

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

MARINA CORREIA CASSIANI

**Avaliação in vitro da adesão, proliferação e
expressão de proteínas por meio de
imunofluorescência de células osteoblásticas
MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de
macrófagos da linhagem RAW 264.7**

Ribeirão Preto

2022

MARINA CORREIA CASSIANI

**Avaliação in vitro da adesão, proliferação e
expressão de proteínas por meio de
imunofluorescência de células osteoblásticas
MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de
macrófagos da linhagem Raw 264.7**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de graduada
em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi
Bombonato Prado.

Ribeirão Preto

2022

Aos meus pais,
que sempre foram minha base e motivação,
e ao meu irmão Lucas,
por ser minha luz.

AGRADECIMENTOS

Devo a concretização desse trabalho e dessa caminhada à muitas pessoas. Deixo minha gratidão à todos que contribuíram de alguma forma nessa maravilhosa etapa de minha vida, me incentivando e fazendo entender que tudo isso é mais um degrau de uma longa jornada!

Aos meus pais, Paulo Roberto e Ana Alice, que com carinho e dedicação foram os precursores da minha educação. Obrigada pelo apoio incondicional ao meu crescimento, por terem sido fonte de força e apoio em tantos momentos e com todo amor contribuíram para eu ser quem sou hoje.

Ao meu irmão, Lucas, por ser meu melhor amigo e companheiro, estando presente em cada momento da minha vida, sendo meu ponto de confiança.

Aos meus amigos, que caminharam diariamente ao meu lado, deixando esses cinco anos mais alegres, divertidos e leves. Pessoas que levo no coração e para a vida.

Agradeço a todos meus professores e orientadores durante essa jornada, em especial, à Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado e ao Prof. Dr. Jorge Esquiche León, exemplos de dedicação. Obrigada por todos os ensinamentos, por me acolherem nas pesquisas e me proporcionarem todo apoio e paciência de que precisei, deixo aqui minha enorme admiração!

E à FAPESP, pelo suporte financeiro e pela oportunidade de desenvolver meus projetos de pesquisa.

RESUMO

CASSIANI, M.C. **Avaliação in vitro da adesão, proliferação e expressão de proteínas por meio de imunofluorescência de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A osteogênese é alcançada não somente por células osteoblásticas do sistema esquelético, mas também como resultado de uma cooperação com múltiplos sistemas, entre eles, o imune. Células como macrófagos liberam várias moléculas sinalizadoras que poderiam afetar positiva ou negativamente a capacidade osteogênica dos osteoblastos. Sendo assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar a influência do meio condicionado de células da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 polarizadas em M1 por meio de lipopolissacarídeos (LPS), na cultura de células osteoblásticas murinas MC3T3-E1. Após o armazenamento do meio condicionado, as células osteoblásticas foram cultivadas em garrafas em meio de cultura osteogênico até a subconfluência e plaqueadas em uma concentração de 2×10^4 células por poço em placas de cultura (n=5) com lamínulas de vidro já posicionadas e adequadas para a adesão e proliferação das células. Os grupos experimentais foram divididos em células controles (C) e células tratadas com 50% de meio condicionado de macrófagos (MC). Após os tempos experimentais, foram avaliados os seguintes parâmetros: adesão e proliferação celular, além da expressão das proteínas fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN) por meio de imunofluorescência. Os dados numéricos obtidos foram analisados por programas estatísticos adequados para $p \leq 0.05$. A adesão celular foi maior para o grupo MC apesar de ausência de

significância estatística. A análise qualitativa com marcador Ki-67 revelou maior proliferação celular no grupo MC. A imunolocalização das proteínas ALP e BSP foi similar entre os grupos e maior no grupo MC para a proteína OPN. Os resultados sugerem que a presença do meio condicionado de macrófagos possa estimular a adesão e a atividade funcional de células osteoblásticas.

Palavras-chave: macrófagos, osteoblastos, meio condicionado

ABSTRACT

CASSIANI, M.C. **Influence of RAW 264.7 macrophages conditioned medium on adhesion, proliferation and immunolocalization of proteins in MC3T3-E1 osteoblastic cells.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Osteogenesis is achieved not only by osteoblastic cells but also as a result of cooperation with several systems such as the immune system. Macrophages may secrete several signaling molecules, which may affect in a good or bad way the osteogenic capacity of osteoblasts. Thus, the objective of this project was to evaluate the influence of a medium conditioned with RAW264.7 macrophages polarized for M1 (using LPS) in the culture of MC3T3-E1 osteoblastic cells. After the storage of the conditioned medium, osteoblastic cells were cultured in flasks in the osteogenic medium until subconfluence and seeded at a concentration of 2×10^4 cells per well in culture plates ($n = 5$) on glass slides adequate for cell adhesion and proliferation. Experimental groups were divided into control cells (C) and treated with 50% of the conditioned medium (MC). After the experimental period, the following parameters were evaluated: cell adhesion proliferation as well as expression of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), and osteopontin (OPN) employing immunolocalization. Statistical programs consistent with significance $p \leq 0.05$ analyzed the results. Cell adhesion was higher for the MC group despite the absence of statistical significance. Qualitative analysis with Ki67 marker revealed an increase in cell proliferation in the group MC after 24 hours and 3 days of culture. Immunolocalization of ALP and BSP was similar between the groups and higher in the MC group for OPN protein. The results suggest that the conditioned medium of macrophages

polarized to M1 may stimulate adhesion and functional activity in osteoblastic cells.

Key-words: macrophages, osteoblasts, conditioned medium

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Materiais e Métodos	11
2.1. Preparação do meio básico adequado para RAW 264.7	11
2.2. Expansão celular	12
2.3. Armazenamento do meio condicionado	12
2.4. Preparação do meio base adequado para MC3T3 - E1	14
2.5. Expansão das células	15
2.6. Plaqueamento	16
2.7. Ensaio de adesão celular	16
2.8. Ensaio de proliferação celular por marcação com Ki67	17
2.9. Ensaio de expressão de proteínas	18
2.10. Forma de análise dos resultados	18
3. Resultados	19
3.1. Ensaio de adesão celular	19
3.2. Ensaio de proliferação celular por marcação Ki67	20
3.3. Ensaio de expressão de proteínas	21
4. Discussão	23
5. Conclusão	26
6. REFERÊNCIAS	27

1.Introdução

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado formado por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e por uma matriz extracelular calcificada, denominada matriz óssea, a qual é constituída por uma parte orgânica (fibras colágenas, proteoglicanos, glicoproteínas) e por uma parte inorgânica (íons de fosfato e cálcio). Esse tecido é responsável por promover a sustentação corporal e possibilitar a locomoção esquelética.

Segundo Li et al. (2018), a osteogênese é alcançada não somente pelas células osteoblásticas do sistema esquelético, mas por uma cooperação com múltiplos sistemas, entre eles o sistema imune. Células como polimorfonucleares neutrófilos, monócitos e macrófagos podem secretar vários tipos de moléculas sinalizadoras, tais como espécies reativas de oxigênio (ROS), interleucina-8, TNF α , IL-6, IL-4 e IL-10, as quais poderiam afetar a capacidade osteogênica dos osteoblastos.

Esta associação do sistema esquelético com o sistema imune permite com que haja um compartilhamento de moléculas reguladoras, incluindo citocinas, receptores, moléculas de sinalização e transdutores de sinalização (Jiang et al., 2015), fazendo com que alguns componentes do sistema imune tenham um impacto significativo no osso, auxiliando na explicação da ocorrência de osteoporose em conjunto com reações inflamatórias crônicas (Pietschmann et al., 2016).

A osteoporose é uma doença que acomete principalmente as mulheres na pós-menopausa e idosos, apresentando elevada taxa de morbimortalidade (Radominski et al., 2017). Dado que, devido às fraturas, há a ocorrência de dor, incapacidade física e deformidades, é de extrema importância que a população de risco seja identificada através do diagnóstico e tratamento precoces. Além disso, pode-se comprovar o efeito sistêmico da osteoporose ao observar que a patologia atinge não

somente as vértebras, como também o osso alveolar, o que torna sua presença um fator de risco para o sucesso de implantes dentários (Radi et al., 2018). Por sua vez, os implantes dentários e suas propriedades particulares, principalmente de rugosidade superficial, também podem influenciar a resposta de células imunológicas e regular a osteogênese durante a osseointegração (Li et al., 2018).

Muitos tipos de células imunes participam da resposta imune induzida, tais como os linfócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos (Franz et al., 2011). De acordo com um estudo realizado por Li et al. (2015), linfócitos T e B desempenham um importante papel na mobilização de células progenitoras hematopoiéticas, (HSPC), regulando a remodelação óssea. Já estudos como o de Chang et al. (2008) e Pettit et al. (2008) mostram que os macrófagos têm um papel essencial para a eficiência da osteogênese e que sua depleção levaria à uma perda completa da remodelação óssea in vivo. As citocinas, moléculas de sinalização e fatores de crescimento liberados pelos macrófagos podem exercer um papel importante no estímulo ou inibição da osteogênese (Sridharan et al., 2015). Apesar disso, o papel destas moléculas na osteomodulação ainda é controverso e não muito conhecido.

Com base no exposto acima, é notória a influência mútua e complexa entre células do sistema imune, e o tecido ósseo, em diversos aspectos. No entanto, na literatura existem poucos estudos que abordam tal associação. Assim, realizamos o aprofundamento do estudo sobre a relação sistema imune e tecido ósseo para o auxílio no entendimento de doenças prevalentes como a osteoporose com o auxílio de linhagens pré estabelecidas e baseado na literatura recente (Tu et al. 2015, Cho et al., 2016, Edelmayer et al., 2017, Zhang et al., 2017).

A partir desses dados, e ao percorrer de todo o período de vigência da bolsa, foi realizada a coleta e posterior armazenamento do meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7 polarizadas em M1 por meio de lipopolissacarídeos. A quantidade de meio a ser coletada foi determinada previamente no planejamento do projeto, levando-se em

consideração a quantidade necessária para realizar o plaqueamento e as trocas de meio a cada 2 dias, até a finalização de todos os experimentos propostos. O meio coletado foi armazenado em tubos de 50 ml e congelado em freezer a -20°C para ser utilizado nas etapas seguintes. Além disso, foi realizada a expansão de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 e seu plaqueamento após atingida a confluência adequada das células, foi também executado ensaio de adesão celular, confecção das imagens para contagem e construção de gráficos. Nos meses seguintes, deu-se continuidade ao projeto, de forma a realizar os ensaios de proliferação celular por meio do marcador Ki67, em que as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro por 24 e 48 horas, além de realizados os ensaios de imunofluorescência para expressão de proteínas relacionadas com o processo de osteogênese (ALP, BSP e OPN), em que as células também foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, mas por um período de 3 dias; após, confecção de gráficos, realização e sobreposição das imagens obtidas, para confecção de pranchas, a fim de comparar a expressão proteica em imunofluorescência. A seguir, está descrita a metodologia utilizada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação do meio básico adequado para RAW 264.7

Para realizar a cultura da linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 polarizados em M1 por lipopolissacarídeos (LPS), inicialmente foi preparado 400 ml do meio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e calibrado seu pH entre 6,7 e 6,8 de forma que alcançasse pH 7,0 durante sua filtração, no fluxo. Posteriormente, o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. Para isso, adicionou-se 360 ml de D-MEM filtrado em uma garrafa de 500 ml e verteu-se sobre ele 40 ml de soro fetal bovino e duas alíquotas de 1 ml cada de penicilina/estreptomicina que foram previamente descongeladas.

2.2. Expansão celular

A garrafa com meio suplementado de D-MEM foi aquecida em banho-maria a 37°C durante 20 minutos. Enquanto isso, a linhagem celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi descongelada de vials armazenados em tambores de nitrogênio. Adicionou-se 4 ml de meio aquecido e o conteúdo do vial em um tubo Falcon de 15 ml. Levou-se o conjunto para a centrífuga por 5 minutos a 2.000 rpm, de maneira que um pellet foi formado ao fundo. O sobrenadante foi vertido de uma vez em um descarte, com a precaução de manter o pellet no fundo do tubo. Foi realizada a suspensão e homogeneização do pellet com 2 ml de meio novo. Após isso, 19 ml de meio foi adicionado em uma garrafa de cultura de 75 cm³ e 19ml adicionados a uma segunda garrafa de cultura. Adicionou-se 1 ml do meio com as células em cada garrafa, completando, assim, os 20 ml. Após a finalização, observou-se no microscópio e as garrafas foram levadas para estufa a 37°C e 5% de CO₂.

2.3. Armazenamento do meio condicionado

O Lipopolissacarídeo utilizado foi obtido de E. coli, em total possuía 1 mg e foi fornecido enquanto pó liofilizado. Portanto, foi adicionado 1 ml de PBS filtrado (phosphate buffered saline) e homogeneizado suavemente até o pó se dissolver. Em seguida, foram feitas alíquotas de 50 µL em 20 tubos eppendorf, que foram armazenados em freezer a -20°C.



Figura 1 - LPS enquanto pó liofilizado.

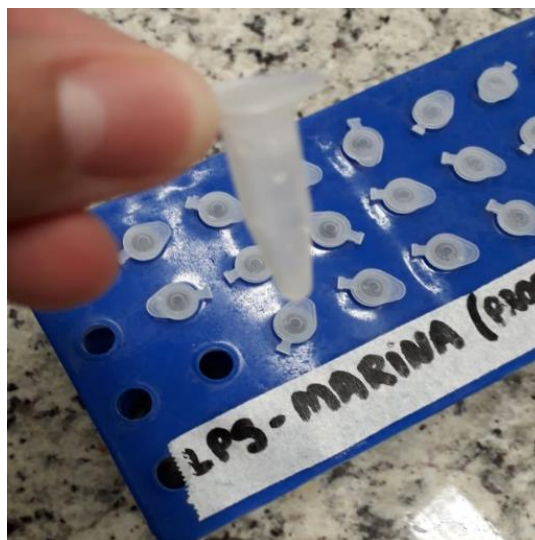


Figura 2 - Alíquotas de LPS dissolvidas em PBS filtrado.

Após 24 horas de expansão do meio condicionado, em um becker, foi misturado 19,95 ml de meio e acrescido o conteúdo de 1 tubo de alíquota de LPS, ou seja, 50 μ L, de forma a totalizar 20 ml. Com isso, foi retirado o meio que estava nas garrafas e acrescentado o conteúdo do becker. As garrafas foram levadas à incubadora. Passadas 48 horas do plaqueamento, o meio com LPS foi descartado e trocado por meio suplementado, para que enfim, após 72 horas do plaqueamento o meio fosse coletado. De cada garrafa, removeu-se 20 ml de meio condicionado de macrófagos, os quais foram armazenados em tubos de 50 ml e congelados em freezer a -20°C , para serem utilizados posteriormente no decorrer do projeto. Essa troca de meio foi realizada até a obtenção da quantidade necessária de meio, de acordo com o planejamento estabelecido.



Figura 3 - Coleta total do meio condicionado.

2.4.Preparação do meio base adequado para MC3T3 - E1

Para realizar a cultura da linhagem celular de osteoblastos, inicialmente foi preparado 400 ml do meio α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle) e calibrado seu pH entre 6,7 e 6,8 de forma que alcançasse pH 7,0 durante sua filtração, no fluxo. Posteriormente, o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina. Para isso, adicionou-se 360 ml de α -MEM filtrado em uma garrafa de 500 ml e verteu-se sobre ele 40 ml de soro fetal bovino e duas alíquotas de 1 ml cada de penicilina/estreptomicina que foram previamente descongeladas.

2.5.Expansão das células

A garrafa com meio suplementado de α -MEM foi aquecida em banho-maria a 37°C durante 20 minutos. Enquanto isso, a linhagem celular de osteoblastos MC3T3-E1 (subclone 14 com capacidade de mineralização) foi descongelada de vials armazenados em tanques de nitrogênio. Adicionou-se 4 ml de meio aquecido e o conteúdo do vial em um tubo falcon de 15 ml. Levou-se o conjunto para a centrifugação por 5 minutos a 2.000 rpm, de maneira que um pellet foi formado ao fundo. O sobrenadante foi vertido de uma vez em um descarte, com a precaução de manter o pellet no fundo do tubo. Foi realizada a suspensão e homogeneização do pellet com 2 ml de meio novo. Após isso, 19 ml de meio foi adicionado em uma garrafa de cultura de 75 cm³ e 19ml adicionados a uma segunda garrafa de cultura. Adicionou-se 1 ml do meio com as células em cada garrafa, completando, assim, os 20 ml. Após a finalização, observou-se no microscópio e as garrafas foram levadas para estufa a 37°C e 5% de CO₂.

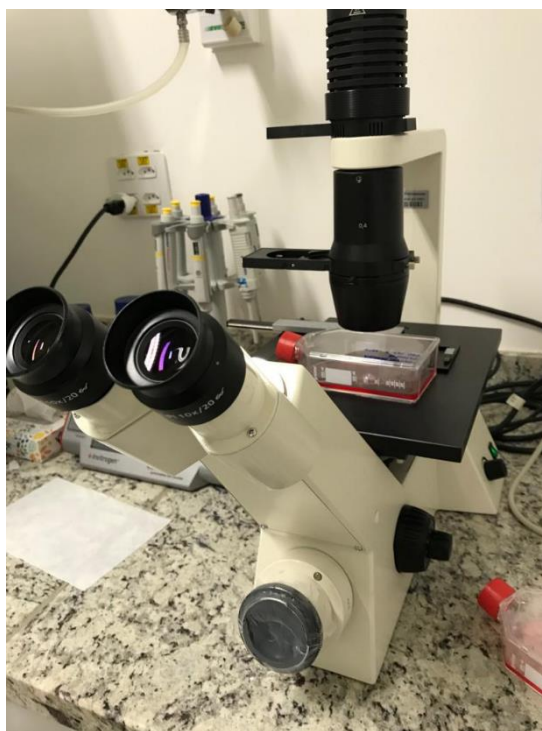


Figura 4 - Garrafa de cultura sendo observada em microscópio.

2.6. Plaqueamento

Após a confluência, para o plaqueamento, o meio das garrafas foi vertido em béquer com água sanitária, logo em seguida as culturas foram lavadas, utilizando pipetador automático, 3 vezes com 20 ml de PBS filtrado e aquecido em banho-maria a 37°C por 20 minutos, para retirar o PBS das garrafas, o líquido também foi vertido em béquer. Após as 3 lavagens, foi vertida uma alíquota de tripsina adicionada de EDTA e collagenase em cada garrafa, logo em seguida, as garrafas foram levadas por 15 minutos à incubadora; de forma que acabado esse tempo já se podia observar em microscópio o desprendimento das células do fundo da garrafa. Utilizando o pipetador automático, foi retirado todo o conteúdo da garrafa, o qual foi transferido para tubos de centrífuga já previamente preparados com 5 ml de MTS. Dessa forma, foi centrifugado a 2.000 rpm por durante 5 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi retirado, preservando o pellet formado ao fundo. Com isso, utilizando 10 ml de MTS a 10% as células foram ressuspensas e homogeneizadas.

A contagem de células foi realizada em contador automático, de forma que em um Eppendorf foi colocado 100 µL de corante azul de Tripán acrescidos de 100 µL da amostra da cultura, homogeneizando. Logo, foi colocado no interior de cada poço, que seria utilizado das placas, lamínulas estéreis. De forma geral, as células foram cultivadas em meio osteogênico, com adição de 5 µg/ml de ácido ascórbico e 7 mM de β-glicerofosfato em placas de 24 poços em uma concentração de 2×10^4 ($n = 5$) e divididas em células controle (C) e células tratadas com 50% de meio condicionado de macrófagos (MC). Então, as placas foram levadas à incubadora.

2.7. Ensaio de adesão celular

Após 24 horas que as células foram cultivadas sobre as lamínulas, as mesmas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a

0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas para imunofluorescência indireta. 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 por 5 minutos). Para a visualização dos núcleos de células aderidas às lamínulas, foi utilizado DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300) por 5 minutos, seguido de lavagem com água deionizada para evitar fundo e montagem com meio anti-fade (Prolong, Molecular Probes). As imagens foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha), com a confecção de imagens de toda a superfície das lamínulas para contagem de células aderidas e construção de gráfico e análise estatística.

2.8. Ensaio de proliferação celular por marcação com Ki67

As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro, em placas para cultivo celular, por períodos de 24 e 48 horas, para isso, as mesmas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas para imunofluorescência indireta. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, em seguida realizado o bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por um período de 30 minutos. O anticorpo primário para a proteína a ser avaliada (Ki67, Diagnostic Biosystems, EUA) foi diluído em concentração de trabalho (1:200) e incubado por 1 hora, com posterior incubação do anticorpo secundário conjugado, com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por um total de 50 minutos; para ser possível a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas às lamínulas, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). A substituição dos anticorpos primários por PB foi usada como controle negativo. Logo após a montagem de lamínula de vidro

sobre as células, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).

2.9. Ensaio de expressão de proteínas

A imunolocalização das proteínas ALP, BSP e OPN, foi realizada ao final de 3 dias. As células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro e após o período proposto, as mesmas foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (De Oliveira e Nanci, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Os anticorpos primários para as proteínas ALP, BSP e OPN (Hybridoma Bank, EUA) foram diluídos em concentração de trabalho (1:200) e incubados por 1 hora, seguido de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas às lamínulas foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). A substituição dos anticorpos primários por PB foi usada como controle negativo. Após montagem de lamínula de vidro sobre as células, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha).

2.10. Forma de análise dos resultados

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, quando apropriado. Caso contrário, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Mann-Whitney, quando necessário. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada por meio do software GraphPad Prism®.

3. Resultados

3.1. Ensaio de adesão celular

A adesão de células osteoblásticas após 24 horas foi maior na cultura com meio condicionado de macrófagos, apesar de não mostrar diferença estatisticamente significativa na adesão celular entre os grupos controle (C) e meio condicionado (MC), com $p = 0,622$.

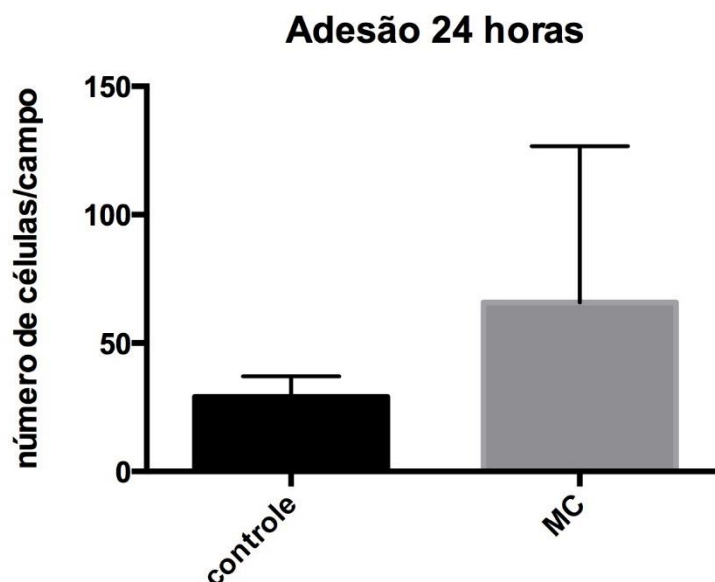


Figura 5 - Adesão celular no período de 24 horas, a partir de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Teste estatístico de Mann-Whitney para $p \leq 0.05$.

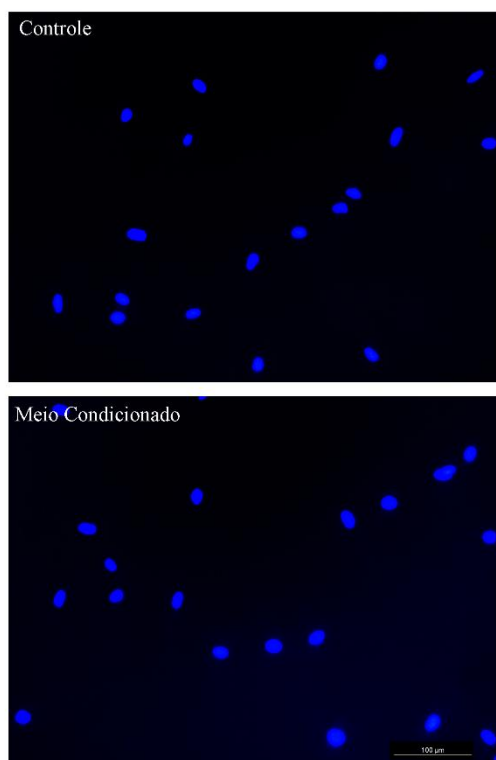


Figura 6 - Adesão celular no período de 24 horas, a partir de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Imagens de fluorescência mostrando o núcleo celular corado com DAPI. Aumento de 20x. Barra=100 μ m.

3.2. Ensaio de proliferação celular por marcação Ki67

A análise qualitativa com marcador Ki67 revelou maior taxa de proliferação celular no grupo MC, em comparação com o grupo controle após 24 horas de cultura. Foi observada uma diminuição na adesão e proliferação celular aos 3 dias de cultura, mas ainda uma maior proliferação celular na presença do meio condicionado, como podemos ver na Figura 7.

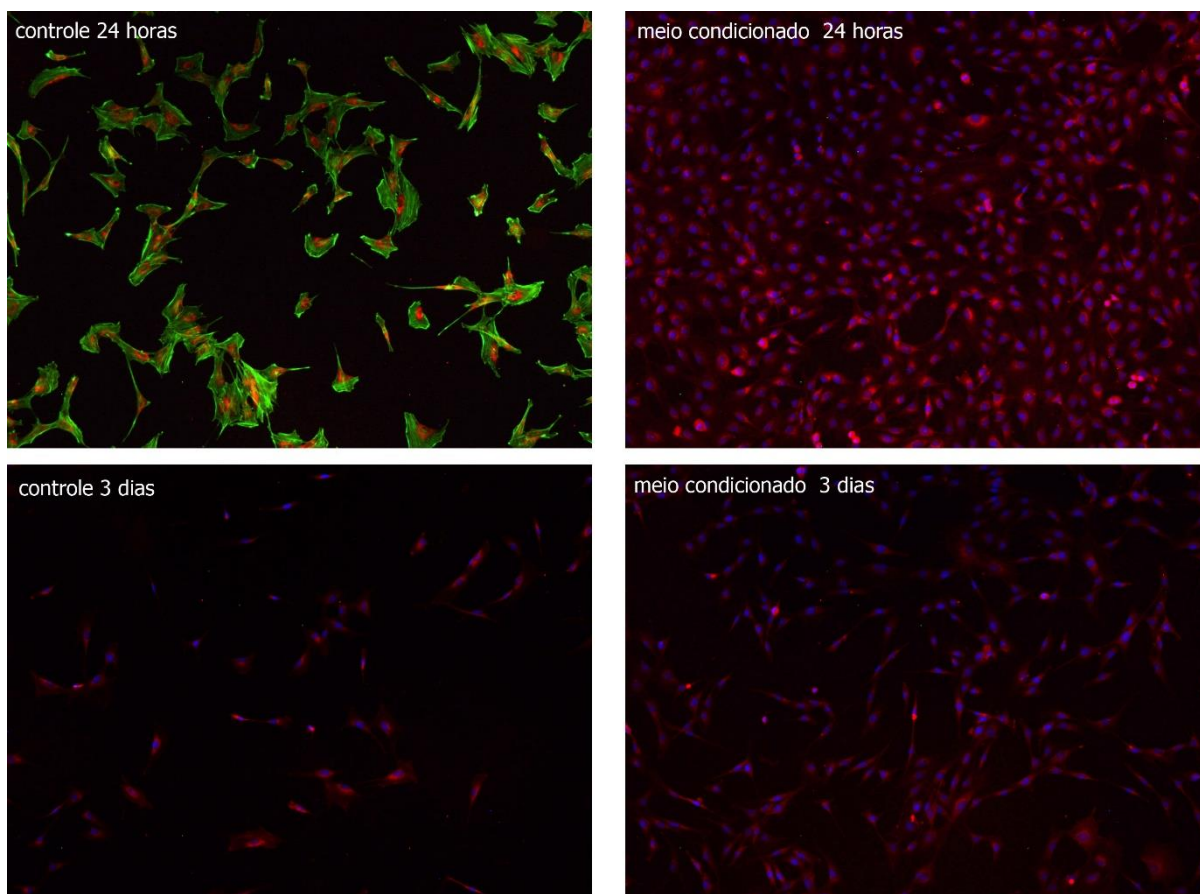


Figura 7: Marcação com Ki67 nos períodos de 24 horas e 3 dias, a partir de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Imagens de fluorescência mostrando o núcleo celular corado com DAPI (azul), citoesqueleto (verde), Ki67 (vermelho). Aumento de 10x. Barra=200 μ m.

3.3. Ensaio de expressão de proteínas

A imunolocalização não mostrou diferença na expressão das proteínas BSP e ALP, marcadas em vermelho nas Figuras 8 e 9. Já a expressão da proteína OPN foi mais intensa no grupo de células osteoblásticas na presença de MC, como pode ser observado na Figura 10.

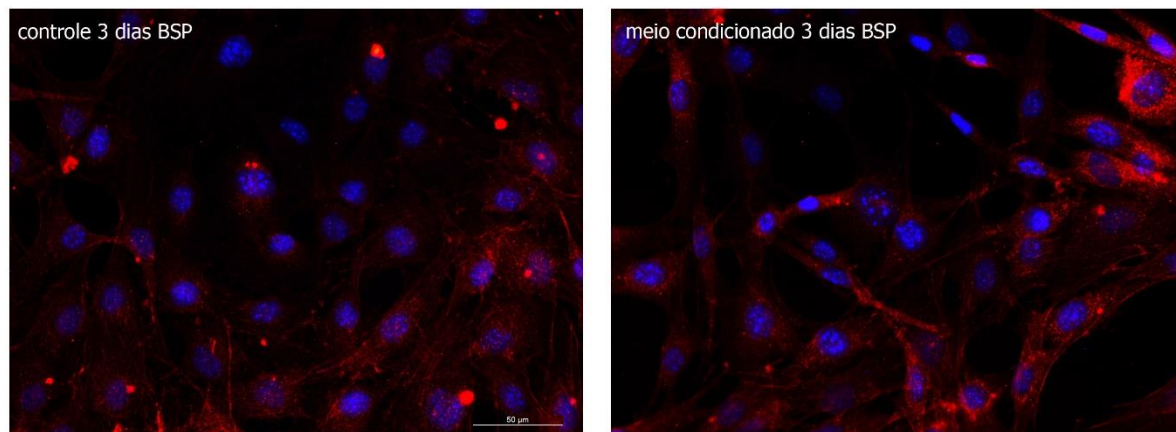


Figura 8 -Imunolocalização da proteína sialoproteína óssea (BSP) após 3 dias de cultura em células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Imagens de fluorescência mostrando o núcleo celular corado com DAPI (azul), e a proteína BSP (vermelho). Aumento de 40x. Barra=50 µm.

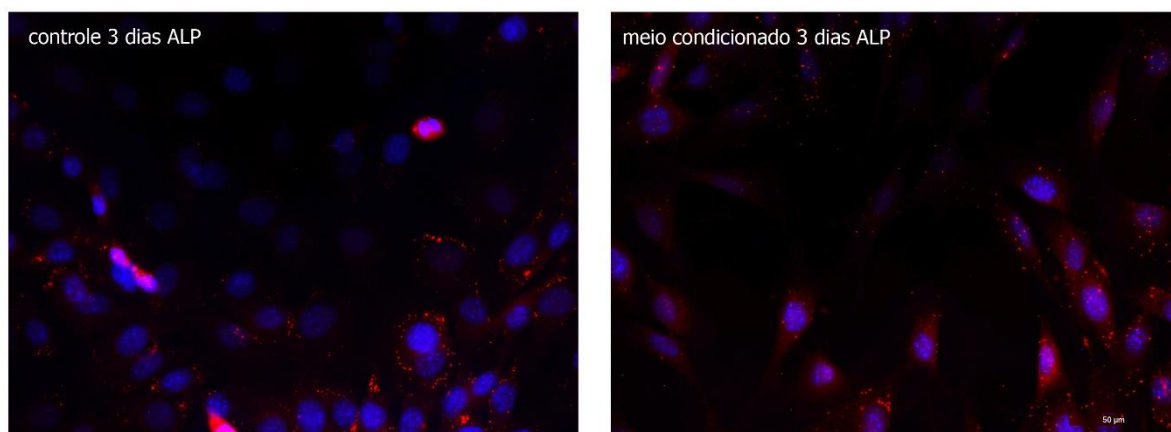


Figura 9 - Imunolocalização da proteína fosfatase alcalina (ALP) após 3 dias de cultura em células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Imagens de fluorescência mostrando o núcleo celular corado com DAPI (azul), e a proteína ALP (vermelho). Aumento de 40x. Barra=50 µm.

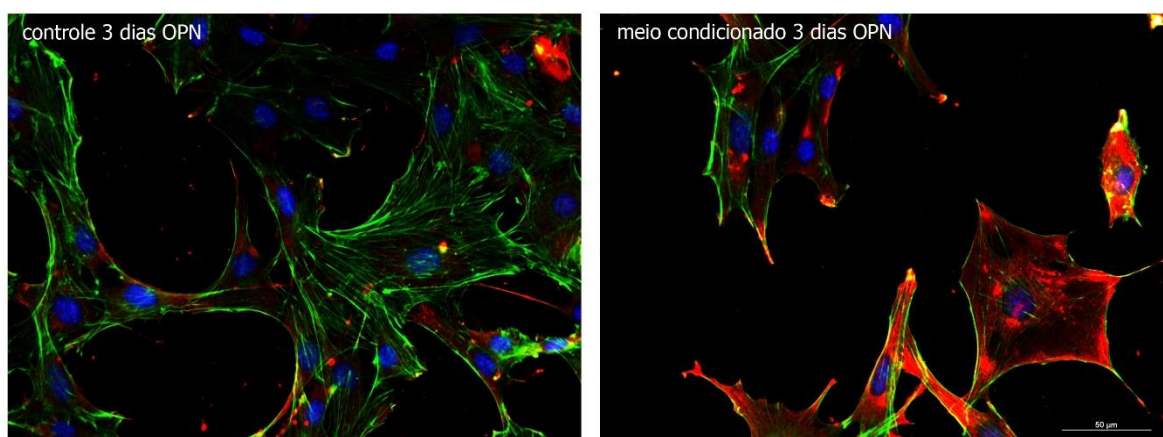


Figura 10 - Imunolocalização da proteína osteopontina (OPN) após 3 dias de cultura em células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas com meio condicionado de macrófagos da linhagem RAW 264.7, divididas em grupos Controle e Meio Condicionado. Imagens de fluorescência mostrando o núcleo celular corado com DAPI (azul), e a proteína OPN (vermelho). Aumento de 40x. Barra=50 µm.

4. Discussão

O tecido ósseo é o resultado de um equilíbrio dinâmico e também de uma cooperação de diversos sistemas, explorando o princípio de interação de células imunes e osteoblastos, com o objetivo de eliminar fatores adversos para melhorar o desempenho osteogênico dos osteoblastos. Segundo Horwood et al. (2015), há uma considerável contribuição da inflamação para a perda óssea, com ênfase em específico na atuação das citocinas inflamatórias. Os macrófagos são os principais produtores de citocinas na inflamação, e os fatores que eles produzem dependem de seu estado de ativação ou polarização. Já se tornou aparente que os macrófagos também são capazes de interagir com os osteoblastos e seus precursores mesenquimais, fornecendo meios que podem sensibilizar o osteoblasto.

De acordo com Lu et al. (2017), como resultado de estímulos promovidos pelo processo inflamatório, diferentes fenótipos de macrófagos podem ocorrer: não comprometido (M0), pró-inflamatório (M1) e anti-inflamatório (M2). Os macrófagos polarizados têm

demonstrado direcionar a diferenciação osteoblástica e induzir a mineralização (Italiani et al., 2014). A polarização em M1 de linhagens celulares pode ser alcançada pelo estímulo com lipopolissacarídeos de *E.coli*, como demonstrado por Chanput et al. (2013) em macrófagos THP-1, que utilizaram 700 ng ml^{-1} para induzir a polarização em poços de cultura. O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, que constitui uma estrutura chave para a manutenção de um ambiente pró-inflamatório, induzindo expressão de citocinas, como citado por Molteni (2018). Nós utilizamos a metodologia do laboratório, colocando $2,5 \text{ } \mu\text{l/ml}$ de LPS em meio de cultura nas garrafas (com 20 ml no total) semeadas com macrófagos da linhagem RAW 264.7, assegurando viabilidade celular e possibilidade de coleta do meio condicionado após a polarização em M1.

Estudos *in vitro* frequentemente utilizam o modelo de co-cultura para investigar a associação dos macrófagos com células ósseas, principalmente porque macrófagos M1 e osteoblastos estão em contato físico próximo no osso trabecular, e o equilíbrio entre os sistemas imune e esquelético pode ser afetado pelo estado inflamatório de uma determinada região (Huang et al., 2017). Estes mesmos autores demonstraram que a co-cultura de macrófagos polarizados em M1 com LPS e Rankl elevaram a habilidade osteogênica de células mesenquimais da medula óssea, sugerindo que esta fase transitória em M1 na fase inicial da osteogênese pode ser crucial para a formação óssea. Loi et al. (2016) também observaram que a co-cultura com macrófagos M1 e M2 aumentou a capacidade osteogênica de células MC3T3-E1 indicado por aumento da atividade de fosfatase alcalina e matriz mineralizada.

Vários estudos demonstram que fatores secretados pelas células permanecem no meio onde as células são cultivadas (formando o meio condicionado), com a vantagem de poderem ser congelados, transportados mais facilmente e promovendo diminuição de problemas de rejeição devido à ausência de células (Pawitan et al., 2014). Loi et al. (2016) mostraram a manutenção da polarização dos macrófagos até 1

semana após a cultura, com a secreção de marcadores fenotípicos no sobrenadante em até 3 semanas, viabilizando a coleta e armazenamento do meio como realizado neste experimento.

Não existem artigos publicados até o momento utilizando o meio condicionado de macrófagos polarizados em M1 em culturas osteoblásticas para investigar os parâmetros selecionados. Nossos resultados demonstraram uma maior adesão e proliferação (por meio de contagem por DAPI e marcação com Ki67) de células MC3T3-E1 na presença do MC quando comparado ao controle, sugerindo uma interação entre fatores presentes no meio condicionado e o favorecimento da adesão osteoblástica. Tanaka et al. (2000) sugerem uma interação positiva entre subgrupos de osteoblastos que expressam (ICAM)-1 com monócitos, o que favoreceria a diferenciação osteoclástica e a remodelação óssea.

É de conhecimento que a proteína fosforilada osteopontina é uma citocina inflamatória conhecida por estar envolvida em processos inflamatórios crônicos, que tem sido relacionada à atração e ativação de macrófagos (Almeida, 2005; Schuch et al., 2016). Os experimentos de imunolocalização de proteínas relacionadas à osteogênese realizadas nesse projeto demonstraram uma maior expressão de osteopontina nas células MC3T3-E1 na presença de MC. A osteopontina é uma proteína extracelular membro da família SIBLING, originalmente identificada como uma proteína da matriz óssea produzida por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, mas posteriormente detectada em quase todos os tecidos humanos e expressa por várias outras células como macrófagos, fibroblastos, condrócitos, células endoteliais e dendríticas (Luukkonen et al., 2019). Um estudo realizado por Rodriguez et al. (2014) mostrou que a mineralização intrafibrilar do colágeno pode ser induzida pela proteína não-colágena mais abundante no osso, que é a osteopontina. Além disso, sugerem que a mesma esteja associada na ativação também dos osteoclastos. As proteínas sialoproteína óssea e a fosfatase alcalina não mostraram diferenças marcantes na expressão entre os dois grupos

investigados, e a razão pode estar no período de fixação das células em cultura (3 dias).

Podemos discutir algumas limitações do estudo, principalmente a quantidade de amostras obtidas para a quantificação da adesão celular, sendo que um maior número de poços poderia trazer mais dados numéricos de contagem para obtenção de significância estatística. Outra limitação foi a realização de somente um período experimental inicial para a imunolocalização das proteínas, impossibilitando a comparação de expressão destas proteínas entre os grupos selecionados em períodos mais tardios. Assim, mais experimentos devem ser realizados no futuro para a avaliação destes parâmetros.

5. Conclusão

Os resultados sugerem que a presença do meio condicionado de macrófagos polarizados em M1 possa estimular a adesão e a expressão de OPN em células osteoblásticas. Estes resultados podem auxiliar no entendimento da interação entre osteoblastos e macrófagos em situações de reparo e remodelação óssea.

6. Referências

- [1] Chang M K, Raggatt L J, Alexander K A, Kuliwaba J S, Fazzalari N L, Schroder K, Maylin E R, Ripoll V M, Hume D A and Pettit A R 2008 Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2008 Jul 15;181(2):1232-44.
- [2] Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HF, Wichers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* 2013;4(2):266-276.
- [3] Cho IJ, Choi KH, Oh CH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. Effects of C-reactive protein on bone cells. *Life Sci.* 2016 Jan 15;145:1-8. doi:10.1016/j.lfs.2015.12.021. Epub 2015 Dec 10.
- [4] de Oliveira PT1, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004 Feb;25(3):403-13.
- [5] Edelmayer M, Al-Habbal D, Pensch M, Janjić K, Agis H. Effect of prolyl hydroxylase inhibitor-loaded collagen barrier membranes on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis. *J Biomater Appl.* 2017 May;31(10):1370-1379. doi:10.1177/0885328217702563. Epub 2017 Apr 4.
- [6] Franz S, Rammelt S, Scharnweber D and Simon J C 2011 Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials *Biomaterials* 32 6692–709.
- [7] Huang R, Wang X, Zhou Y, Xiao Y. RANKL-induced M1 macrophages are involved in bone formation. *Bone Res.* 2017;5:17019. Published 2017 Oct 17.
- [8] Italiani P, Boraschi D. 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
- [9] Jiang C, Li Z, Quan H, Xiao L, Zhao J, Jiang C et al. Osteoimmunology in orthodontic tooth movement. *Oral Dis.* 2015 Sep;21(6):694-704. doi:10.1111/odi.12273. Epub 2014 Aug 14.
- [10] Li S, Li T, Chen Y, Nie Y, Li C, Liu L, Li Q, Qiu L. Granulocyte Colony Stimulating Factor Induces Osteoblast Inhibition by B Lymphocytes

and Osteoclast Activation by T Lymphocytes during Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug;21(8):1384-91. doi:10.1016/j.bbmt.2015.05.005. Epub 2015 May 16.

[11] Li X, Qianli H, Tarek A, Yong L, Hong W, Qingling F, Ling L, Yu F, Weihong Z and Tianrui H. Effects of titanium surface roughness on the mediation of osteogenesis via modulating the immune response of macrophages Published 15 May 2018 • © 2018 IOP Publishing Ltd.

[12] Loi F, Córdova LA, Zhang R, et al. The effects of immunomodulation by macrophage subsets on osteogenesis in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:15. Published 2016 Jan 22.

[13] Lu LY, Loi F, Nathan K, et al. Pro-inflammatory M1 macrophages promote Osteogenesis by mesenchymal stem cells via the COX-2-prostaglandin E2 pathway. *J Orthop Res*. 2017;35(11):2378-2385.

[14] Luukkonen J, Hilli M, Nakamura M, et al. Osteoclasts secrete osteopontin into resorption lacunae during bone resorption. *Histochem Cell Biol*. 2019;151(6):475-487. doi:10.1007/s00418-019-01770-y

[15] Pawitan J. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Research Int*. Volume 2014 |Article ID 965849 | 14 pages | <https://doi.org/10.1155/2014/965849>

[16] Pettit A R, Chang M K, Hume D A and Raggatt L J 2008 Osteal macrophages: a new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. 2008 Dec;43(6):976-82. doi:10.1016/j.bone.2008.08.128. Epub 2008 Sep 16.

[17] Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016;62(2):128-37. doi: 10.1159/000431091. Epub 2015 Jun 17.

[18] Radi IA, Ibrahim W, Iskandar SMS, AbdelNabi N. Prognosis of dental implants in patients with low bone density: A systematic review and meta-analysis. *J Prosthet Dent*. 2018 Jul 10. pii: S0022-3913(18)30094-5. doi: 10.1016/j.prosdent.2018.01.019. [Epub ahead of print].

[19] Radominski SC et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol* 2017 57 (s2)452-466.

[20] Rodriguez DE, Thula-Mata T, Toro EJ, et al. Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts. *Acta Biomater*. 2014;10(1):494-507. doi:10.1016/j.actbio.2013.10.010

[21] Sridharan R, Cameron A R, Kelly D J, Kearney C J and O'Brien F J 2015 Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles *Mater. Today* 18 313–25

[22] Tanaka Y, Maruo A, Fujii K, et al. Intercellular adhesion molecule 1 discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycle regulators. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):1912-1923.

[23] Tu MG, Chen YW, Shie MY. Macrophage-mediated osteogenesis activation in coculture with osteoblast on calcium silicate cement. *Mater Sci Mater Med.* 2015 Dec;26(12):276. doi: 10.1007/s10856-015-5607-z. Epub 2015 Nov 5.

[24] Zhang S, Feng P, Mo G, Li D, Li Y, Mo L, Yang Z, Liang. Icariin influences adipogenic differentiation of stem cells affected by osteoblast-osteoclast coculture and clinical research adipogenic. *Biomed Pharmacother* 2017 Apr;88:436-442. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.050. Epub 2017 Jan 22.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

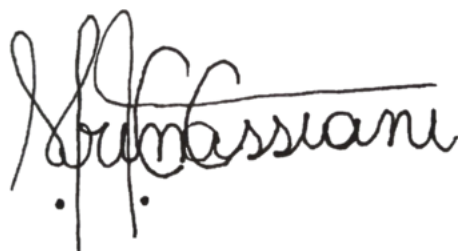
Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Marina Correia Cassiani	
Nº USP: 10294495	Período: 9º período
Telefone de contato: (16) 99262-3133	E-mail USP: marinacorreiacassiani@usp.br
<u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Karina Fittipaldi Bombonato Prado	
Departamento: DBBO	
Área de conhecimento: Biologia Celular	
Subárea: Cultura de Células	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Karina Fittipaldi Bombonato Prado, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Marina Correia Cassiani



Karina Fittipaldi Bombonato Prado

