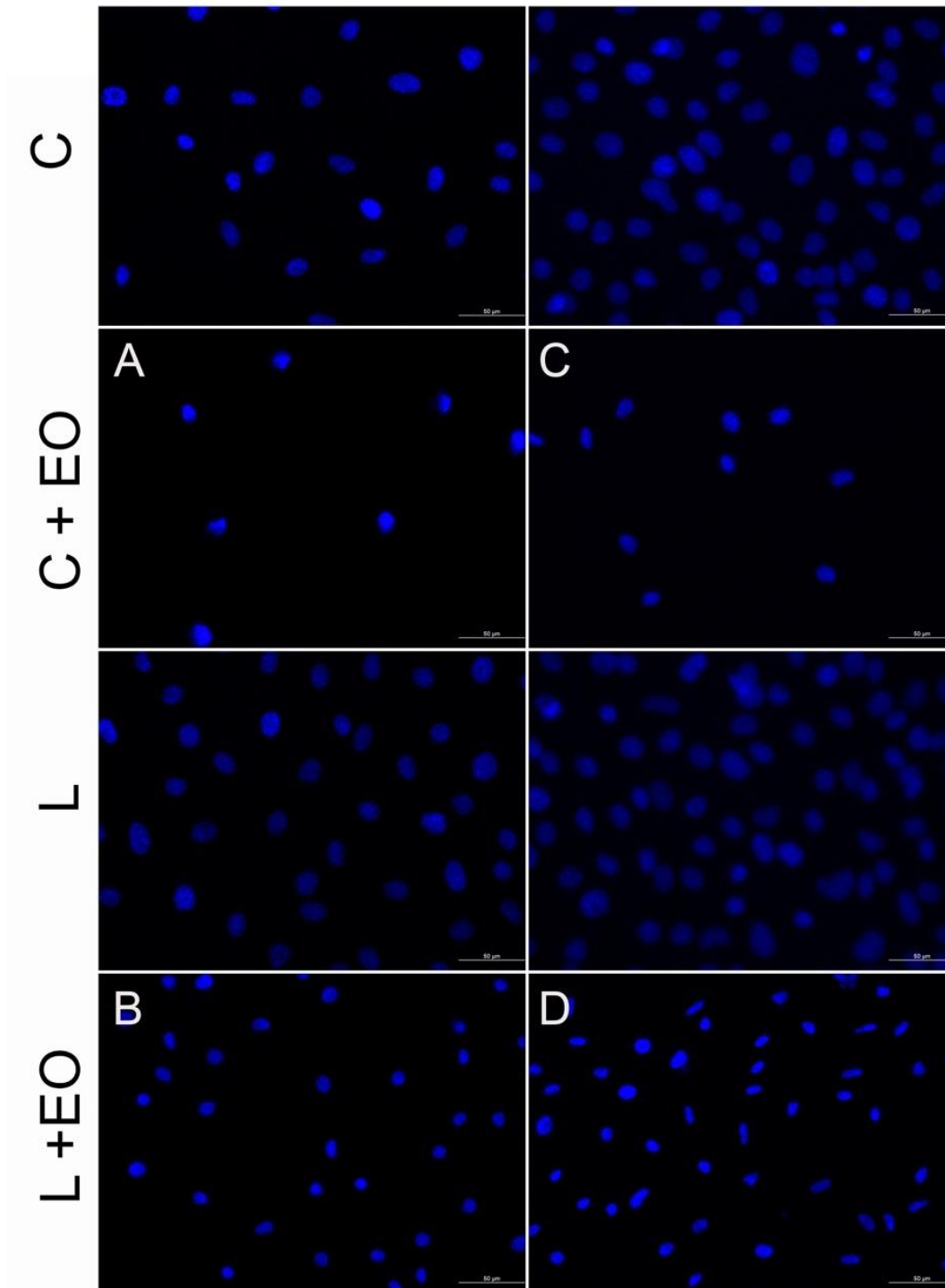
Este ensaio foi realizado a partir da contagem de células marcadas pelo DAPI na fluorescência a partir de 15 imagens aleatórias em cada disco de todos

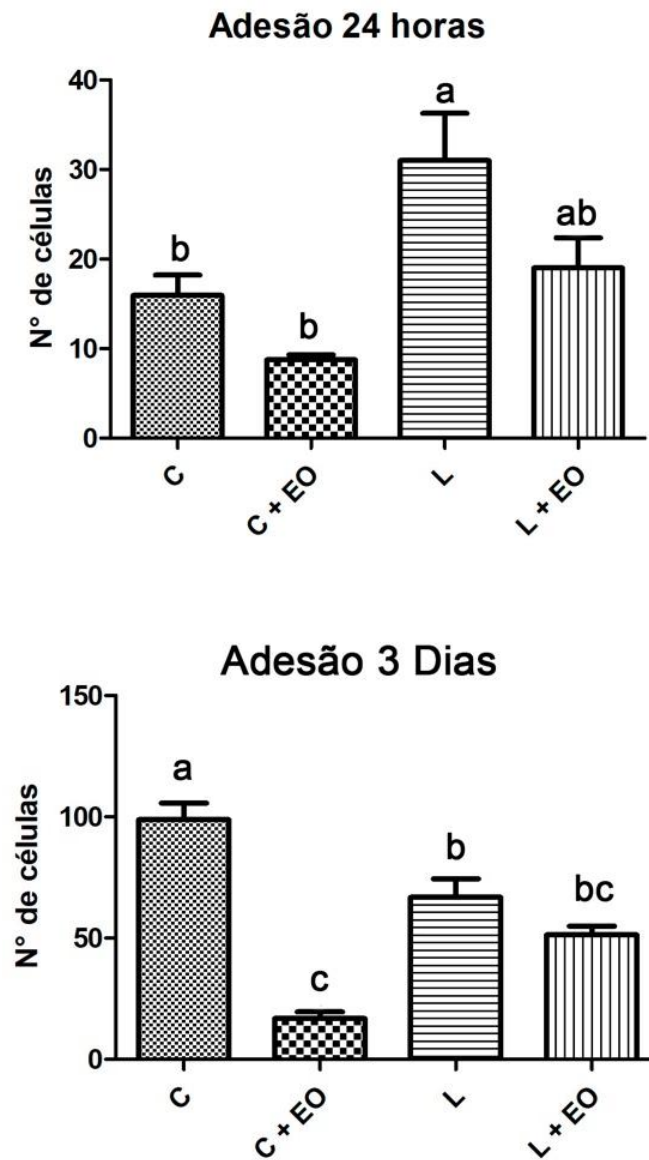
os grupos experimentais. A análise qualitativa demonstra maior quantidade de células no grupo L+EO quando comparado ao grupo C+EO nos períodos de 24 horas (figura 08.1., A e B) e em 3 dias (figura 08.1., C e D). O resultado mostrou a diferença devido a presença do antioxidante na quantidade de células aderidas sobre a superfície de titânio quando submetidos ao estresse oxidativo (A e B em 24 horas; C e D em 3 dias). Já na Figura 8.2, podemos observar às 24 horas, um aumento significativo da adesão celular das células do grupo L quando comparado aos outros grupos, além de uma diferença significativa no aumento da adesão do grupo L+EO quando comparado ao grupo C+EO. Já aos 3 dias de cultura, houve uma diminuição significativa na adesão celular no grupo C+EO quando comparado ao grupo C e ao grupo L. O grupo L+EO foi estatisticamente similar aos grupos C+EO e L.

1.

24 horas

3 dias

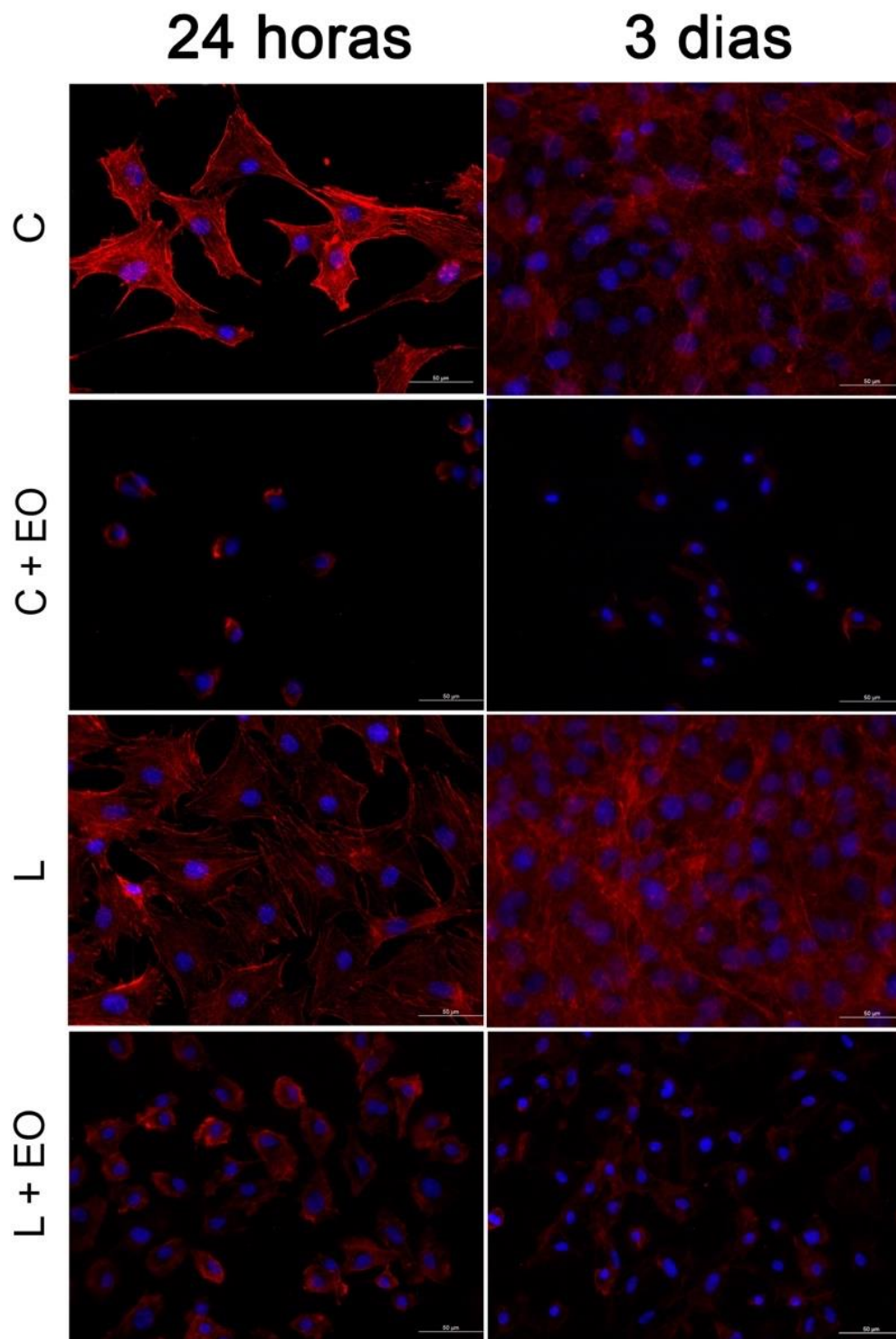


**2.**

**Figura 8. 1-** Adesão celular de células MC3T3-E1 cultivadas sobre titânio nanotexturizado divididas em grupo controle (C), controle + estresse oxidativo (C+EO), licopeno (L) e licopeno + estresse oxidativo (L+EO) durante os períodos de 24 horas e 3 dias. **2-** Gráfico da média entre os grupos. Letras diferentes sobre os grupos indicam diferença estatística. Teste estatístico ANOVA para  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Morfologia Celular

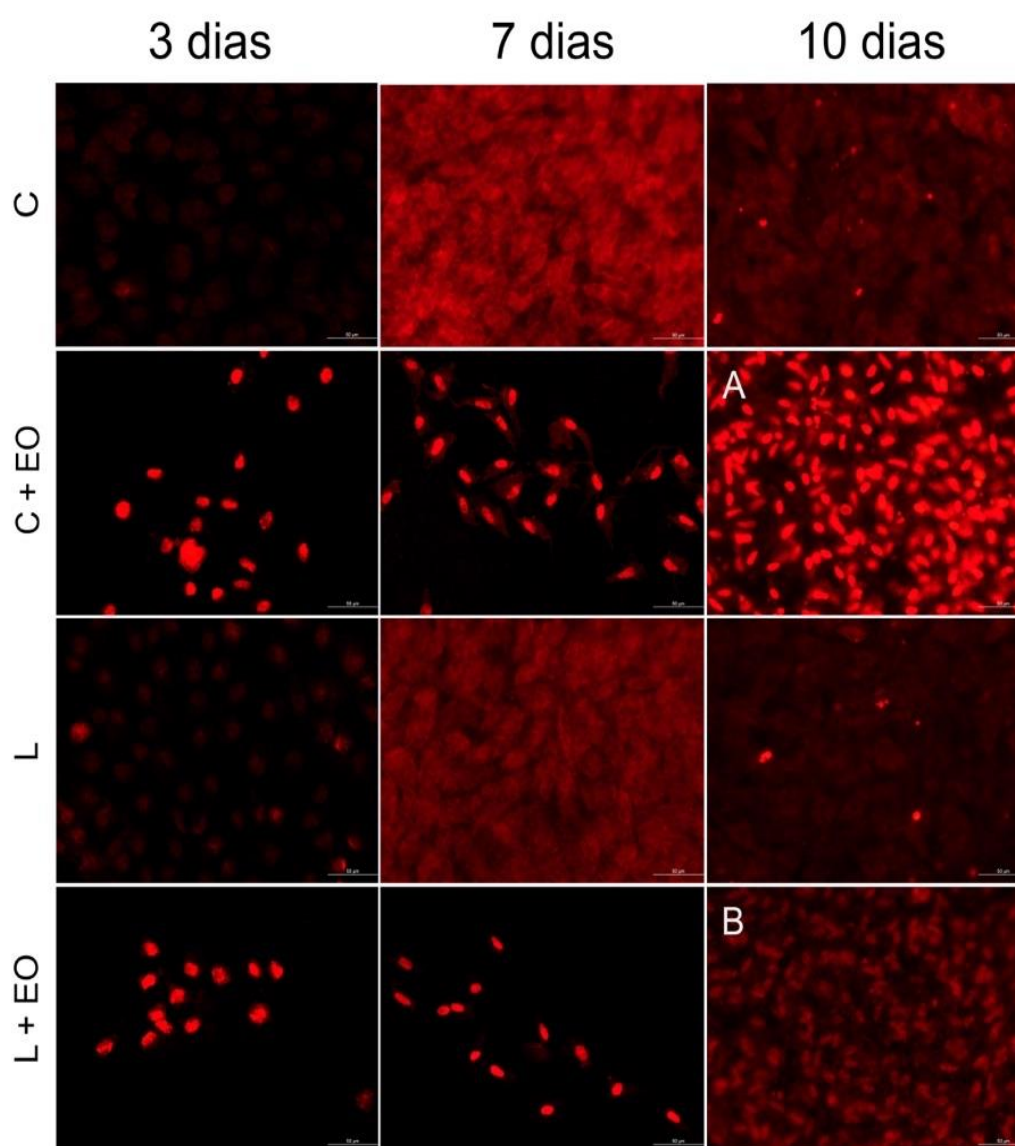
A fluorescência foi realizada com 24 e 72 horas (3 dias) com o objetivo de analisar a morfologia celular nesses períodos. Pode ser observado na Figura 9 que as células do grupo C e do grupo com L após 24 horas e 3 dias de cultura estão bem espalhadas sobre o disco de titânio, exibindo arquitetura citoesquelética padrão, o que pode ser observado em vermelho. Todas as células apresentam núcleo intacto sem sinais de apoptose, o que pode ser observado em azul. Entretanto, as células do grupo C+EO mostram alterações em sua arquitetura, com contração e irregularidade na distribuição de actina, culminando com escassez de citoplasma e núcleos com volume reduzido. As células do grupo L+EO, apesar de não apresentarem morfologia semelhante aos grupos controles, mostram manutenção do volume citoplasmático e integridade nuclear, com maior organização da arquitetura citoesquelética quando comparado ao grupo C+EO após 24 horas e 3 dias de cultura.



**Figura 9.** Fluorescência da morfologia celular osteoblástica MC3T3-E1 através da coloração nuclear com DAPI e citoesqueleto com faloidina 594 red. Grupos nas linhas: Controle (C); Controle + Estresse (C+EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse (L+EO). Períodos experimentais nas colunas: 24 horas e 3 dias.

#### 4.6 Análise Qualitativa das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O ensaio para a detecção das EROs foi feito nos períodos de 3, 7 e 10 dias. A análise qualitativa deste experimento foi feita a partir de imagens realizadas no microscópio de fluorescência Leica (DMI3000 B; Leica) com comprimento de onda 535 nm, seguindo o protocolo de ZHANG et al. (2019).



**Figura 10.** Fluorescência das espécies reativas de oxigênio, comprimento de onda 535 nm, coradas em vermelho. Grupos nas linhas: Controle (C); Controle + Estresse (C+EO); Licopeno (L); Licopeno + Estresse (L+EO). Períodos experimentais nas colunas: 3, 7 e 10 dias.

As EROs foram coradas em vermelho, sendo possível detectar maior quantidade nas imagens onde a cor é mais intensa. Nos grupos C e L, pode ser observado que a marcação é pouco intensa, com alguns pontos aos 10 dias. Já no grupo C+EO, onde as células sofreram estresse, há uma maior presença das EROS, principalmente no núcleo celular, e uma menor quantidade de células, quando comparado aos grupos C e L (Figura 10). No período de 10 dias é possível observar uma maior coloração no grupo C+EO (Figura 10. A) em comparação ao L+EO (Figura 10. B). O grupo L+EO por sua vez, ainda apresenta núcleos marcados no início da cultura, mas em menor quantidade que o grupo C+EO, sendo que aos 10 dias assume uma marcação similar aos grupos C e L.





*DISCUSSÃO*

---



## 5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi mostrar o potencial antioxidante do licopeno mediante ao estresse oxidativo induzido em modelo in vitro, para que se pudesse avaliar sua ação benéfica sobre as células osteoblásticas, analisando sua morfologia, proliferação, diferenciação e formação de matriz mineralizada. A presença do titânio nanotexturizado como substrato de adesão foi a forma utilizada de avaliar a proliferação e diferenciação osteoblástica similar ao processo de osseointegração de implantes. Esta característica superficial é comum e está presente em muitos implantes comercializados atualmente (LE GUÉHENNEC et al., 2007).

A primeira parte da hipótese formulada pode ser comprovada parcialmente, pelos resultados bioquímicos obtidos no presente estudo. O ensaio de viabilidade celular foi analisado com base em estudos anteriores como de OLIVEIRA et al. (2019), onde constatou-se um aumento da viabilidade de células da medula óssea diferenciadas em osteoblastos de ratas ovariectomizadas em cultura na presença do licopeno aos 10 dias de cultura. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que as células MC3T3-E1 apresentaram maior viabilidade nos grupos que não sofreram estresse oxidativo quando comparado aos demais em todos os períodos experimentais. Além disso, a maior viabilidade observada no grupo L aos 3 e 10 dias sugere que o licopeno pode favorecer a proliferação e viabilidade celular principalmente em períodos iniciais, mas sem resultado significativo na presença do peróxido de hidrogênio como indutor de estresse oxidativo.

Em um estudo realizado por SEMEGHINI et al. (2022), onde foi realizada a detecção in situ de ALP em células de medula óssea de ratas ovariectomizadas por meio do Fast Red (Sigma®), houve aumento significativo da presença desta enzima nos grupos ovariectomizados com e sem a presença de licopeno, porém houve menor expressão de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo controle. Os resultados obtidos com a MC3T3-E1 neste trabalho mostraram que a presença do licopeno, apesar de ser benéfica, não aumentou significativamente a expressão de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo controle e aos que sofreram estresse oxidativo. Esses dados sugerem que mesmo tendo sido administrado o fitoterápico em meio de cultura, ele não induziu a diferenciação osteoblástica de forma significativa sobre o titânio na concentração utilizada.

A formação de nódulos de mineralização aos 14 dias não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sugerindo que a mineralização mediante ao estresse induzido não sofre alterações neste estágio, visto que a deposição de matriz pelas células já pode ter acontecido em um estágio anterior da cultura. Por outro lado, estudos in vivo mostraram que a ingestão de licopeno em modelos experimentais com ratas ovariectomizadas gerou diferença significativa na formação óssea peri implantar, observada principalmente por ensaios biomecânicos (Li et al., 2018). O resultado in vitro deste trabalho sugere que, apesar de haver estresse oxidativo 4 horas antes do ensaio, as células já haviam formado nódulos de mineralização em um estágio anterior, não refletindo os efeitos da exposição ao peróxido de hidrogênio.

A segunda parte da hipótese formulada no presente estudo pode ser comprovada pelo fato de que a análise da morfologia celular e nuclear feita por fluorescência mostrou que após o estresse oxidativo, o licopeno teve ação benéfica na preservação de algumas características morfológicas da estrutura celular dos osteoblastos em relação ao grupo que não recebeu o antioxidante. Estudos anteriores mostraram através da imunofluorescência que células MC3T3-E1 expostas ao peróxido de hidrogênio sofrem contração e irregularidade das fibras de actina presentes no citoesqueleto com menor espalhamento celular, porém na presença de fitoterápico antioxidante suas estruturas se mantêm regulares (CEVERINO et al., 2021). Analisando os resultados do presente trabalho, é possível sugerir que a presença do licopeno em cultura exposta ao estresse oxidativo favorece a preservação da estrutura morfológica celular e nuclear, conseqüentemente favorecendo a manutenção do desenvolvimento das células osteoblásticas sobre o titânio. A partir das mesmas imagens, a coloração nuclear por DAPI foi utilizada para realizar a contagem média de osteoblastos aderidos aos discos. Em CEVERINO et al. (2021), após 3 dias de cultura, o grupo exposto ao peróxido de hidrogênio sofreu uma diminuição significativa na adesão celular quando comparado ao grupo controle e o grupo que recebeu extrato de erva-mate previamente à exposição ao  $H_2O_2$ . No presente trabalho, o grupo de células expostas ao estresse oxidativo associado ao tratamento prévio com licopeno mostrou adesão aos discos de titânio similar ao grupo controle e ao grupo com licopeno somente após 24 horas de cultura. É interessante enfatizar o aumento significativo de adesão celular no grupo L neste período experimental, sugerindo que o licopeno favoreceu o

período inicial de adesão das células MC3T3-E1 sobre o titânio, independente da presença do peróxido de hidrogênio.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) provocam um espectro de respostas que vão desde a proliferação, crescimento, interrupção da diferenciação até a morte celular, ativando inúmeras vias de sinalização (DOMAZETOVIC et al., 2017). A detecção das EROs presente nas células significa a presença do estresse na cultura, o que pode ser observado no presente trabalho, onde o grupo C+EO apresentou intensa marcação para espécies reativas de oxigênio em todos os períodos experimentais. A pré-administração do licopeno na cultura demonstrou apresentar um efeito antioxidante especialmente após 10 dias de cultura, onde a marcação para espécies reativas de oxigênio ficou bem menos intensa, sugerindo que a longo prazo, a administração do licopeno da concentração utilizada diminuiu a quantidade de EROS e consequentemente seus efeitos prejudiciais aos osteoblastos.

Estudos anteriores com células osteoblásticas in vivo demonstraram melhora na formação óssea em epífises de ratas osteoporóticas quando tratadas com licopeno (SEMEGHINI et al., 2020). O presente estudo teve o objetivo de trazer para o modelo in vitro o mesmo estresse oxidativo gerado no leito ósseo em modelos de osteoporose experimental realizada em animais. No modelo in vitro, as células sofrem o estresse oxidativo pela presença do peróxido de hidrogênio e, além disso, foram cultivadas sobre discos de titânio, simulando o processo de osseointegração na presença de osteoporose.

Algumas limitações deste estudo podem ser enfatizadas, como por exemplo, a utilização de somente uma concentração do licopeno, o que pode refletir na ausência de dados significativos. O uso de linhagens celulares no modelo *in vitro*, ainda que tenham vantagens em favorecer resultados padronizados dos parâmetros avaliados, diferem de experimentos com culturas primárias ou mesmo modelos *in vivo* que podem trazer novos dados sobre os efeitos do licopeno nas células osteoblásticas e sua associação com biomateriais como o titânio. Além disso, a indução do estresse pelo peróxido de hidrogênio necessita uma melhor padronização em relação à concentração ideal para que não haja morte celular em excesso na cultura em períodos de cultura muito longos. Por fim, o protocolo de detecção de EROs, apesar de visualmente demonstrar diferenças importantes, deixa de trazer dados quantitativos que poderiam mostrar significância estatística. Mesmo assim, efeitos positivos da pré-administração do licopeno obtidos no presente estudo mostram um potencial deste antioxidante em favorecer a integridade celular osteoblástica na presença de estresse oxidativo, e deveria ser mais investigado para seu uso em situações de injúria ao metabolismo do tecido ósseo como ocorre na osteoporose.





*CONCLUSÃO*

---



## 6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos é possível concluir que:

- O estresse oxidativo pela exposição ao peróxido de hidrogênio na concentração utilizada causa danos na estrutura celular levando à alteração na morfologia e morte por apoptose.
- O licopeno promoveu um aumento significativo da viabilidade celular quando comparado ao grupo controle no período inicial, porém não mostrou efeito significativo associado à exposição ao peróxido de hidrogênio na concentração utilizada.
- A detecção in situ de ALP foi menor no grupo controle exposto ao peróxido de hidrogênio aos 10 dias quando comparado ao grupo controle, sendo que não houve diferença significativa com a pré-administração de licopeno na concentração utilizada.
- A formação de nódulos mineralizados foi similar entre todos os grupos estudados.
- Os osteoblastos cultivados sobre disco de titânio na presença do licopeno associado à exposição ao peróxido de hidrogênio mantiveram sua adesão similar ao grupo controle.
- Os osteoblastos cultivados sobre disco de titânio e com pré-administração de licopeno associado à exposição ao peróxido de hidrogênio mantiveram melhor morfologia nuclear e citoplasmática quando comparado às células sem o antioxidante e na presença de estresse oxidativo.

- A utilização do licopeno deve ser considerada e mais investigada em outras concentrações, pois ele preserva a integridade das células osteoblásticas, o que possivelmente pode favorecer a osseointegração com implantes de titânio.



## *REFERÊNCIAS*

---





## REFERÊNCIAS

AGARWAL, R.; GARCÍA, A. J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Drug delivery to bony tissue. v. 94, p. 53–62, 1 nov. 2015.

ARBALLO, J.; AMENGUAL, J.; ERDMAN, J. W. Lycopene: A Critical Review of Digestion, Absorption, Metabolism, and Excretion. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 342, mar. 2021.

ARDAWI, M. S. M. et al. Lycopene nanoparticles promotes osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 22, p. 6894–6907, nov. 2021.

ARDAWI, M.-S. M. et al. Lycopene treatment against loss of bone mass, microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model. **Bone**, v. 83, p. 127–140, 1 fev. 2016.

CEVERINO, G. C. et al. Preadministration of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) helps functional activity and morphology maintenance of MC3T3-E1 osteoblastic cells after in vitro exposition to hydrogen peroxide. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 13–20, 1 jan. 2021.

COSTA, L.J.D. et al. Superfície de implantes de titânio e sua capacidade de estímulo na formação óssea: uma revisão de literatura. **Odontologia Clínica-Científica (Online)**, 14(4), 797-800.2015.

DE CARVALHO, B.M. et al. Surface treatments in dental implants. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac., Camaragibe** v.9, n.1, p. 123 - 130, jan./mar. 2009.

DOMAZETOVIC, V. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209–216, 2017.

GAJOWIK, A.; DOBRZYŃSKA, M. M. Lycopene - antioxidant with radioprotective and anticancer properties. A review. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 65, n. 4, p. 263–271, 2014.

GEETHA, M. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 397–425, maio 2009.

JEMAT, A. et al. Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. **BioMed Research International**, v. 2015, p. e791725, 7 set. 2015.

JOHNSON, E.J. The role of carotenoids in human health. **Nutrition in clinical care**, 5(2), 56-65, 2002.

KELKEL, M. et al. Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. **Free Radical Research**, v. 45, n. 8, p. 925–940, 1 ago. 2011.

LE GUÉHENNEC, L. et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental Materials**, v. 23, n. 7, p. 844–854, 1 jul. 2007.

LI, L.-H. et al. Improved biological performance of Ti implants due to surface modification by micro-arc oxidation. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2867–2875, 1 jun. 2004.

LI, X. et al. Effect of lycopene on titanium implant osseointegration in ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 1, p. 237, 17 set. 2018.

OLIVEIRA, G. R. et al. Lycopene influences osteoblast functional activity and prevents femur bone loss in female rats submitted to an experimental model of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, n. 4, p. 658–667, 1 jul. 2019.

SACCO, S. M.; HORCAJADA, M.; OFFORD, E. Phytonutrients for bone health during ageing. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 697–707, mar. 2013.

SAINI, R. K. et al. Protective effects of lycopene in cancer, cardiovascular, and neurodegenerative diseases: An update on epidemiological and mechanistic perspectives. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104730, 1 maio 2020.

SEMEGHINI, M. S. et al. Lycopene prevents bone loss in ovariectomized rats and increases the number of osteocytes and osteoblasts. **Journal of Anatomy**, v. 241, n. 3, p. 729–740, 2022.

SOLA-RUIZ, M. F. et al. Behavior of Human Osteoblast Cells Cultured on Titanium Discs in Relation to Surface Roughness and Presence of Melatonin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 823, 13 abr. 2017.

STANFORD, C. M. et al. Rapidly Forming Apatitic Mineral in an Osteoblastic Cell Line (UMR 106—01 BSP) (\*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 16, p. 9420–9428, 21 abr. 1995.

TAMBASCO DE OLIVEIRA, P.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**, v. 25, n. 3, p. 403–413, 1 fev. 2004

TAVARES, M. G. et al. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances contact osteogenesis. **Clinical Oral Implants Research**, v. 18, n. 4, p. 452–458, ago. 2007.

ZENG, Y.-C. et al. Protective effect and mechanism of lycopene on endothelial progenitor cells (EPCs) from type 2 diabetes mellitus rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 86–94, 1 ago. 2017.

ZHANG, Q. et al. Curculigoside Protects against Excess-Iron-Induced Bone Loss by Attenuating Akt-FoxO1-Dependent Oxidative Damage to Mice and Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. e9281481, 19 dez. 2019.