



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
(FORP – USP)

BEATRIZ DE CAMARGO POKER

**Efeito do titânio com nanotopografia sobre a proliferação e diferenciação
osteoclástica de células da linhagem macrofágica RAW 264.7**

RIBEIRÃO PRETO

2022

BEATRIZ DE CAMARGO POKER

Efeito do titânio com nanotopografia sobre a proliferação e diferenciação osteoclastica de células da linhagem macrofágica RAW 264.7

Versão Original

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia Básica e Oral, como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2022

BEATRIZ DE CAMARGO POKER

Efeito do titânio com nanotopografia sobre a proliferação e diferenciação osteoclástica de células da linhagem macrofágica RAW 264.7

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia Básica e Oral, como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na área de Concentração de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Ribeirão Preto, _____ de ____ de ____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Leandra e Marcelo, maiores responsáveis pelas conquistas já alcançadas e pelo apoio tão necessário nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por me possibilitar a realização desse curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pela oportunidade de adquirir inúmeros conhecimentos acerca da área estudada, por oferecer seu precioso tempo na orientação e elaboração dessa pesquisa e também por colaborar no meu processo de formação profissional.

À aluna de pós-graduação Rayana Longo Bighetti Trevisan por me ensinar muito sobre a pesquisa, me auxiliar em cada passo laboratorial, de construção dos relatórios e deste trabalho.

Ao técnico e supervisor de laboratório Roger, pela paciência e sua notável arte de ensino, capaz de transmitir aos alunos seus conhecimentos, aumentando o interesse na cultura de células e pesquisa laboratorial.

Aos pós-graduandos do laboratório de cultura celular, pela dedicação em auxiliar os alunos de graduação em suas pesquisas e pelos ensinamentos passados.

Aos meus pais Marcelo Poker e Leandra Ferreira de Camargo Poker, por me incentivarem a estudar e me dedicar à construção de um futuro rico em conhecimentos e aprendizados e por me dedicarem seu amor e carinho, essenciais para a conclusão desse curso.

Aos meus avós maternos Ana Maria de Camargo e José Ferreira de Camargo e aos paternos, Angelina Darold Poker e Johannes Theodorus Poker, por me apoiarem e incentivarem desde o início, permitindo que eu realizasse esse curso sempre com amor e carinho incondicionais.

À minha família, que apoiou minha construção profissional e conclusão dessa graduação.

Aos meus colegas de curso e em especial, aos meus amigos Thais, Eleonora, Mariana e Lucas, responsáveis por tornar minha experiência na Odontologia inesquecível, oferecendo apoio e alegrando a rotina diária.

Aos professores da faculdade, capazes de formar com excelência futuros profissionais e de transmitir conhecimentos de maneira admirável.

Aos funcionários da faculdade, essenciais para a realização desse curso e para as inúmeras conquistas obtidas ao longo da graduação.

A todos que participaram desses anos e foram importantes para cada conquista, meus sinceros e felizes agradecimentos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2017/21473-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

POKER, B. C. **Efeito do titânio com nanotopografia sobre a proliferação e diferenciação osteoclástica de células da linhagem macrofágica RAW 264.7.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2021.

Os osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção óssea, sendo fundamentais para os processos de remodelação do tecido ósseo e osseointegração de implantes de titânio (Ti). A superfície de Ti com nanotopografia (Ti-Nano), obtida por oxidação química controlada com H_2SO_4 e H_2O_2 é capaz de induzir a diferenciação osteoblástica; entretanto, não há informações na literatura acerca do efeito dessa superfície em células osteoclásticas. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da superfície de Ti-Nano comparada à superfície de Ti usinada (Ti-Controle) na proliferação celular e diferenciação osteoclástica. Para isso, células da linhagem RAW 264.7 foram cultivadas em condição não-indutora de diferenciação para a avaliação da proliferação celular e em condição osteoclastogênica para a avaliação da diferenciação, sobre discos de Ti-Nano e Ti-Controle, por períodos de até 10 dias. Ao final de 3, 7 e 10 dias foram realizadas as avaliações da proliferação celular, por meio do ensaio colorimétrico MTT, e da diferenciação osteoclástica, por meio da marcação para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Ainda aos 7 dias, foi analisada a expressão do gene *Rank*, por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que não houve diferença significante na proliferação das células crescidas sobre o Ti-Nano ou Ti-Controle, nos três períodos avaliados individualmente; entretanto, na avaliação entre períodos, observou-se um aumento na proliferação aos 7 dias de cultura. Com relação à diferenciação celular, uma diminuição da marcação para TRAP foi evidenciada nas células crescidas sobre Ti-Nano comparadas às crescidas sobre Ti-Controle, aos 7 e 10 dias, assim como menor expressão do gene *Rank*, aos 7 dias. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a superfície de Ti com nanotopografia inibe a diferenciação osteoclástica de células da linhagem RAW 264.7. Este estudo fornece novas evidências acerca do papel da nanotopografia em células ósseas.

Palavras-chave: Nanotopografia. Osso. Osteoclasto. Titânio. Cultura de células.

ABSTRACT

POKER, B. C. **Effect of titanium with nanotopography on the proliferation and osteoclastic differentiation of cells of the macrophage lineage RAW264.7.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2021.

Osteoclasts are cells responsible for bone resorption, being essential for bone remodeling and osseointegration of titanium (Ti) implants. The Ti surface with nanotopography (Ti-Nano), obtained by controlled chemical oxidation with H₂SO₄ and H₂O₂, is able to induce osteoblast differentiation; however, there is no information in the literature regarding the effect of this surface on osteoclasts. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of Ti-Nano compared to machined Ti (Ti-Control) on cell proliferation and osteoclast differentiation. RAW 264.7 cells were cultured in a non-differentiation-inducing condition for the analysis of cell proliferation and in an osteoclastogenic condition for differentiation analysis, on Ti-Nano and Ti-Control, for up to 10 days. At the end of 3, 7 and 10 days, cell proliferation evaluation were performed through MTT colorimetric assay, and osteoclast differentiation were evaluated by tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining. The gene expression of *Rank*, by real-time PCR was also evaluated at 7 days. The results showed no significant difference in proliferation of cells grown on Ti-Nano or Ti-Control in the three evaluated periods; nevertheless, by comparing the periods, an increase in proliferation was noticed at day 7 of culture. Regarding cell differentiation, a decrease in TRAP staining was observed in cells grown on Ti-Nano compared to those grown on Ti-Control, at 7 and 10 days, as well as a lower gene expression of *Rank*, at day 7. In conclusion, our results showed that the Ti surface with nanotopography inhibits osteoclast differentiation of RAW 264.7 cells. This study provides new evidence about the role of nanotopography in bone cells.

Keywords: Nanotopography. Bone. Osteoclast. Titanium. Cell culture.

SUMÁRIO

1.	Introdução	9
2.	Proposição	10
3.	Material e Métodos	10
3.1.	Obtenção das Amostras de Ti	10
3.2.	Avaliação do Efeito da Superfície de Ti-Nano sobre a Proliferação de Células da Linhagem RAW 264.....	10
3.2.1.	Cultura de Células da Linhagem RAW 264.7	10
3.2.2.	Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio colorimétrico MTT	11
3.3.	Avaliação do efeito da superfície de Ti-Nano sobre a diferenciação de células da linhagem RAW 264.7	11
3.3.1.	Avaliação da formação de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)	11
3.3.2.	Avaliação da expressão gênica do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (Rank) por PCR em tempo real	12
3.4.	Análise dos resultados	13
4.	Resultados	13
4.1.	Seleção da concentração de RANKL com maior potencial osteoclastogênico	13
4.2.	Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio colorimétrico MTT	14
4.3.	Avaliação da diferenciação celular por meio da marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).....	15
4.4.	Avaliação da diferenciação celular por análise da expressão gênica do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (<i>Rank</i>) por PCR em tempo real.....	16
5.	Discussão	17
6.	Conclusão	18
7.	Referências Bibliográficas	18

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a aplicação de implantes de titânio (Ti) para reabilitações orais e médicas tem sido amplamente reportada, uma vez que esse material é inserido no corpo humano e permanece por longos períodos (Albrektsson et al., 1981; Rautray et al., 2010; Nobles et al., 2021). O titânio apresenta características que fundamentam sua integração ao tecido ósseo, como alta biocompatibilidade, resistência mecânica à corrosão e baixa toxicidade. Entretanto, nem todas as necessidades clínicas podem ser solucionadas através da aplicação de ligas tradicionais, o que torna o processo de osseointegração desafiador para a comunidade científica (Rautray et al., 2010; Raphel et al., 2016).

Diversos estudos têm demonstrado que o tratamento das superfícies de Ti leva ao desenvolvimento de diferentes topografias, favorecendo a migração e modulando mecanismos celulares responsáveis pelo aumento na diferenciação osteogênica e consequentemente na melhoria do processo de osseointegração (Martin et al., 1995; de Oliveira et al., 2007; Mendonça et al., 2010; Rosa et al., 2014; Castro-Raucci et al., 2016). Vale ressaltar que, para que esse processo ocorra de maneira satisfatória, vários eventos são necessários, como a hemostasia e formação do coágulo, do tecido de granulação, do tecido ósseo e remodelação, sendo o último caracterizado por ciclos de reabsorção e deposição ósseas, realizados por osteoclastos e osteoblastos, respectivamente (Bosshardt et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa investiga a interação entre osteoblastos e uma superfície de Ti com nanotopografia (Ti-Nano) obtida através de condicionamento químico com solução de H_2SO_4/H_2O_2 , baseado em desoxidação e reoxidação controladas. Até o momento, os resultados mostram que a nanotopografia induz a diferenciação osteoblástica (de Oliveira et al., 2007; Rosa et al., 2014). Além disso, dados da literatura mostram que diferentes topografias afetam a interação entre osteoclastos e superfícies de Ti (Bang et al., 2014; Nagasawa et al., 2016). No entanto, o efeito da nanotopografia, obtida por condicionamento com solução de H_2SO_4/H_2O_2 , sobre osteoclastos ainda não foi investigado. Nesse contexto, nossa hipótese é que o potencial osteogênico do Ti com nanotopografia envolve, além da indução da diferenciação osteoblástica, a inibição da diferenciação osteoclástica. Assim, considerando o papel dos osteoclastos no processo de remodelação óssea, fundamental para o processo de osseointegração, acreditamos que os resultados do

nosso estudo poderão contribuir para futuras investigações acerca do papel da interação osteoblasto/osteoclasto no processo de osseointegração de implantes de Ti.

2. PROPOSIÇÃO

Investigar o efeito da superfície de Ti-Nano comparada à de Ti usinada na proliferação de células da linhagem RAW 264.7 e na diferenciação osteoclástica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras de Ti

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, São Paulo, São Paulo, Brasil), usinados, foram lixados com lixas de carbeto de silício de gramatura 320 e 600, lavados em ultrassom em etanol 70% (Merck Millipore, Darmstadt, Hesse, Germany) e água destilada. Posteriormente, os discos foram submetidos ao condicionamento em solução de H_2SO_4 10N (Merck) e H_2O_2 30% (Merck) por 4 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante, para obtenção da nanotopografia (Nanci et al., 1998). Em seguida, os discos foram lavados em água destilada, secos ao ar e autoclavados. Discos usinados (apenas lixados e lavados) foram utilizados como controle (Ti-Controle).

3.2. Avaliação do efeito da superfície de Ti-Nano sobre a proliferação de células da linhagem RAW 264.7

3.2.1 Cultura de células da linhagem RAW 264.7

Células da linhagem RAW 264.7, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, EUA), foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Baden-Württemberg, Germany) em meio de cultura constituído por DMEM (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco - Thermo Fisher Scientific), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Gibco - Thermo Fisher Scientific), denominado meio de expansão. Na subconfluência da cultura (4–5 dias), houve a remoção do meio de cultura e adição de solução de tripsina 0,25% (Gibco -

Thermo Fisher Scientific) e EDTA 1 mM (Gibco - Thermo Fisher Scientific) para obtenção da suspensão de células, que foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço sobre os discos de Ti-Nano e Ti-Controle, em placas de 24 poços (Greiner Bio-One). As células destinadas à análise da proliferação celular foram mantidas em meio de expansão, enquanto àquelas destinadas ao estudo da diferenciação osteoclastica foram mantidas em meio osteoclastogênico, composto por meio de expansão suplementado com 50 ng/mL de RANKL (Peprotech, Rocky Hill, Connecticut, EUA). Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas e durante todo o tempo de cultura as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.2.2 Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio colorimétrico MTT

A proliferação celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de cultura pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (Mosmann, 1983). Brevemente, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com PBS (Gibco - Thermo Fisher Scientific) aquecido a 37°C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais, solubilizados utilizando 1 mL de solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol, Merck). As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços (Greiner Bio-One). A absorbância foi avaliada por meio de espectrofotômetro Epoch 2 (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, EUA) utilizando o comprimento de onda 570 nm. Os dados, obtidos em quintuplicata (n=5), foram expressos por absorbância.

3.3. Avaliação do efeito da superfície de Ti-Nano sobre a diferenciação de células da linhagem RAW 264.7

3.3.1 Avaliação da formação de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

As células da linhagem RAW 264.7 em suspensão foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço sobre os discos de Ti-Nano (n=5) e Ti-Controle (n=5), em placas

de 24 poços e mantidas em meio osteoclastogênico, conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. Ao final de 3, 7 e 10 dias, a formação de osteoclastos foi avaliada por meio da marcação histoquímica para TRAP, utilizando o kit de fosfatase ácida-leucócitos (procedimento 387, Sigma-Aldrich). Brevemente, após remoção do meio de cultura, as células aderidas aos discos foram lavadas uma vez com água deionizada aquecida a 37°C e fixadas com solução de fixação composta por solução de citrato, acetona e Formaldeído 37% (Merck) durante 30 segundos, à temperatura ambiente. Em seguida, os discos foram novamente lavados com água deionizada aquecida a 37°C e acrescentados 1 mL da solução de coloração preparada pela adição de água deionizada, solução de acetato, solução de naftol, solução de tartarato e solução de granada permanente GBC, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, durante 1 hora. Em seguida, os discos foram lavados 1 vez com água deionizada e deixados à temperatura ambiente para secagem. Imagens das superfícies foram adquiridas com o auxílio de um estéreo-microscópio acoplado a uma câmera digital de alta resolução Leica DC 300F (Leica Biosystem, Wetzlar, Hesse, Alemanha) e a coloração TRAP foi quantificada ($n = 5$) através do software LASV 4.0 (Leica Biosystem). Os dados foram apresentados como porcentagem da área corada.

3.3.2 Avaliação da expressão gênica do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (Rank) por PCR em tempo real

As células da linhagem RAW 264.7 em suspensão foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço sobre os discos de Ti-Nano ($n=5$) e Ti-Controle ($n=5$), em placas de 24 poços e mantidas em meio osteoclastogênico, conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. Ao final de 7 dias, foi avaliada a expressão gênica de RANK. Para esta análise, os discos de titânio foram transferidos para novas placas de 24 poços (Greiner Bio-One) e foi adicionado 1 mL do reagente TRizol (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), à temperatura ambiente, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com especificações do fabricante. O RNA total foi quantificado e houve a confecção da fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total, por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit *High-capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Este procedimento foi realizado no termociclador *Mastercycle Gradient*

(Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Para a reação de PCR em tempo real, foi utilizado sistema SYBR e para isso foram utilizados primers previamente desenhados e sintetizados para o gene alvo e de referência (Life Technologies - Thermo Fisher Scientific). As reações foram realizadas no aparelho StepOne Plus (Life Technologies), em triplicata ($n=3$), utilizando 7 μL de Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 0,5 μL de primer Foward, 0,5 μL de primer Reverse e 5 μL de cDNA (12,5 ng), para um volume final de 13 $\mu\text{L}/\text{reação}$. As reações de amplificação consistiram em 20 segundos a 95ºC e quarenta ciclos de 3 segundos a 95ºC (desnaturação) e 30 segundos a 60ºC (anelamento e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold, ou ciclo limiar), que permitiu a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene beta (β) actina (ACTB), utilizada para a normalização dos níveis de expressão do gene avaliado. O método comparativo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ foi utilizado para comparar a expressão gênica dos diferentes grupos (Livak & Schmittgen, 2001).

3.4. Análise dos resultados

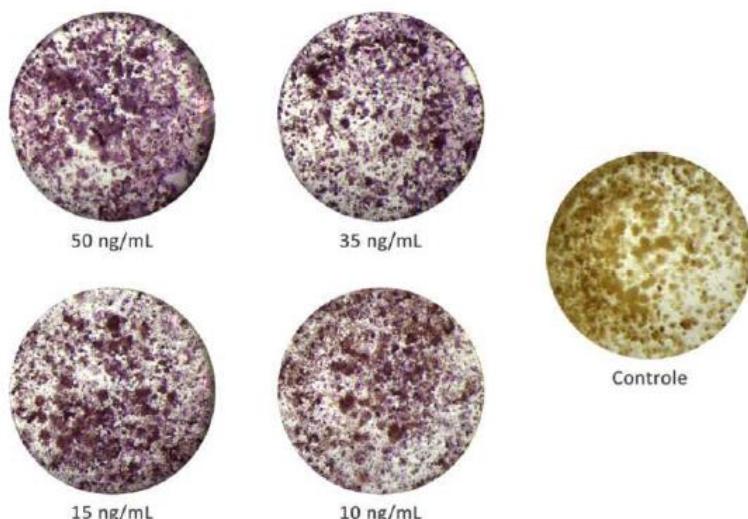
Os dados de proliferação celular e marcação histoquímica para TRAP foram submetidos ao teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, para dados independentes e mais de duas amostras e os dados do PCR em tempo real foram submetidos ao teste Mann-Whitney, seguidos de pós-teste, quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção da concentração de RANKL com maior potencial osteoclastogênico

Para a determinação da concentração ideal de RANKL utilizada nesse trabalho, foi realizado um estudo piloto utilizando cultura de células da linhagem RAW 264.7 sobre poliestireno, em placas de 96 poços, com as seguintes concentrações de RANKL: 50 ng/mL, 35 ng/mL, 15 ng/mL, 10 ng/mL e cultura na ausência de RANKL, caracterizando o grupo controle. A formação de células multinucleadas (osteoclastos) foi evidenciada por marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), aos 4 dias de cultura sob indução do RANKL, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), após plaqueamento na presença de RANKL utilizado em diferentes concentrações (50 ng/ml, 35 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml) e grupo controle (ausência de RANKL).



Fonte: Poker, Beatriz de Camargo (2018).

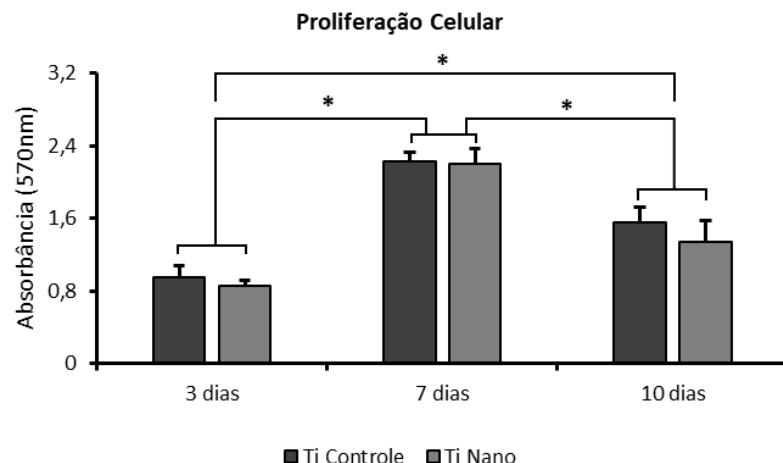
Através de análise qualitativa, os resultados evidenciaram a formação de células multinucleadas (osteoclastos) em todas as concentrações de RANKL previamente estipuladas. Entretanto, observou-se células multinucleadas mais extensas e em maior quantidade na concentração de 50 ng/mL, que foi selecionada para utilização na análise da diferenciação das células da linhagem RAW 264.7 sobre as diferentes superfícies de Ti.

4.2 Avaliação da proliferação celular por meio do ensaio colorimétrico MTT

A proliferação celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de cultura pelo ensaio colorimétrico MTT. Como descrito no início desse trabalho, optou-se pela realização da cultura das células da linhagem RAW 264.7 na ausência de RANKL para análise da proliferação celular.

Os dados de MTT foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e os resultados mostraram que não houve diferença significante na proliferação das células crescidas sobre Ti-Nano ou Ti-Controle, nos três períodos avaliados individualmente ($p > 0,05$). Entretanto, considerando a avaliação entre períodos, observamos que a quantidade de células variou com o tempo da seguinte maneira (7 dias $>$ 10 dias $>$ 3 dias, $p \leq 0,05$). Os dados relativos ao MTT são apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Proliferação de células da linhagem RAW 264.7, aos 3, 7 e 10 dias de cultura sobre Ti-Nano e Ti-Controle (média ± desvio padrão, (n=5) (* indica diferença estatisticamente significante)).



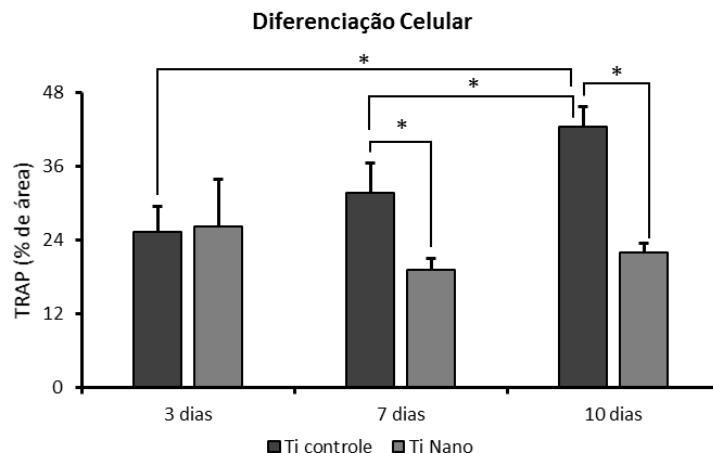
Fonte: Poker, Beatriz de Camargo (2018).

4.3 Avaliação da diferenciação celular por meio da marcação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

A análise da diferenciação das células da linhagem RAW 264.7 sobre as diferentes superfícies foi evidenciada pela marcação histoquímica para TRAP. Após obtenção das imagens, foi realizada quantificação das células positivas para a marcação, através do cálculo do percentual de área corada em relação à área total das diferentes superfícies de Ti, utilizando o software LAV.4.0.

Os dados do TRAP foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$) e os resultados mostraram que houve diminuição da marcação para TRAP nas células crescidas sobre Ti-Nano comparadas às crescidas sobre Ti-Controle, aos 7 e 10 dias ($p \leq 0,05$). Considerando a avaliação entre períodos, observamos que houve maior diferenciação celular no grupo Ti-Controle avaliado aos 10 dias quando comparado aos grupos avaliados aos 7 dias ($p \leq 0,05$) e aos 3 dias ($p \leq 0,05$), o que caracteriza uma maior diferenciação das células RAW 264.7 sobre Ti-Controle no maior período avaliado (10 dias > 7 dias > 3 dias). Os dados relativos ao TRAP são apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Diferenciação de células da linhagem RAW 264.7, aos 3, 7 e 10 dias de cultura sobre Ti-Nano e Ti-Controle (média ± desvio padrão, (n=5) (* indica diferença estatisticamente significante)).

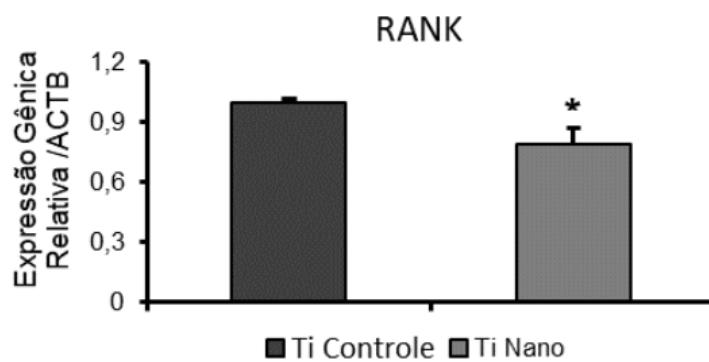


Fonte: Poker, Beatriz de Camargo (2018).

4.4 Avaliação da diferenciação celular por análise da expressão gênica do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (*Rank*) por PCR em tempo real

Aos 7 dias de cultura, foi avaliado o efeito da superfície de Ti-Nano, sobre a expressão gênica do marcador da diferenciação osteoclastica *Rank*, por PCR em tempo real, em células da linhagem RAW 264.7 cultivadas com 50 ng/ml de RANKL. Os dados da expressão gênica foram obtidos em triplicata e submetidos ao teste de Mann-Whitney ($p=0,029$). Os resultados mostraram que houve uma diminuição da expressão relativa do gene *Rank*, nas células crescidas sobre Ti-Nano comparadas às crescidas sobre Ti-Controle. Os dados relativos à expressão gênica são apresentados na figura 4.

Figura 4 - Expressão gênica relativa de *Rank*, aos 7 dias de cultura sobre Ti-Nano e Ti-Controle (média ± desvio padrão, (n=5)). * indica diferença estatisticamente significante ($p=0,029$)).



Fonte: Poker, Beatriz de Camargo (2018).

5. DISCUSSÃO

As modificações das superfícies de implantes, através de diferentes técnicas, como a aplicação de revestimentos ou variações em topografia, têm sido amplamente realizadas visando a melhoria da osseointegração (Rautray et al., 2010; Lotz et al., 2018; Bang et al., 2014; Nobles et al., 2021). Alterações na topografia de superfície do Ti, através de condicionamento químico com solução de H_2SO_4/H_2O_2 são capazes de favorecer a diferenciação osteoblástica e formação de matriz mineralizada através da modulação de diferentes proteínas e vias de sinalização (de Oliveira et al., 2007; Rosa et al., 2014; Castro-Raucci et al., 2016; Abuna et al., 2019). Entretanto, até o presente momento não existiam evidências do efeito dessa superfície sobre as células osteoclásticas, o que motivou a realização desse estudo.

Os resultados obtidos e aqui apresentados indicam que, comparado ao Ti-Controle, o Ti-Nano inibiu a diferenciação de células da linhagem RAW 264.7 (conforme marcação histoquímica TRAP), sem afetar sua capacidade proliferativa (evidenciada no ensaio de proliferação celular), corroborando em parte com os achados descritos por Lotz et al. (2018), cujo objetivo foi determinar o efeito de uma superfície de Ti microrugosa na remodelação óssea. Utilizando meios condicionados obtidos de células-tronco e osteoblastos humanos crescidos na superfície, foi realizado tratamento em células osteoclásticas humanas, e os autores observaram que a superfície causou uma modulação na produção de proteínas pelas células-tronco e osteoblastos, que foram responsáveis pela diminuição da atividade de osteoclastos existentes e pela diminuição da diferenciação de novos osteoclastos, como ocorreu em nosso estudo, com a diminuição da diferenciação osteoclástica das células RAW 264.7 em contato com o Ti-Nano.

Considerando as análises da expressão gênica do receptor *Rank* e do ensaio de TRAP, pode-se observar que houve uma diminuição significante da diferenciação osteoclástica das células RAW 264.7 crescidas sobre o Ti-Nano quando comparado ao Ti-Controle, evidenciando o potencial efeito inibidor dessa superfície sobre a osteoclastogênese. Esses achados corroboram, em parte, com aqueles encontrados por Bang et al. (2014), que analisaram o efeito de superfícies de Ti com três diferentes tratamentos na diferenciação osteoblástica e osteoclástica. Os autores adquiriram duas diferentes superfícies, SLA (tratamento com jateamento ácido) e modSLA (jateamento ácido modificado para obtenção de maior hidrofilicidade), que receberam

cultura de células de monócitos derivados de células-tronco de camundongos, para diferenciação em osteoclastos. Também houve diferenciação dessas células sobre superfícies controles (receberam apenas um suave pré-tratamento). Os resultados de TRAP mostraram que, comparados à superfície controle, houve uma diminuição da diferenciação osteoclástica nas células crescidas nas superfícies SLA e modSLA, como evidenciado em nosso estudo naquelas crescidas sobre a nanotopografia, assim como diminuição da expressão de genes imprescindíveis para a diferenciação osteoclástica, *Trap* e *Oscar*, sugerindo que as superfícies SLA e modSLA podem suprimir a diferenciação de monócitos em osteoclastos, o que foi também por nós observado em relação ao Ti Nano.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo mostraram que a superfície de Ti-Nano inibe a diferenciação osteoclástica de células da linhagem RAW 264.7. Contudo, novos estudos devem ser realizados para investigar os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação, assim como a dinâmica da remodelação óssea, quando células osteoclásticas interagem com células osteoblásticas na presença da nanotopografia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Abuna RPF, Oliveira FS, Lopes HB, Freitas GP, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. The Wnt/β-catenin signaling pathway is regulated by titanium with nanotopography to induce osteoblast differentiation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019 Dec 1;184:110513. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110513. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31561047. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31561047/>. Acesso em: 11 de dez. de 2021.

Albrektsson T, Bränemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981; 52:155-170. DOI: 10.3109/17453678108991776. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7246093/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Bang SM, Moon HJ, Kwon YD, Yoo JY, Pae A, Kwon IK. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Jul;25(7):831-7. DOI: 10.1111/cir.12146. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23560589. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23560589/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol 2000*

2017 Feb;73(1):22-40. DOI: 10.1111/prd.12179. PMID: 28000277. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28000277/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Castro-Raucci L, Francischini MS, Teixeira LN, Ferraz EP, Lopes HB, de Oliveira PT, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. *J Cell Biochem* 2016 Jul;117(7):1718-26. DOI: 10.1002/jcb.25469. Epub 2016 Jan 15. PMID: 26681207. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26681207/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

de Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A* 2007 Mar 1;80(3):554-64. DOI: 10.1002/jbm.a.30955. PMID: 17031821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17031821/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Lotz EM, Berger MB, Schwartz Z, Boyan BD. Regulation of osteoclasts by osteoblast lineage cells depends on titanium implant surface properties. *Acta Biomaterialia* 2018 Mar 1;68:296-307. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.12.039. Epub 2017 Dec 30. PMID: 29292169; PMCID: PMC5803380. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29292169/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *J Biomed Mater Res* 1995 Mar;29(3):389-401. DOI: 10.1002/jbm.820290314. PMID: 7542245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7542245/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. The combination of micron and nanotopography by H₂SO₄/H₂O₂ treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res A* 2010 Jul;94(1):169-79. DOI: 10.1002/jbm.a.32701. PMID: 20128007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20128007/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4. PMID: 6606682. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Nagasawa M, Cooper LF, Ogino Y, Mendonca D, Liang R, Yang S, Mendonca G, Uoshima K. Topography influences adherent cell regulation of osteoclastogenesis. *J Dent Res* 2016 Nov 9. PMID: 26553885; PMCID: PMC6728692. DOI: 10.1177/0022034515616760. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553885/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, McKee MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res.* 1998 May;40(2):324-35. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(199805)40:2<324::aid-jbm18>3.0.co;2-l. PMID: 9549628. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9549628/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Nobles KP, Janorkar AV, Williamson RS. Surface modifications to enhance osseointegration-Resulting material properties and biological responses. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021 Nov;109(11):1909-1923. DOI: 10.1002/jbm.b.34835. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33871951. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33871951/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Raphel J, Holodniy M, Goodman SB, Heilshorn SC. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants. *Biomaterials* 2016 Apr;84:301-314. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.016. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26851394; PMCID: PMC4883578. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26851394/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Rautray TR, Narayanan R, Kwon TY, Kim KH. Surface modification of titanium and titanium alloys by ion implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 May;93(2):581-91. DOI: 10.1002/jbm.b.31596. PMID: 20127988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127988/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha 1\beta 1$ integrin signaling pathway. *J Cell Biochem* 2014 Mar;115(3):540-8. DOI: 10.1002/jcb.24688. PMID: 24122940. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24122940/>. Acesso em: 10 de dez. de 2021.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).



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 Messora
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)

DADOS PESSOAIS

Nome: Beatriz de Camargo Poker

Nº USP: 10294129

Período: 9º período

Telefone de contato: (19) 98116-3006

E-mail USP: beatrizpoker@usp.br

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome do Orientador(a): Márcio Mateus Beloti

Departamento: DBBO

Área de conhecimento: Implantodontia

Subárea: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

MODALIDADE

Modalidade:

Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional

ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)

Eu, Prof(a). Dr(a). Márcio Mateus Beloti, 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.

Beatriz de Camargo Poker

Beatriz de Camargo Poker

Márcio Mateus Beloti

Márcio Mateus Beloti