



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Sociedade Brasileira de Fisiologia

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas



CARIL CONSTANCE FERREIRA DO AMARAL

**ESTUDO DO FENÓTIPO OSTEABLÁSTICO EM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS NA PRESENÇA OU NÃO DE DOENÇA PERIODONTAL**

ARAÇATUBA-SP

2013

CARIL CONSTANTE FERREIRA DO AMARAL

ESTUDO DO FENÓTIPO OSTEoblástico EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS NA PRESENÇA OU NÃO DE DOENÇA PERIODONTAL

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” – Unesp, como
parte parcial dos requisitos para a
obtenção do título de “Mestre em
Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Profa. Adj. Sandra Helena
Penha de Oliveira

ARAÇATUBA-SP

2013

DADOS CURRICULARES

CARIL CONSTANTE FERREIRA DO AMARAL

Nascimento: 28 de agosto de 1985

Localidade: Limeira – São Paulo

Filiação: Martim Constante Ferreira do Amaral e Gasparina dos Reis Ferreira do Amaral

2005 – 2010: Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –

Unesp

DEDICATÓRIAS

DEDICATÓRIAS

Ao mais virtuoso dos homens que já vi habitar este planeta, por quem a saudade me é companhia desde sua partida, meu industrioso pai **Martim Constante Ferreira do Amaral**.

À dona do coração mais doce e de incalculável amor que já vi alguém possuir, minha terna mãe **Gasparina dos Reis Ferreira do Amaral**.

À quem me foi companhia desde o berço e por quem vejo o reflexo da valiosa criação em nosso caráter, minha fiel irmã **Tanyra de Fátima Ferreira do Amaral**.

Àquela por quem ofereci um sentimento para ser partilhado nos momentos prazerosos e difíceis, e que mesmo assim aceitou-me mesmo com todos os meus inúmeros defeitos, minha paciente namorada **Natália Marcumini Pola**.

Aos meus carinhosos **familiares** que sempre estiveram ao meu lado, ainda que o hiato causado pela distância só tenha me deixado emocionalmente mais próximo.

Aos meus valiosos **amigos** e **companheiros** que me ensinam diariamente o Servir, os quais sempre nutrirei os mais sinceros desejos de felicidade e paz.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos.

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de sua Diretora Profa. Adj. **Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor Prof. Titular **Wilson Roberto Poi**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao **Conselho do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, pelo acompanhamento de minha formação, bem como o tempo de convívio e inestimável aprendizado enquanto representante discente e conselheiro do respectivo colegiado.

Aos **orientadores** do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que, mesmo com as peculiaridades do nosso programa e áreas do conhecimento onde atuam, mantêm-se focados no desenvolvimento do Programa e compromisso com a formação de pessoal capacitado para o ensino superior.

Aos servidores técnico-administrativos da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, **Valéria, Lilian e Cristiane**, pela eficiência e colaboração imprescindíveis nas ocasiões em que foram solicitadas.

À **FAPESP**, pela concessão e outorga da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2010/14590-6) e suporte ao Projeto de Pesquisa (Processo nº 2011/06070-5).

Ao Departamento de Ciências Básicas, na pessoa de seu Chefe Prof. Adj. **Cláudio Aparecido Casatti**, pelo compartilhamento e cessão das instalações e infraestrutura suficientes para a conclusão deste trabalho na forma como apresentado.

Aos **professores e mestres** que tive desde a alfabetização até os dias de hoje, que me ensinaram os moldes do intelecto e foram essenciais para despertar o interesse na construção das bases sólidas do conhecimento.

Ao Professor da Disciplina de Anatomia Dr. **Roelf Justino Cruz-Rizzolo**, pois poucos indivíduos são capazes de nos surpreender. Aqueles que nos gratificam simplesmente por partilhar seu conhecimento de uma forma ímpar e singular são ainda mais raros. Agradeço muito por ter sido seu aluno e orientado de Iniciação Científica, e neste tempo ter-me mostrado um caminho límpido por onde seguir e a importância de observar os fenômenos naturais com ceticismo e honestidade intelectual. Isto, sem dúvida, não apenas contribuiu para moldar a minha percepção da realidade, mas também como me portar diante dela. Obrigado pelos anos de aprendizado.

Aos colegas de laboratório **Leonardo, Taís, Ariane, Bruna, Aline, Thamine, Antonio, Grazieli, Luiz Cezar, Victor, Carluci, Flavia e Laís**, pela compreensão com as minhas limitações e correspondência com minhas expectativas. Graças a vocês minha trajetória pôde ser mais bem aproveitada, seja por um auxílio, por um conselho ou mesmo uma palavra reconfortante. Desculpem se em algum momento não fui aquilo que poderia ter sido, seja por minha própria vontade ou algo alheio à minha própria gnose. Sem vocês seria tudo mais difícil.

Aos **colegas de pós-graduação**, pelo empenho com que tratam seus projetos de pesquisa, mesmo abdicando de suas carreiras profissionais pela dedicação à carreira acadêmica, vocês têm meu respeito e admiração.

Aos **colegas de disciplina** da FMRP/USP, ICB/USP e IB/USP, que partilharam suas ansiedades, nervosismos, angústias, esforços e conquistas, para que juntos formássemos um grupo coeso não apenas de aprendizado, mas também consolidados com o saber.

Aos meus colegas de república por onde morei, **Nicolas, David, Renata e Daniel**, pelo convívio sempre harmonioso enquanto estivemos sob o mesmo telhado. E por todos os momentos de alegria, descontração, mesmo com as características inerentes de cada um, constituímos uma verdadeira família baseada no respeito às individualidades.

Aos **amigos do Diretório Acadêmico “Professor Carlos Aldrovandi”**, pela incansável luta por uma representação digna dos anseios de nossos alunos, pela irrepreensível conduta diante dos padrões de elevada ética, e pela palavra amiga de todas as horas.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, **Wagner Garcez de Melo, Samuel Moraes, Felipe Camargo Munhoz, Daniel Bernabé e Carla Sipert**, minha gratidão pelos francos e prazerosos momentos que tivemos de conhecer não apenas a linha de pesquisa do outro, mas colaborar com conselhos, dicas, atenção, cumplicidade e amizade despropositada em um ambiente que muitos veem como competitivo. Nós apenas vimos como excelentes oportunidades. E partilhamos o desejo de sucesso ao outro, sempre.

Ao meu amigo **Marcio Tibagy**, que compreendeu os momentos de nervosismo de sua esposa em decorrência do trabalho que dei a ela neste tempo todo e, mesmo assim, continuou perseverante e confiante no que melhor poderia ocorrer. Desculpe pelos transtornos que pude ter causado, mas muito obrigado por ter “domado a onça”.

Ao meu amigo **Michel Reis Messor**, por ter cedido suas instalações para que minha jornada na USP de Ribeirão Preto ficasse mais bem vivida, e por todas as horas de prazerosa conversa e disposição que empenhamos. E ainda, minha gratidão por ensinar a comer congelados, pelos sustos à madrugada

quando me via perambular com os livros e luzes acesas. Você foi peça essencial e inspiradora para que chegasse até aqui com uma condição muito mais harmônica para conseguir lograr êxito. Tem minha profunda gratidão.

Aos meus amigos **Paulo Eduardo, Aline Aleixo, Murilo Cagliari, Ariane Aleixo, Igor Nuevo, Rosane Horn, Bruno Battistella e Tatiane Ayres**, que sempre foram acolhedores nos meus retornos à Limeira/SP, oferecendo uma programação diversificada para que mesmo em meio às atribuições e desgastes de uma viagem, jamais houvesse motivo para deixarmos de sorrir.

Ao meu amigo **Edson Roberto Pinheiro Junior**, pelos tão longos anos de convívio sempre harmonioso. Pela boa prosa, em qualquer horário em que fosse possível ou necessária, pelos desejos mútuos de sucesso em todos os campos de atuação e ainda mais: pela acolhida como se fôssemos membros de uma mesma família. A você e a sua família, minha eterna gratidão.

Ao meu amigo **Eduardo Arthur de Moraes**, por ter sido um verdadeiro irmão que não tive, mas que escolhi manter em meu ambiente pessoal simplesmente pela pessoa maravilhosa que é. Tem o coração que não cabe no corpo (que já não é pequeno), tem as palavras amigas que oferecem amparo nos momentos em que são necessárias e, mais do que isso, tem a distinção de ser aquele que transforma o ambiente em que se convive. Amizade duradoura, maior até que o significado que Chrono deu ao tempo.

Aos **companheiros da família Rotária do Distrito 4470**, que me ensinam diariamente a plenitude do Servir. Por vocês, que sempre nos receberam como se fôssemos parte integrante de seu convívio pleno, mesmo que a distância nos coloque em pontos distintos e mesmo assim trazeis convosco a intenção do sorriso sincero e amizade acolhedora em todos os momentos que dividimos, meu muito obrigado pela motivação em seguir adiante.

Aos **companheiros do Rotary Club Araçatuba Bandeirantes**, pelo convívio sempre harmonioso que vivemos semanalmente antes, durante e após as nossas reuniões. Vocês são peças fundamentais em minha vida, e trago por vocês um carinho e admiração incalculável.

Ao meu amigo **Miguel Antonio Xavier de Lima**, por ter sido em sua companhia que iniciei os passos na trajetória científica, por ter sido em sua companhia que vivi uma amizade verdadeira na faculdade, por ter sido em sua companhia que ria mesmo sem qualquer motivo, por ter sido em sua companhia que nos esforçávamos pelo que era necessário, por ter sido em sua família que experimentei a dedicação semelhante de um lar que oferece todo o amparo necessário à concretização de um sonho. Em todos os momentos que estivemos com sua família fui tido como parte dela, e essa condição, invariavelmente, só nos deixaram ainda mais amigos. Aos seus pais, sua irmã e a você, meu muito obrigado por tudo.

Ao meu amigo **Renato Colenci**, por todos os anos de dedicação que partilhamos como amigos e companheiros. Pela forma ética e irrepreensível de sua conduta. Pelas constantes mostras de que os nossos sonhos jamais devem ser esquecidos, e cuja luta se dá diariamente para a concretização dos mesmos, minha eterna gratidão.

À minha orientadora, Profa. Adj **Sandra Helena Penha de Oliveira**, por ter me ensinado as ferramentas indispensáveis no rigor intelectual em todos estes anos de convívio. Por me conhecer melhor do que minha própria percepção da realidade. E ainda, mesmo com a seriedade em sua postura diante da responsabilidade que valoriza nos indivíduos ao seu redor, trata as diferenças com profundo respeito. Por ter me ensinado a trafegar nos empreendimentos dignos e por respeitar o bem comum ao racionalizar o uso do dinheiro público. Mais além, por ter sido a pessoa mais acolhedora no momento de particular dor, e mesmo diante das limitações causadas pelo sofrimento alheio, soube administrar um grupo para mantê-lo coeso ainda que uma de suas peças estivesse com problema. Foi quem muitas vezes ocupou o espaço de minha família, e deixei tudo de lado para atender às suas expectativas e jamais frustrar seus anseios. Lamento muito se em algum momento fui falho, se desiludi, ou se não atendi à confiança em mim depositada. Mas trago comigo que mesmo coberto com o manto das desculpas, jamais deixarei de reconhecer e servir por tudo aquilo que a senhora me proporcionou. Minha reconhecida gratidão por tudo. Tudo.

Ao meu saudoso pai **Martim Constante Ferreira do Amaral**, que, por mais que a sua falta tenha sido sentida durante todos os instantes desde a sua partida, nada me trouxe mais motivação que o brilho de sua lembrança para clarear meus horizontes. Ainda que um dia tivesse a chance de ser novamente contemplado para ter um novo pai, seria novamente sob sua criação que desejaria ser acolhido. Meu grande exemplo em vida, e mesmo após ela, por toda a seriedade com que transmitiu lidar com o mundo, pois toda oportunidade de vitória só é oferecida àqueles que a merecem. Até porque, os lendários se tornam ídolos. Os imortais se tornam heróis. Pai, foste ambos.

À minha mãe **Gasparina dos Reis Ferreira do Amaral**, por ter dedicado muito mais que o tempo e as palavras para me mostrar que a distância que nos separou por estes longos anos não foi suficiente para diminuir um lampejo do seu amor, dedicação e comprometimento com a criação de seus filhos. Por todo o significado e razão que tem na minha vida, e mesmo com estas poucas palavras eu não consigo transmitir a significância do meu amor incondicional. Dedico tudo o que tenho a você, mãe, muito mais do que para qualquer outra pessoa.

À minha irmã **Tanyra de Fátima Ferreira do Amaral**, por ter sido zelosa nas situações pertinentes e, mesmo distante, soube me mostrar que nada é tão difícil quanto não possuir uma convicção do que se quer. Você soube fazer as escolhas conforme sua percepção da realidade e, ainda que tivéssemos visões tão díspares, manteve-se leal a mim. Minha notória gratidão por tudo.

À minha namorada **Natália Marcumini Pola**, que abdicou de tantas noites de sono para colaborar em tudo àquilo que foi necessário. Por ter me acompanhado em todos os empreendimentos intelectuais por onde estive. Por ter participado de todas as conquistas acadêmicas nas quais me empenhei. Por ter feito muito mais do que aquilo que alguém na sua condição faria. Por todas as palavras reconfortantes que recebi ainda que tivesse pouca condição de ajuizar a respeito. Por todo o companheirismo, cumplicidade e dedicação por este indivíduo falho, turrão, difícil de lidar, orgulhoso, mas reconhecedor de que a própria vida ganhou um sentido muito mais belo a partir do momento que nos conhecemos. Por ter feito muito mais que o papel de namorada, mas consciente de que nossa vida possui um sentido irrestrito de aconchego ao lado do outro. Obrigado por ser quem é. Obrigado por ser, e ter. Ao sempre...

Aos meus **tios, tias, primos e primas**, pela confiança e incentivo durante toda a jornada. Embora soubessem que o calor e pressão é necessário para forjar o ferro e dele extrair uma espada, me ensinaram que não é apenas na dureza que se encontra a firmeza. Por vocês, sempre solícitos naquilo que melhor poderiam oferecer à minha formação, meus sinceros agradecimentos.

Às minhas avós **Juercina e Aida**, que hoje ausentes, mostram-se presentes em cada passo que sigo adiante, seja pela forma amorosa e peculiar com que cada uma soube lidar com a vida, ou seja pela influência que tiveram em minha

formação desde o nascimento. A vocês, que me viram partir e hoje não me veem voltar, tem meu profundo respeito.

A todos que me deram apoio nos momentos de maior dificuldade, na Seção Técnica de Saúde, na pessoa do **Dr. Ricardo Wahys**, e no PROMOVI, na pessoa da psicóloga **Gláucia Barbosa**, por terem sido aqueles que ofereceram novas perspectivas e partilhado sua costumeira atenção.

Aos servidores técnico-administrativos do Setor de Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Alan, Arnaldo, Camilo e João Batista**, pelo zelo e prestimosa colaboração com que sempre trataram os animais usados nos experimentos.

Aos **animais** usados nos experimentos, que cederam a própria vida para a construção do conhecimento.

A todos aqueles que contribuíram na realização deste trabalho que, construído como uma sólida estrutura, neste momento se concretiza como um sonho.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“É preciso sentir a necessidade da experiência, da observação, ou seja, a necessidade de sair de nós próprios para ascender à escola das coisas, se as queremos conhecer e compreender.”

Émile Durkheim

RESUMO

Do-AMARAL CCF. **Estudo do fenótipo osteobástico em células-tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR) na presença ou não de doença periodontal.** [Mestrado em Ciências Fisiológicas]. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – SBFis, Faculdade de Odontologia de Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2013.

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da doença periodontal (DP) induzida por ligadura nos mecanismos envolvidos na atividade osteoblástica e mineralização da matriz óssea a partir de células-tronco derivadas da medula óssea do fêmur de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). As linhagens (180-220 g) foram divididas em dois grupos cada: Wistar Controle [WC] e SHR Controle [SC], Wistar com DP [WDP] e SHR com DP [SDP]. Foi realizada na área de furca a análise imunoistoquímica da expressão de receptor ativador nuclear kappa-B ligante (RANKL), osteoprotegerina (OPG), fosfatase alcalina específica do osso (BALP), osteocalcina (OC), metaloproteinases de matriz (MMP)-2, e MMP-9, e fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) da região de furca 15 dias após a indução da DP. Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMs) foram coletadas para diferenciação osteogênica. Taxa de proliferação celular, conteúdo de proteína total e atividade específica da enzima fosfatase alcalina (FAL) foram analisadas nos dias 3, 7, 10 e 14. A mineralização da matriz foi analisada no dia 17. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), analisados por one- ou two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ou Bonferroni, quando apropriado. RANKL foi fracamente expresso em ambas as linhagens, mas foi moderadamente expresso em animais SDP. OPG foi moderadamente expressa em animais sem DP, mas fortemente expressos naqueles com DP. A expressão de BALP foi maior no SDP que nos animais WDP. Imunomarcagem para OC estava ausente ou fraca em ambas as linhagens e exibiram uma tendência ao aumento na presença de DP. Expressão de MMP-2 estava ausente ou fraca em animais sem DP, mas aumentou ligeiramente em animais WDP. MMP-9 foi moderadamente expressa em animais sem DP, mas fortemente expressa após DP, especialmente no grupo de SDP. O número de células TRAP-positivas observadas nos grupos WC, SC, WPD e SPD foram, respectivamente, $16,25 \pm 6,24$, $48 \pm 9,83$, $69,25 \pm 6,75$ e $95 \pm 13,34$. Taxa de proliferação celular, conteúdo de proteína total, atividade de FAL e formação de nódulos de matriz mineralizada foram maiores em osteoblastos de ratos Wistar em comparação com aqueles de SHR. A presença da DP modificou a expressão das proteínas relacionadas à remodelação óssea in vivo, sendo observada maior remodelação em animais SHR. O estudo in vitro mostrou que houve menor taxa de proliferação de osteoblastos e produção de matriz orgânica em células de animais SHR. A presença de DP aumentou a taxa de proliferação celular, conteúdo de proteína total e diminuiu a atividade de FAL em ambas as linhagens.

Palavras-chave: doença periodontal, hipertensão, células-tronco, osteoblastos, osteoporose.

ABSTRACT

Do-AMARAL CCF. **Experimentally induced periodontitis changes osteoblast phenotype in normotensive and hypertensive rats.** [dissertation]. The Multicentric Graduate Studies Program in Physiological Sciences – SBFis, School of Dentistry of Araçatuba: Unesp – Univ Estadual Paulista; 2013.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of experimentally induced periodontitis in the mechanisms involved in osteoblastic activity and bone matrix mineralization from femoral bone marrow-derived stem cells in normotensive and hypertensive rats. Wistar and SHR rats (180–220 g) were divided into 2 groups each: Wistar control [WC] and SHR control [SC], and Wistar with PD [WPD] and SHR with PD [SPD] groups. Immunohistochemical analysis of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) of the furcation region were assessed 15 days after PD. Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were collected and assessed for osteogenic differentiation. Proliferation rate, total protein content, and ALP activity were analyzed at 3, 7, 10, and 14 days. Mineralization of matrix was analyzed at 17 days. RANKL was weakly expressed in both strains, but was moderately expressed in SPD animals. OPG was moderately expressed in animals without PD, but strongly expressed in those with PD. The expression of BALP was higher in SPD than in WPD animals. Immunolabeling for OC was absent or weak in both strains and exhibited a tendency to increase in the presence of PD. MMP-2 expression was absent or weak in animals without PD, but it increased slightly in WPD animals. MMP-9 was moderately expressed in animals without PD, but strongly expressed after PD, especially in the SPD group. The numbers of TRAP-positive cells observed in the WC, SC, WPD, and SPD groups were 16.25 ± 6.24 , 48 ± 9.83 , 69.25 ± 6.75 , and 95 ± 13.34 , respectively. Proliferation rate, total protein content, ALP activity, and bone-like nodule formation were increased in osteoblasts from Wistar rats compared with those from SHR. Inflammatory conditions increased proliferation rate and total protein content, but decreased ALP activity in both strains. SHR tended to exhibit a lower osteoblast proliferation rate, and organic and mineral matrix production than Wistar rats.

Keywords: periodontal disease, hypertension, stem cells, osteoblasts, osteoporosis.

LISTA DE FIGURAS

Lista de Figuras.

Figura 1 – Escores de imunomarcção para RANKL, OPG, BALP e OC no tecido periodontal de animais Wistar e SHR com ou sem DP.

Figura 2 – Escores de imunomarcção para MMP-2 e MMP-9, e contagem de células TRAP-positivas no tecido periodontal de animais Wistar e SHR com ou sem DP.

Figura 3 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcção para RANKL.

Figura 4 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcção para OPG.

Figura 5 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcção para BALP.

Figura 6 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcção para OC.

Figura 7 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcação para MMP-2.

Figura 8 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcação para MMP-9.

Figura 9 – Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de DP demonstrando a imunomarcação de células TRAP-positivas.

Figura 10 – Densidade óptica avaliada por espectrofotometria correspondente à taxa de proliferação celular por refletir a atividade mitocondrial aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO).

Figura 11 – Densidade óptica avaliada por espectrofotometria correspondente à quantificação proteica aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO).

Figura 12 – Densidade óptica avaliada por espectrofotometria correspondente à atividade específica da enzima fosfatase alcalina aos 3, 7, 10 e 14 dias de

cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO).

Figura 13 – Ensaio de mineralização biológica por Vermelho de Alizarina no dia 17 de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de Abreviaturas e Siglas

MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
EDTA	=	Ácido Etilenodiaminotetracético
ANOVA	=	Análise de Variância
Na ₂ CO ₃	=	Carbonato de sódio
CTMs	=	Células-Tronco Mesenquimais
cm ²	=	Centímetro quadrado
CEUA	=	Comitê de Ética no Uso de Animais
D10	=	Dia 10
D14	=	Dia 14
D3	=	Dia 3
D7	=	Dia 7
CO ₂	=	Dióxido de carbono
SDS	=	Dodecil sulfato de sódio
DCV	=	Doença Cardiovascular
DP	=	Doença Periodontal

EPM	=	Erro Padrão da Média
TNF	=	Fator de Necrose Tumoral
TRAP	=	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
FAL	=	Fosfatase Alcalina
BALP	=	Fosfatase Alcalina Específica do Osso
FAPESP	=	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
g	=	Grama
NaOH	=	Hidróxido de sódio
h	=	Hora
IFN	=	Interferon
IL	=	Interleucina
LPS	=	Lipopolissacarídeo
MEM	=	Meio essencial mínimo
MO	=	Meio osteogênico
MMP	=	Metaloproteinase de matriz
µg	=	Micrograma
µl	=	Microlitro
µm	=	Micrômetro

mg	=	Miligrama
mg	=	Miligrama
mL	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
mmHg	=	Milímetros de mercúrio
mmol	=	Milimol
mM	=	Milimolar
nm	=	Nanômetro
ONU	=	Organização das Nações Unidas
OMS	=	Organização Mundial de Saúde
OC	=	Osteocalcina
OPG	=	Osteoprotegerina
kg	=	Quilograma
SHR	=	Ratos Espontaneamente Hipertensos
RANKL	=	Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa-B Ligante
SDP	=	SHR com Doença Periodontal
SC	=	SHR Controle
PBS	=	Tampão fosfato salino

U = Unidades

WDP = Wistar com Doença Periodontal

WC = Wistar Controle

LISTA DE SÍMBOLOS

Lista de Símbolos

\pm	=	Desvio Padrão
$^{\circ}\text{C}$	=	Graus Celsius
=	=	Igual
<	=	Menor
\leq	=	Menor ou igual
:	=	Para
/	=	Por
%	=	Por cento
p	=	Probabilidade do valor do teste
x	=	Vezes

LISTA DE ANEXOS

Lista de Anexos

Anexo A	Artigo	96
Anexo B	Normas para Publicação no Periódico “Bone”	134
Anexo C	Certificado do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA)	147
Anexo D	Submissão do Manuscrito	149

Sumário

Introdução	39
Proposição	46
Materiais e métodos	48
Resultados	56
Discussão	78
Conclusões	87
Referências	89
Anexos	95

INTRODUÇÃO

1 Introdução

A doença periodontal (DP) é uma inflamação crônica dos tecidos periodontais frequentemente associada com perda óssea alveolar progressiva que atinge de 14 a 74% da população, variando conforme os hábitos alimentares e saúde pública (1, 2). A severidade e consequente destruição dos tecidos periodontais é dependente de interações dinâmicas entre o desafio microbiano e a resposta imune inflamatória do hospedeiro, tais como citocinas e quimiocinas, incluindo as interleucinas (IL) 1 β , 4, 6, 8, 17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e metaloproteinases (MMPs) na circulação sanguínea e nos tecidos distantes do sítio de inflamação periodontal (3-5). Ao mesmo tempo, a periodontite também pode ser influenciada por uma série de fatores de risco e influência de fatores genéticos e ambientais, incluindo condições sistêmicas, como diabetes, imunodeficiência, estresse, hipertensão e osteoporose (6-11).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado composto, entre outros, por uma matriz de colágeno, que por sua vez é mineralizada pela deposição de fosfato de cálcio. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea estão amplamente divididos em duas categorias: os marcadores de reabsorção óssea, que refletem a atividade dos osteoclastos que representam a maior parte da degradação do colágeno tipo I; e os marcadores de formação óssea, que refletem a atividade dos osteoblastos e produtos da síntese de colágeno, proteínas da matriz ou enzimas osteoblásticas. Os marcadores mais sensíveis e específicos de formação óssea incluem a fosfatase alcalina específica do osso (FAL) e a osteocalcina (OC).

Considerado um problema de saúde pública e atingindo grande parte da população, a osteoporose é caracterizada por uma desordem esquelética que apresenta uma fragilidade da estrutura mineralizada, com consequente redução e comprometimento da massa óssea, aumento do risco de fratura, reparação óssea reduzida, e, muitas vezes, perda óssea (12, 13). Algumas evidências clínicas identificaram uma relação entre periodontite e osteoporose (14, 15). No entanto, os mecanismos subjacentes a essa associação ainda não estão completamente esclarecidos. Há indícios de que pode haver uma progressão da periodontite em pacientes que apresentam osteoporose. Por outro lado, a DP parece contribuir para um estágio transitório de osteoporose por meio de seus mediadores que ativam osteoclastos, mesmo à distância do sítio de instalação da doença (7).

A Hipertensão Arterial também é uma doença que representa grave problema na condição de saúde, atingindo entre 14% a 40% da população nos países do continente americano, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS/ONU). Algumas características, como a complexidade dos recursos para seu controle e prevenção, impacto na saúde das pessoas, fator de risco para o desenvolvimento de outras enfermidades e dificuldade de acompanhamento por parte da população fazem com que esta doença seja explorada atualmente no meio científico. Esta observação tem levado alguns autores a buscar alterações nos processos bioquímicos e fisiológicos que possam estar associadas à hipertensão.

Doenças sistêmicas têm sido associadas a episódios de hipertensão, como diabetes, hipertireoidismo, dislipidemia e osteoporose. Apenas alguns estudos avaliaram a associação entre a doença periodontal e doenças

cardiovasculares (DCV) (16, 17). A doença periodontal pode ser considerada um potente fator de risco para as doenças cardiovasculares, por meio de mecanismos bacterianos orais, toxinas bacterianas e a liberação de mediadores inflamatórios. Wilson (18) e Taubman (19) mostraram que a presença de bactérias periodontopatogênicas pode levar à reabsorção óssea e inibir a sua formação, a partir da presença antigênica do lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na parede celular de bactérias gram-negativas. Surpreendentemente, apesar dos elevados números de casos de hipertensão na população geral e em sua importância prognóstica, poucos dados estão disponíveis relacionando elevada pressão sanguínea e a doença periodontal (20). De acordo com esses estudos, o estado crônico e intenso da inflamação local (periodontite) resulta na presença de mediadores da inflamação na circulação, podendo assim iniciar ou exacerbar a DCV (21). Autores têm demonstrado que tecidos mineralizados são influenciados por uma condição de hipertensão, cujas alterações podem ocorrer durante o metabolismo do cálcio (22, 23).

Animais SHR, obtidos por Okamoto e Aoki (24), apresentam pressão arterial elevada e são considerados modelos animais apropriados da hipertensão arterial humana. A pressão arterial elevada decorrente desses animais, entre outros fatores, ocorre devido ao aumento do tônus simpático e ainda demonstram sintomas da osteoporose. Os mecanismos subjacentes envolvidos nas desordens ósseas ainda estão pouco elucidados. No entanto, grupos de animais espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam menor taxa de crescimento, peso corporal, volume do trabeculado ósseo, número de osteoblastos e células osteoprogenitoras por milímetro quadrado. Em animais

SHR a atividade osteoclástica apresenta-se dominante sobre a atividade osteoblástica e condroblástica, resultando em uma menor quantidade de tecido ósseo esponjoso (22, 23). As evidências de desordens no metabolismo ósseo de animais SHR sugerem a condição de osteoporose em indivíduos adultos (25). No entanto, até o presente momento não se tem descrito quais as proteínas envolvidas na formação do tecido ósseo que estão deficitárias nos modelos de hipertensão. Estudos avaliaram histologicamente que a periodontite apresenta-se exacerbada em animais SHR, com níveis moderados e severos de degradação colágena. Em relação a animais sadios, a mesma análise apresentou valores discretos de degradação (17). Contudo, mesmo sem a presença de um processo inflamatório instalado, animais SHR apresentam alterações no tecido ósseo periodontal (26).

Estudos realizados em células do estroma medular, também chamadas de células-tronco mesenquimais (CTMs), têm contribuído significativamente na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação em osteoblastos, proporcionando desta forma dados importantes sobre o comportamento destas células isoladas e o seu metabolismo. CTMs são células-tronco não hematopoiéticas multipotentes descritas primariamente por Friedenstein e colaboradores (27), que possuem a característica de aderirem a placas de cultura, adquirirem morfologia fibroblastoide e são capazes de formar colônias (28). CTMs ainda possuem a capacidade de se auto-renovarem e diferenciarem em linhagens do tecido conjuntivo, como osso, cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo (29). Sob condições ambientais apropriadas, estas células são capazes de se diferenciarem em osteoblastos maduros (30). A diferenciação osteogênica *in vitro* tem sido caracterizada pela expressão do

fenótipo osteoblástico e pode ser dividida em três fases distintas: proliferação, maturação e mineralização da matriz extracelular (31-33). Os osteoblastos formam uma camada proliferativa, cuja característica é a produção de matriz orgânica e consequente deposição mineral. A região do osteóide é mineralizada por meio de transporte de íons, essencialmente cálcio e fosfato, que formam a estrutura química da hidroxiapatita (34).

Os marcadores mais investigados durante o estágio de diferenciação dos osteoblastos incluem (1) colágeno tipo I, que constitui de 90 a 95% da matriz extracelular produzida, cuja estrutura tem característica de conferir flexibilidade ao osso (35); (2) fosfatase alcalina (FAL), que promove a hidrólise das moléculas de β -glicerolfosfato e é considerada a enzima-chave no processo de início diferenciação para a mineralização (36); (3) sialoproteína óssea, que se conjuga com o colágeno tipo I (37) e promove o início da deposição dos cristais de hidroxiapatita (38); e (4) osteocalcina, que é sintetizada pelos osteoblastos e possui alta afinidade com os cristais de hidroxiapatita, sendo expressa nos estágios tardios da maturação osteoblástica. Possui a finalidade de regular o crescimento e integridade do cristal ósseo (39).

Sendo o osso uma forma especializada e muito densa de tecido conjuntivo, sua matriz é predominantemente uma mistura de colágeno e partículas sólidas. Enquanto o colágeno resiste às forças de tração, seu componente particulado resiste às forças de compressão. No entanto, apesar de toda sua rigidez, o tecido ósseo não é permanentemente imutável, pois em toda sua matriz extracelular estão canais e cavidades ocupadas por células vivas, os osteócitos. Estas células estão relacionadas a um turnover de remodelamento responsável pela substituição da matriz no interior do osso (40-

43) e embora não tenham a oportunidade de se dividir, continuam a secretar pequenas quantidades de matriz em torno de si e a controlar a mineralização da matriz óssea. Dos três tipos de células ósseas, os osteócitos são muito abundantes no tecido ósseo e tem a interface mais larga com a matriz óssea e sua conexão com outros osteócitos, com osteoblastos e com osteoclastos, via processos citoplasmáticos, formando uma rede celular na matriz. No entanto, o mecanismo de maturação dos osteócitos ainda é obscuro, mas a mineralização da matriz óssea pode ser o gatilho para este processo de maturação (44).

A correta compreensão do processo de diferenciação osteogênica parece ser um caminho muito promissor na regeneração óssea e engenharia tecidual. Alterações no desenvolvimento esquelético de ratos SHR têm sido relatadas na literatura (45, 46). No entanto, não existem relatos sobre o fenótipo osteoblástico de CTMs obtidas nesta linhagem. Além disso, ainda não foi investigada a influência que uma importante condição inflamatória crônica como a PD pode exercer sobre a diferenciação osteogênica em modelos experimentais normotensos e hipertensos. Adicionalmente, ainda são escassos os trabalhos na literatura científica que abordem biologia tecidual em modelos de periodontite experimentalmente induzida em animais Wistar e SHR.

PROPOSIÇÃO

2 – Proposição

Considerando-se a ausência de evidências científicas supramencionadas, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de periodontite induzida por ligadura nos mecanismos envolvidos na atividade dos osteoblastos e a mineralização da matriz óssea a partir de células-tronco derivadas da medula óssea femoral de ratos normotensos e hipertensos. Nossos estudos sugerem que a hipertensão tende a diminuir a taxa de proliferação de osteoblastos e a produção da matriz orgânica e a doença periodontal tendem a aumentá-los. Para ajudar a elucidar estas questões, foram adotadas as seguintes estratégias:

- Avaliar imunomarcagem das proteínas Fosfatase Alcalina Específica do Osso (BALP) e Osteocalcina (OC) na região de furca.
- Avaliar expressão do Receptor Ativador de Fator Nuclear κ B Ligante (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG) na região de furca.
- Avaliar a expressão de Metaloproteinase tipo 2 (MMP-2), Metaloproteinase tipo 9 (MMP-9) na região de furca.
- Avaliar a quantidade de osteoclastos na região de furca por meio da imunomarcagem à enzima Fosfatase Ácida Tartrato-Resistente (TRAP).
- Avaliar a taxa de proliferação celular, atividade específica da enzima FAL, conteúdo de proteína total e mineralização biológica de osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais de animais Wistar e SHR com ou sem DP.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 Materiais e Métodos

3.1 Modelo experimental e aspectos éticos

O protocolo experimental (Processo FOA – 367/11) foi revisto e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo FOA 367/11). Foram usados no total 20 ratos Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) e 20 animais SHR, com idade entre 60 e 75 dias, pesando entre 180 e 220 g. A pressão sanguínea sistólica foi aferida por pletismografia de cauda (Narco Bio-systems, Houston, TX, EUA). Somente animais SHR que apresentaram pressão sanguínea sistólica igual ou superior a 150 mmHg foram selecionados. Estes animais foram mantidos em ambiente com ciclo de 12 horas de luz por dia, temperatura entre 22 ± 1 °C e umidade ($55\% \pm 3\%$). Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida selecionada e água ad libitum.

3.2 Periodontite induzida por ligadura

Os animais foram divididos em 4 grupos contendo 10 animais cada conforme segue: (1) Wistar Controle (WC), Wistar com DP (WPD), SHR Controle (SC) e SHR com DP (SPD). Para realização de todos os procedimentos experimentais, os ratos foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (10 mg/kg de peso corporal) (Dopalen; Vetbrands, Paulínia, SP, Brasil) e quetamina (80 mg/kg de peso corporal) (Anasedan; Vetbrands). Os primeiros molares inferiores de cada animal receberam uma

ligadura com fio de seda (4-0) ao redor da posição subgengival. Após 15 dias do posicionamento da ligadura, os animais foram eutanasiados por meio da colocação dos mesmos em um recipiente hermético cúbico de vidro, onde respiraram uma mistura de 2% de halotano (Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brasil) em ar atmosférico por 10 minutos. Os fêmures e as mandíbulas foram obtidos destes animais para os ensaios histológicos e de biologia celular, respectivamente.

3.3 Análise Histológica e Quantificação Imunoistoquímica

As mandíbulas foram removidas e fixadas em paraformaldeído tamponado neutro a 4% por um período de 24 h. Os espécimes foram lavados e descalcificados com uma solução contendo 10% de ácido dietilaminotetracético (EDTA) (Sigma Chemical, St Louis, MO, EUA) por 30 dias. Após este procedimento, as mandíbulas foram desidratadas em séries crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais contendo 6 μm de espessura e imunologicamente marcados para determinar a expressão de Receptor Ativador Nuclear kappa-B Ligante (RANKL), Osteoprotegerina (OPG), Fosfatase Alcalina Específica do Osso (BALP), Osteocalcina (OC), Metaloproteinase tipo 2 (MMP-2), Metaloproteinase tipo 9 (MMP-9) e Fosfatase Ácida Tartrato-Resistente (TRAP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Foram utilizadas as concentrações de anticorpos primários anti-RANKL (1:100), anti-OPG (1:50), anti-OC (1:100), anti-MMP-9 (1:50) e anti-TRAP (1:500) feitos em cabra, anti-MMP-2 (1:250) feito em camundongo e anti-BALP (1:250) feito em coelho. Os anticorpos secundários biotinilados (Jackson Immuno research Laboratories,

West Grove, PA, EUA) anti-cabra, anti-camundongo e anti-coelho tiveram a concentração de 1:500. Para a amplificação da reação foi utilizado o kit contendo o complexo avidina-biotina (Dako Corp., Carpinteria, CA, EUA), e o cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (Dako Corp.). Com o objetivo de aprimorar a técnica para uma correta identificação das moléculas-alvo, todas as imunomarcações foram padronizadas previamente. Adicionalmente, foram feitos controles negativos para avaliar possíveis marcações inespecíficas. Ao final do procedimento, as estruturas basofílicas foram coradas com Hematoxilina de Harry's. As imagens selecionadas foram digitalizadas em magnificação de original de 100x ou 400x com uma câmera (Axio Cam MRc5; Carl Zeiss do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil) acoplada a um microscópio óptico (Stemi 2000-C; Carl Zeiss do Brasil Ltda.). O background decorrente da digitalização, balanço de cor, brilho e contraste foram corrigidos com o auxílio de software específico. Para a análise quantitativa e semiquantitativa da imunistoquímica, dez cortes foram aleatoriamente selecionados por um dos autores para o exame da região de furca do primeiro molar inferior. Foram determinados escores em proporção a marcação como 0, 1, 2, 3 e 4 correspondente a ausente, fraco, moderado, forte e muito forte imunorreatividade, respectivamente.

3.4 Isolamento, preparação e cultura de células-tronco de ratos

A medula óssea foi obtido a partir dos dois fêmures e removida pela passagem de 20 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo 10% de Soro

Fetal Bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (100 U/mL de Penicilina G, 100 µg/mL de Estreptomicina e 0,3 µg/mL de Anfotericina B) (Sigma). A suspensão celular foi filtrada por uma tela metálica de 70 µm de diâmetro de perfuração através de agulhas do tipo gauge de calibres 22 e 26. Após uma rápida centrifugação, o sedimento celular foi suspenso em meio de cultura e em seguida dividido e semeado em frascos de cultura de 75 cm² (Santa Cruz Biotechnology). As células foram cultivadas em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Após um período de 10 dias, uma vez confluentes, as células foram recolhidas com a utilização de uma solução de tripsina-EDTA (Sigma). Células nucleadas foram contadas por meio de um hemocítmetro (câmara de Neubauer), e foram então subcultivadas a $5,0 \times 10^5$ células/poço em placas de cultura de 24 poços (Santa Cruz Biotechnology).

3.5 Diferenciação osteogênica

Após 4 dias em cultura, as células foram cultivadas em meio osteogênico contendo MEM suplementado com 10 nM β-glicerofosfato (β-GP), 50 µg/mL de ácido ascórbico e 10 nM de dexametasona (Sigma). Após 3, 7, 10 e 14 dias, a viabilidade celular foi avaliada por meio da conversão de [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma) em cristais de formazan. A atividade de FAL e conteúdo de proteína total foram avaliados também no período 3, 7, 10 e 14 dias, e a produção de nódulos mineralizados foi avaliada aos 17 dias.

3.6 Ensaio de atividade mitocondrial pela redução do MTT

Os meios de cultura foram removidos e substituídos pelo MEM livre de SFB contendo 0,5 mg/mL de MTT. Esse ensaio é dependente da redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis, em formazan, o qual pôde ser quantificado por densidade óptica avaliada por espectrofotometria. A redução celular do MTT pela atividade mitocondrial do anel tetrazólio resultou na formação de um depósito de cristais de formazan com coloração de roxo-escuro insolúvel em água. Após incubação durante o período de 3 h, o meio sobrenadante foi removido e 500 μ L de etanol a 96% foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. Depois disso, 200 μ L da solução foram colocados em uma placa de 96 poços, e os valores de absorbância foram capturados com o auxílio de um espectrofotômetro com o comprimento de onda calibrado a 570 nm.

3.7 Conteúdo de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada aos 3, 7, 10 e 14 dias, seguindo o método de Lowry (47). O meio de cultura dos poços foi removido, e os poços foram lavados com solução tampão de fosfato salino (PBS) frio e posteriormente foram adicionados 300 μ L do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% para formar o lisado celular. Ao final dos ciclos, 1 ml do lisado de células de cada poço foi transferido para tubos de ensaio, misturado com 500 μ l de solução de Lowry (Sigma) e deixado em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, foram adicionados 200 μ L de solução de reagente fenol de Folin e Ciocalteau. Os dados foram normalizados

utilizando albumina sérica bovina como um padrão. Finalmente, 200 μL da solução foram colocados numa placa de 96 poços e os valores de absorvância foram capturados com o auxílio de um espectrofotômetro com o comprimento de onda calibrado 660 nm. A quantidade de proteína total foi expressa em $\mu\text{g/ml}$.

3.8 Atividade específica da enzima FAL

A atividade de FAL foi medida aos 3, 7, 10 e 14 dias por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial segundo as instruções do fabricante (Labtest Diagnostica SA, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Alíquotas de 25 μL do lisado celular usado para a quantificação proteica foram usados para calcular a atividade específica de FAL. O lisado foi transferido para tubos, incubado com substrato de FAL e 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/ml, pH 10.1, a 37 °C durante 10 min e, em seguida, a reação foi interrompida pela adição de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 μL da solução padrão. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes, 1 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 mmol/ml e NaOH 0,25 mmol/ml). Depois disto, 200 μL da solução final foram colocados numa placa de 96 poços e os valores de absorvância foram capturados com o auxílio de um espectrofotômetro com o comprimento de onda calibrado 590 nm. A concentração de FAL e atividade específica foram normalizadas pela quantidade total de proteínas.

3.9 Formação de nódulos ósseos in vitro

Ao final de 17 dias, os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37 °C, aspirados e preenchidos com formol tamponado neutro a 4% por 2 h. Em seguida, os poços foram desidratados em séries crescentes de álcoois e as culturas, lavadas com água destilada e incubadas com 1% de Vermelho de Alizarina S (Sigma), durante 30 min à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas com água destilada por duas vezes, e visualizados em microscopia de luz. Os poços foram examinados em microscópio de fase invertido e as imagens selecionadas foram digitalizadas em com uma câmera acoplada ao microscópio. O background decorrente da digitalização, balanço de cor, brilho e contraste foram corrigidos com o auxílio de software específico.

3.10 A análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), analisados por one- ou two-way ANOVA seguido de pelo teste de Tukey ou Bonferroni, respectivamente, quando apropriado, usando um programa estatístico (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). O limite de significância estatística foi estabelecido para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Análise Imunoistoquímica Quantitativa e Semiquantitativa

A imunomarcção das proteínas RANKL, OPG, BALP, OC, MMP-2, MMP-9 na região de furca é apresentada nas Figuras 1 e 2. A análise imunoistoquímica mostrou que a RANKL está fracamente marcada em todos os grupos (Figura 3). Um aumento significativo da expressão de RANKL ocorreu no grupo SDP em relação ao grupo SC ($p < 0,05$) (Figura 1A). A imunomarcção de OPG mostrou uma expressão moderada para os grupos WC e SC (Figura 4). A presença de DP induziu um aumento da imunomarcção de OPG no grupo SDP, quando comparado com o grupo SC ($p < 0,05$), mas não no grupo WPD (Figura 1B). Animais SHR apresentaram expressão elevada de BALP antes e depois DP (Figura 5). A expressão de BALP foi maior no grupo SDP quando comparado com o grupo WPD ($p < 0,05$) (Figura 1C). Houve uma imunorreatividade fraca ou ausente para OC nos grupos WC e SC (Figura 6). Um ligeiro aumento da imunomarcção para OC após DP ocorreu em ambas as linhagens, porém sem significância estatística (Figura 1D). A expressão de MMP-2 foi fraca ou ausente nos grupos WC e SC (Figura 7). Um ligeiro aumento da expressão foi observado no grupo WDP, porém sem significância estatística (Figura 2A). Ratos Wistar e SHR sem DP apresentaram fraca expressão de MMP-9 (Figura 8). No entanto, após a indução da DP, ocorreu um padrão de expressão moderado a forte de MMP-9 e diferenças estatísticas puderam ser notadas entre os grupos WC e WDP ($p < 0,05$), SC e SDP ($p < 0,001$), e entre WDP e SDP ($p < 0,05$) (Figura 2B). A

contagem de células TRAP-positivas observadas nos grupos WC, SC, WDP e SDP foram $16,25 \pm 6,24$, $48 \pm 9,83$, $69,25 \pm 6,75$ e $95 \pm 13,34$, respectivamente. Foi observado um maior número de células TRAP-positivas entre os grupos SC e WC ($p < 0,01$), WDP e WC ($p < 0,001$), SDP e SC ($p < 0,001$) e entre SDP e WDP ($p < 0,05$) (Figura 2 C e Figura 9).

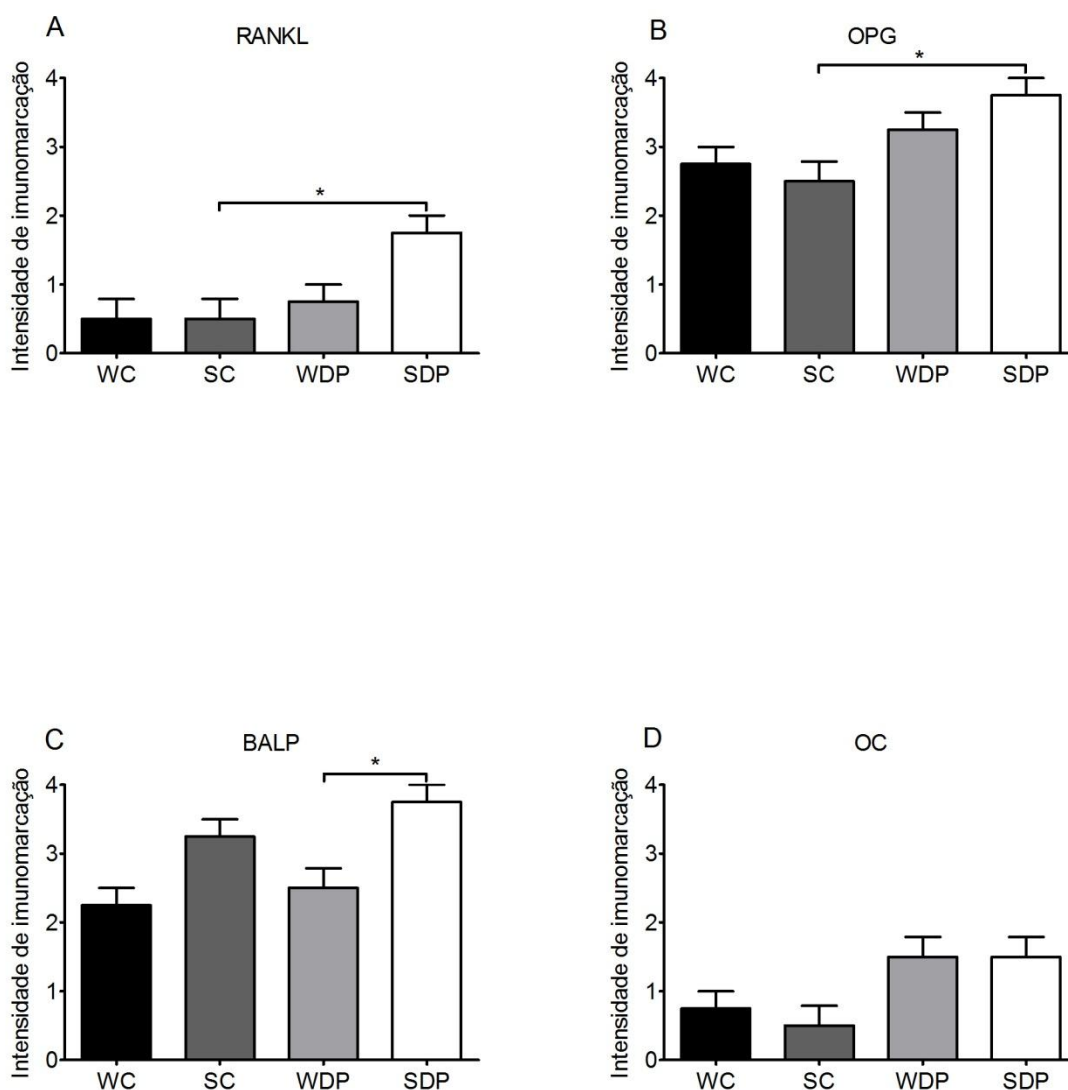


Figura 1 - Imunomarcção para RANKL, OPG, BALP e OC no tecido periodontal de animais Wistar e SHR com ou sem doença periodontal. **Painel A:** Intensidade de marcação para RANKL nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doença Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doença Periodontal (SDP). **Painel B:** Intensidade de marcação para OPG nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doença Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doença Periodontal (SDP). **Painel C:** Intensidade de marcação para BALP nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doença Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doença Periodontal (SDP). **Painel D:** Intensidade de marcação para OC nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doença Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doença Periodontal (SDP). As barras representam a média \pm EPM. Todos os dados foram comparados por ANOVA com post test de Tukey de múltipla comparação. * $p < 0,05$ = estatisticamente significativo.

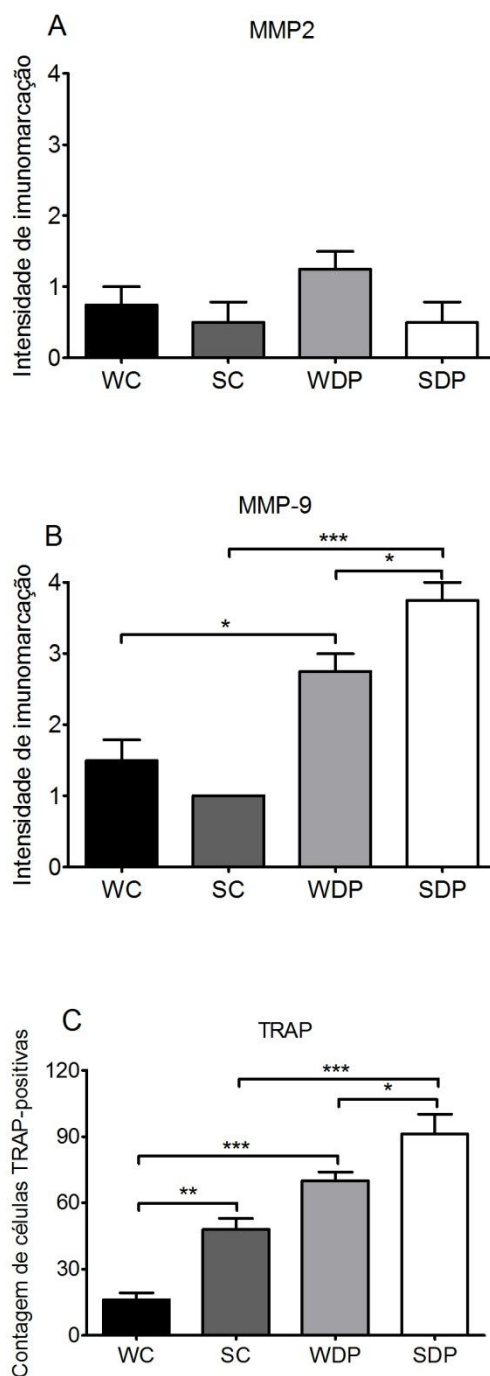


Figura 2 - Imunomarcacão para MMP-2, MMP-9 e TRAP no tecido periodontal de animais Wistar e SHR com ou sem doenca periodontal. **Painel A:** Intensidade de marcação para MMP-2 nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doenca Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doenca Periodontal (SDP). **Painel B:** Intensidade de marcação para MMP-9 nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doenca Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doenca Periodontal (SDP). **Painel C:** Contagem de células TRAP-positivas nos grupos Wistar Controle (WC), Wistar com Doenca Periodontal (WDP), SHR Controle (SC) e SHR com Doenca Periodontal (SDP). As barras representam a média \pm EPM. Todos os dados foram comparados por ANOVA com post test de Tukey de múltipla comparacão. * $p < 0,05$ = estatisticamente significativo.

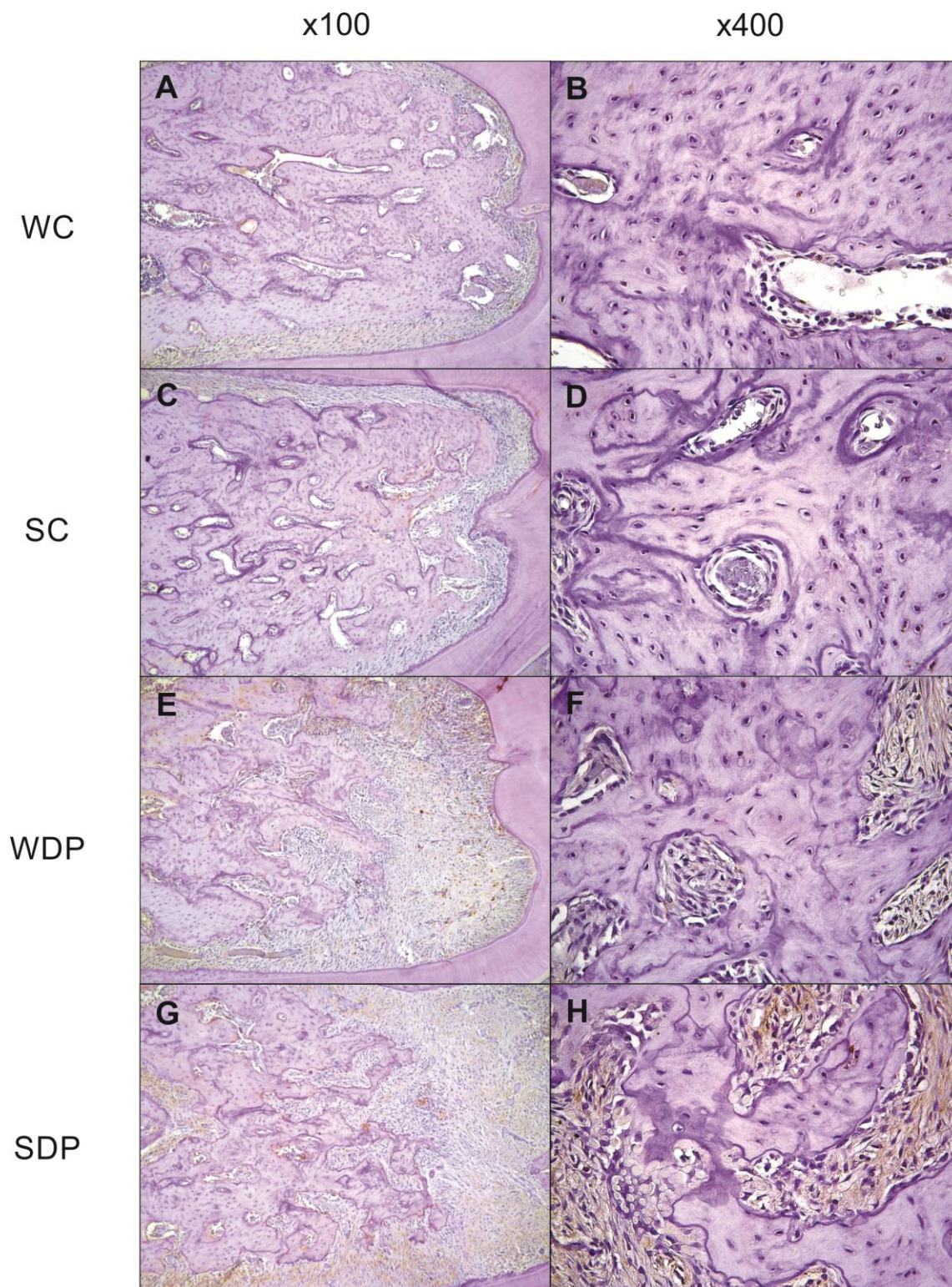


Figura 3 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de RANKL nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematoxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

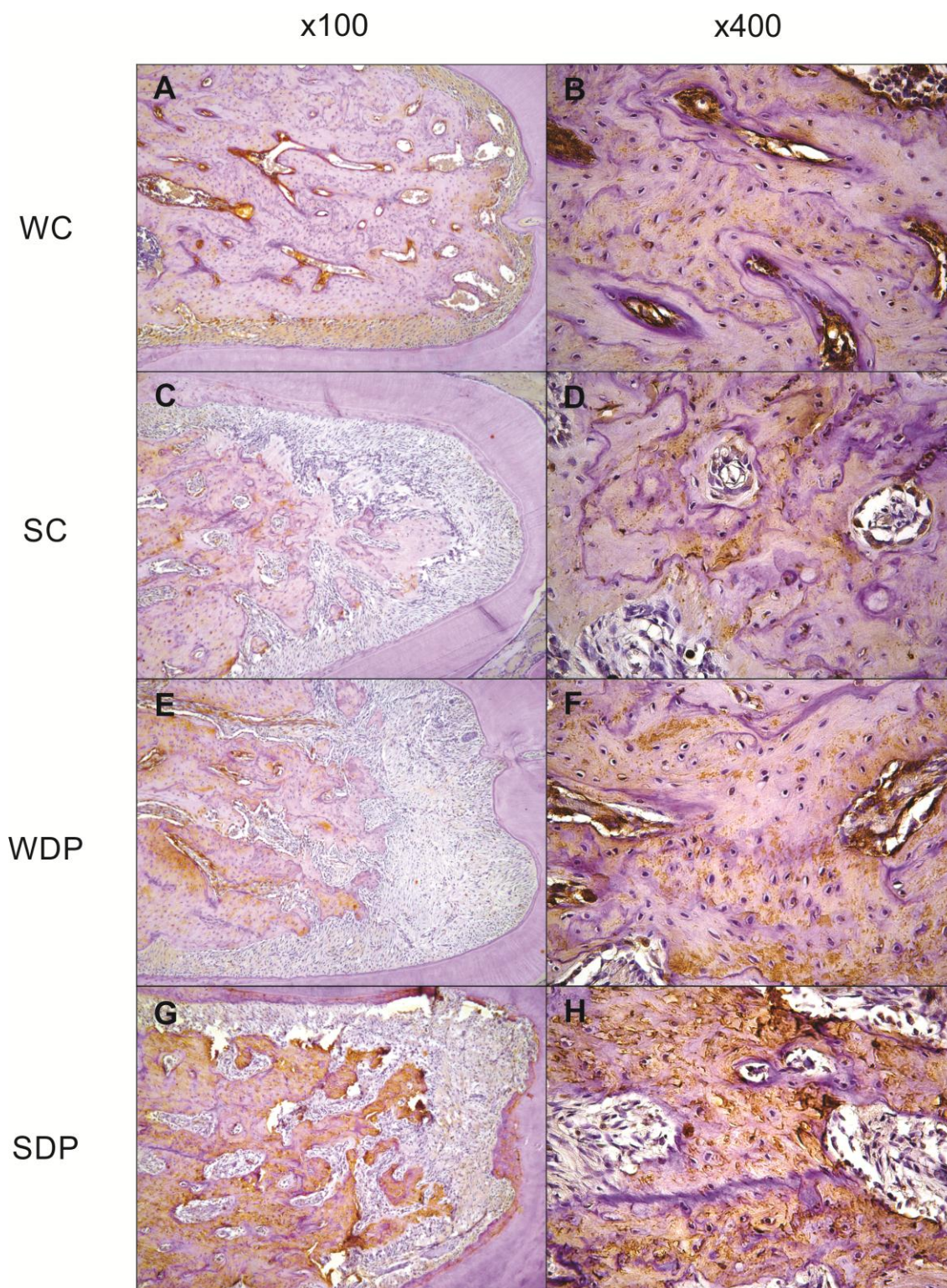


Figura 4 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de OPG nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematoxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

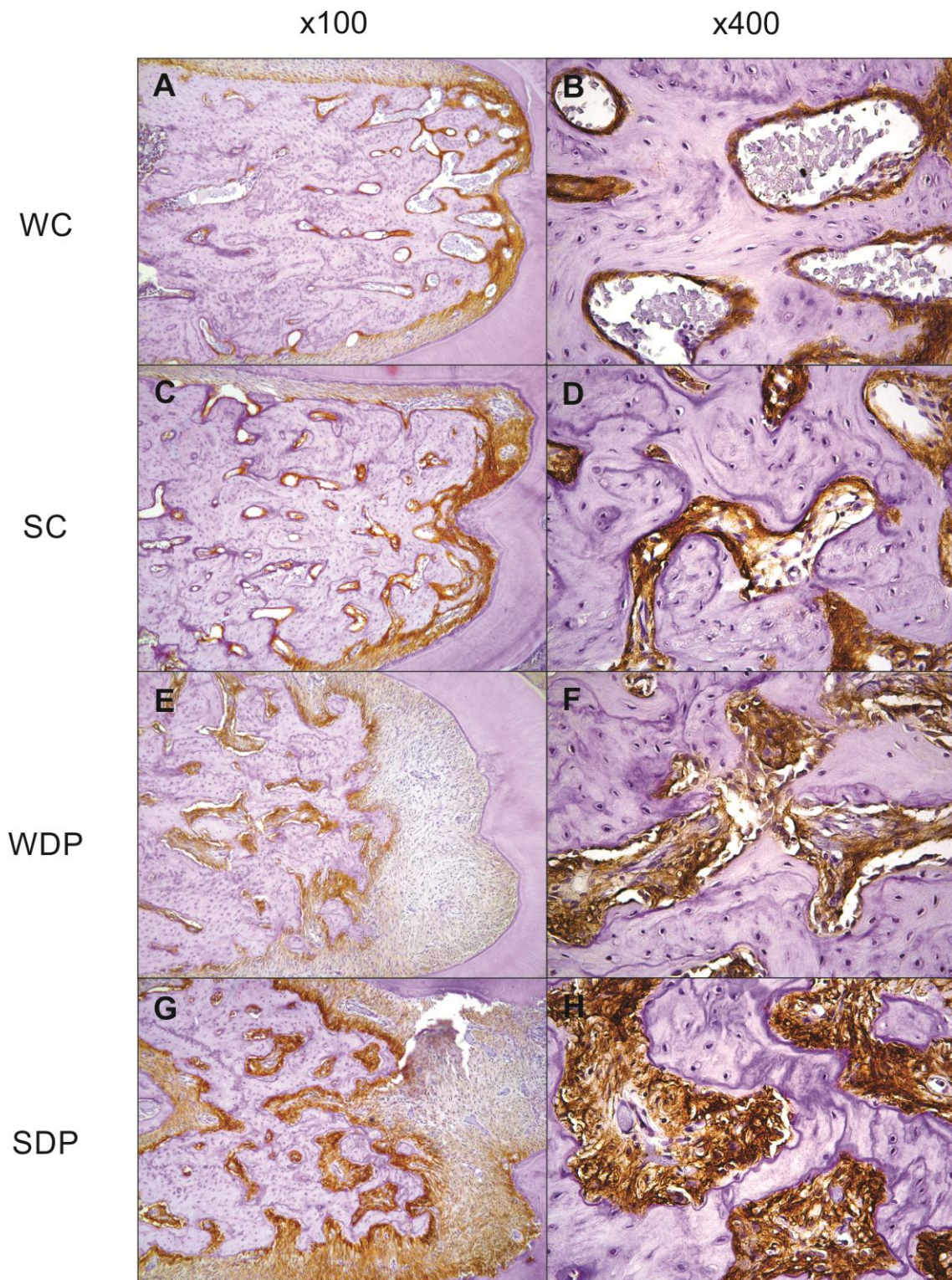


Figura 5 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de BALP nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematoxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

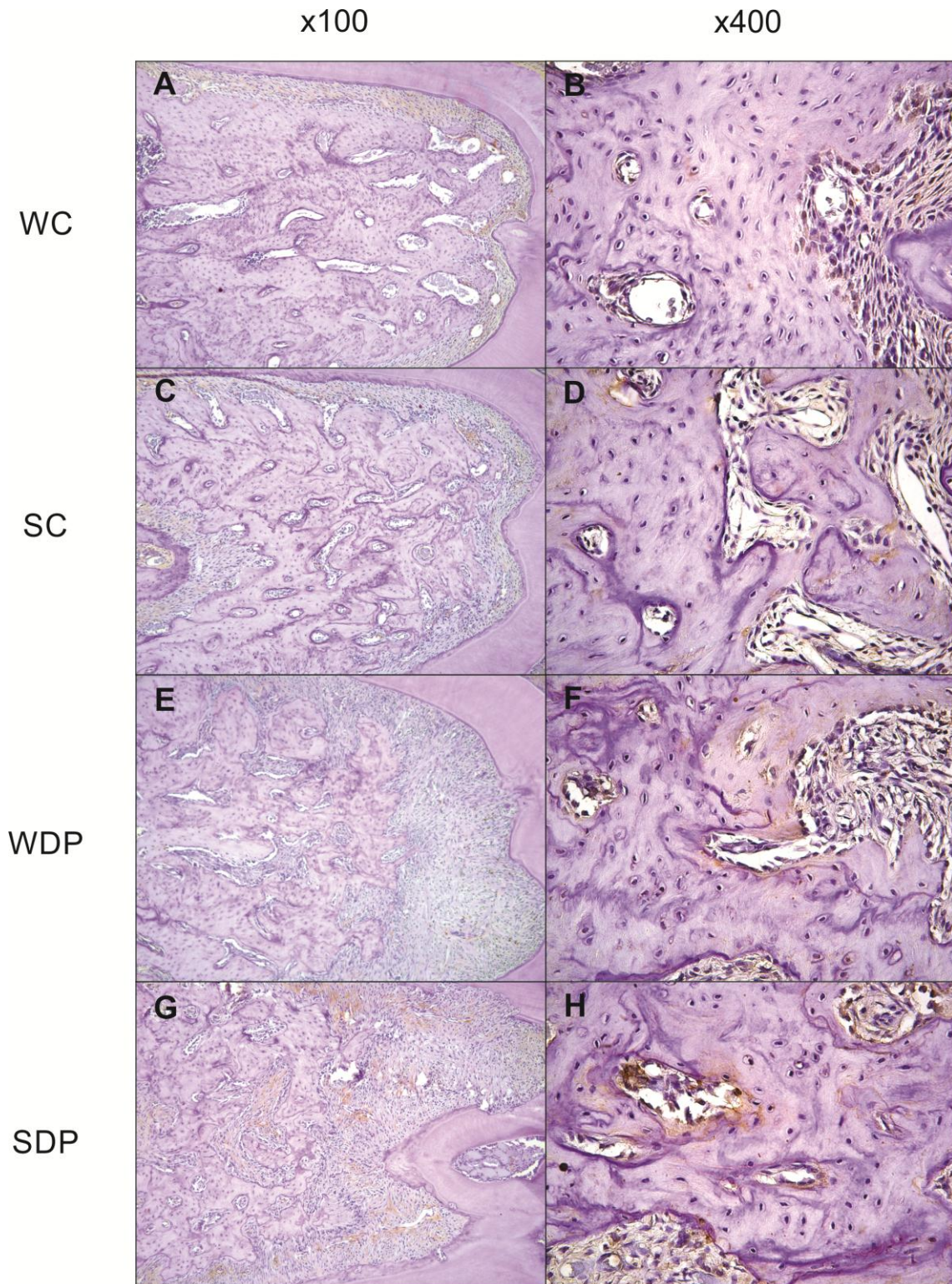


Figura 6 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de OC nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematoxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

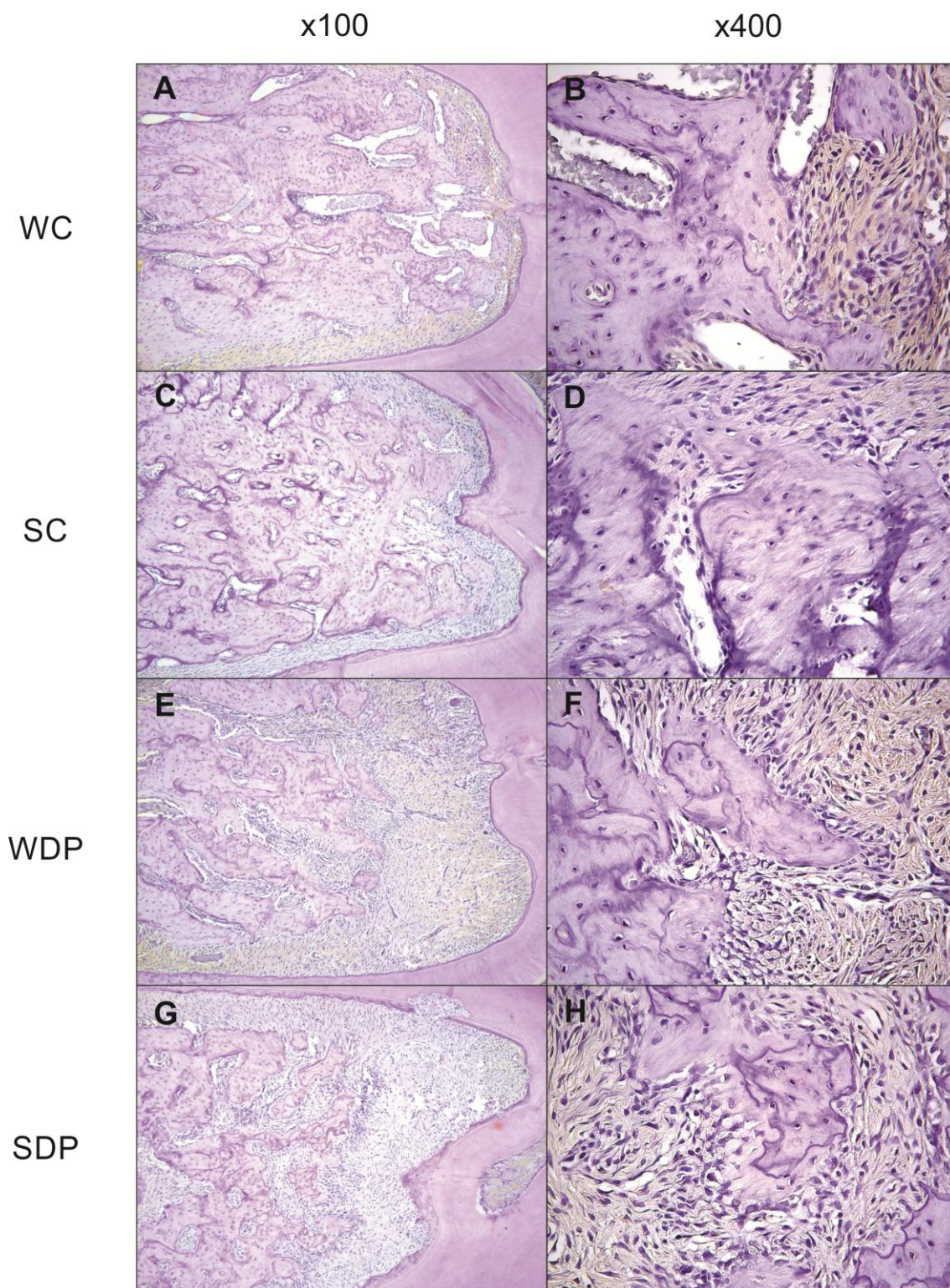


Figura 7 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de MMP-2 nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematoxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

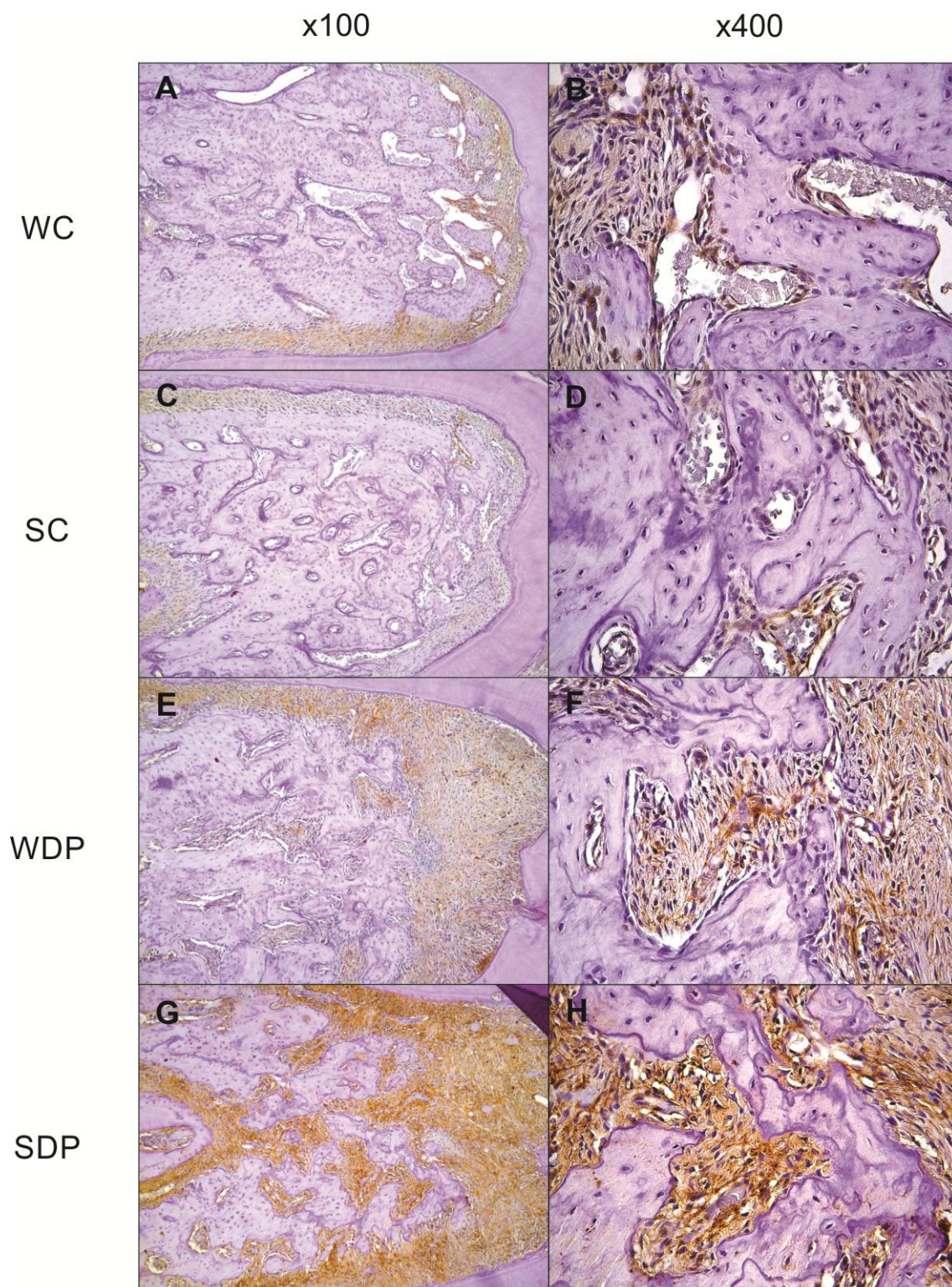


Figura 8 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de MMP-9 nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 100x; B, D, F e H: 400x.

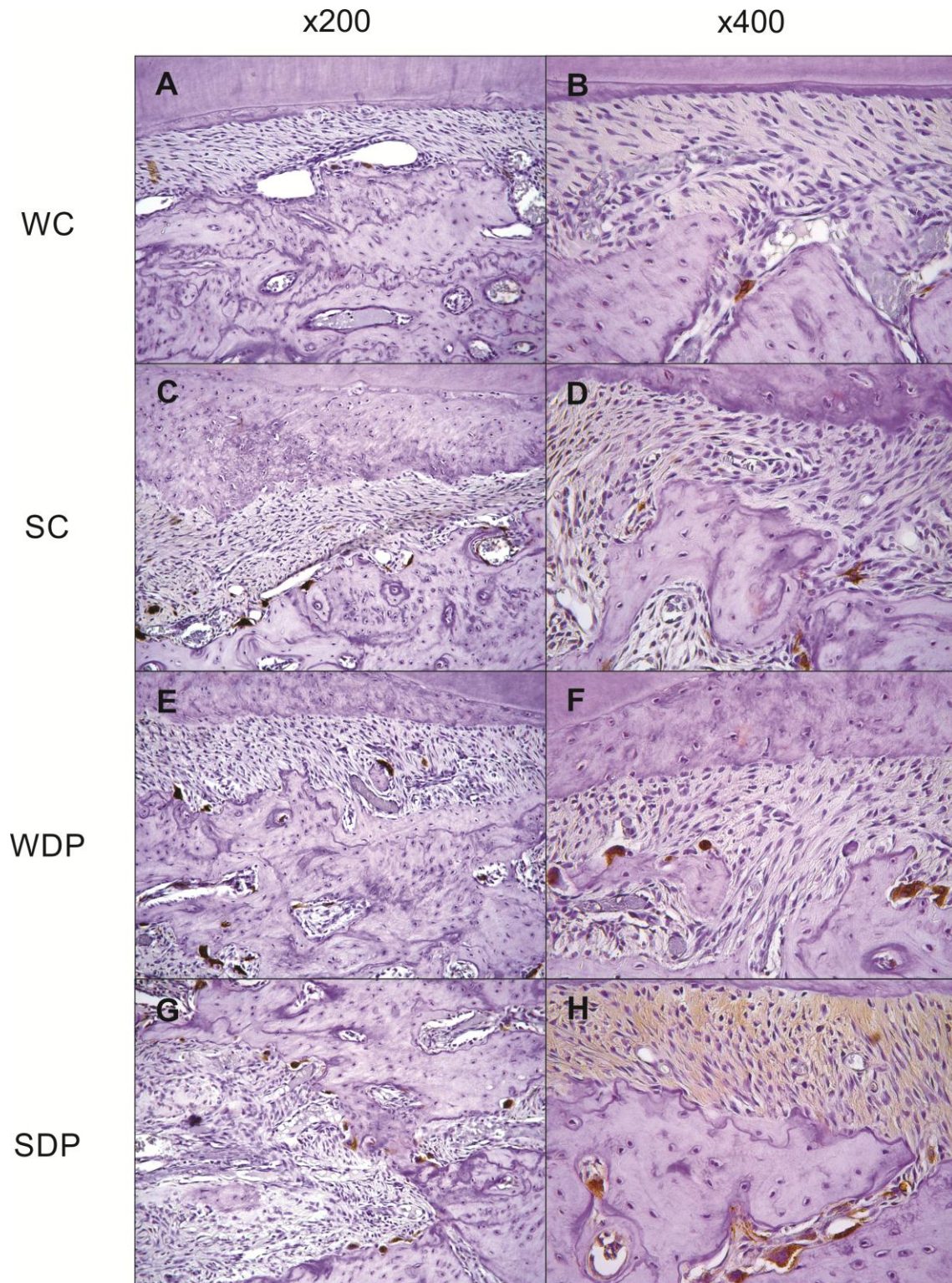


Figura 9 - Fotomicrografia da região de furca dos primeiros molares inferiores dos animais Wistar e SHR Controles e após 15 dias de Doença Periodontal experimentalmente induzida. Expressão de TRAP nos grupos (A e B) Wistar Controle (WC), (C e D) SHR Controle (SC), (E e F) Wistar com Doença Periodontal (WDP), (G e H) SHR com Doença Periodontal (SDP). Contracoloração realizada com Hematxilina de Harry's. Magnificação original em A, C, F e G: 200x; B, D, F e H: 400x.

4.2 Taxa de proliferação de CTMs de ratos Wistar e SHR com ou sem de DP

Aos 3 (D3), 7 (D7), 10 (D10) e 14 (D14) dias de diferenciação, os osteoblastos de ratos SHR apresentaram menores taxas de proliferação celular do que ratos Wistar (Figura 10A e B). Foi observado um perfil distinto de proliferação celular na presença do meio osteogênico (MO), tanto em ratos Wistar quanto SHR com ou sem DP. A taxa de crescimento da cultura foi maior no grupo WDP do que no grupo WC aos 3, 10 e 14 dias ($p < 0,001$). Quando cultivadas com MO, foi observada uma diminuição significativa na proliferação celular no grupo WC nos dias 3 ($p < 0,01$) e 7 ($p < 0,001$) em relação ao meio de proliferação. No entanto, no dia 14, foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$) na proliferação celular. O grupo Wistar com DP com MO (WDP-MO) apresentou uma menor proliferação celular durante os primeiros dias em cultura no D3 e D7 ($p < 0,001$) em relação ao grupo WDP, mas superior no D10 e D14 ($p < 0,001$). A comparação apenas de osteoblastos mostrou que a maior capacidade proliferação celular foi observada em WDP-MO no D3 ($p < 0,05$), D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo WC-MO.

Considerando-se os grupos SHR, um aumento significativo na taxa de proliferação celular foi observado no D10 no grupo SDP quando comparado ao grupo SC ($p < 0,001$). A presença da condição osteogênica em SC-MO causou uma redução significativa da proliferação celular em todos os períodos experimentais avaliados: D3 ($p < 0,001$), D7 ($p < 0,001$), D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo SC. O grupo SDP-MO exibiu uma menor taxa de proliferação celular no D3 ($p < 0,001$) e D7 ($p < 0,001$), quando

comparado com o grupo SDP. A comparação apenas de osteoblastos mostrou uma maior proliferação celular no grupo SDP-MO no D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SC-MO.

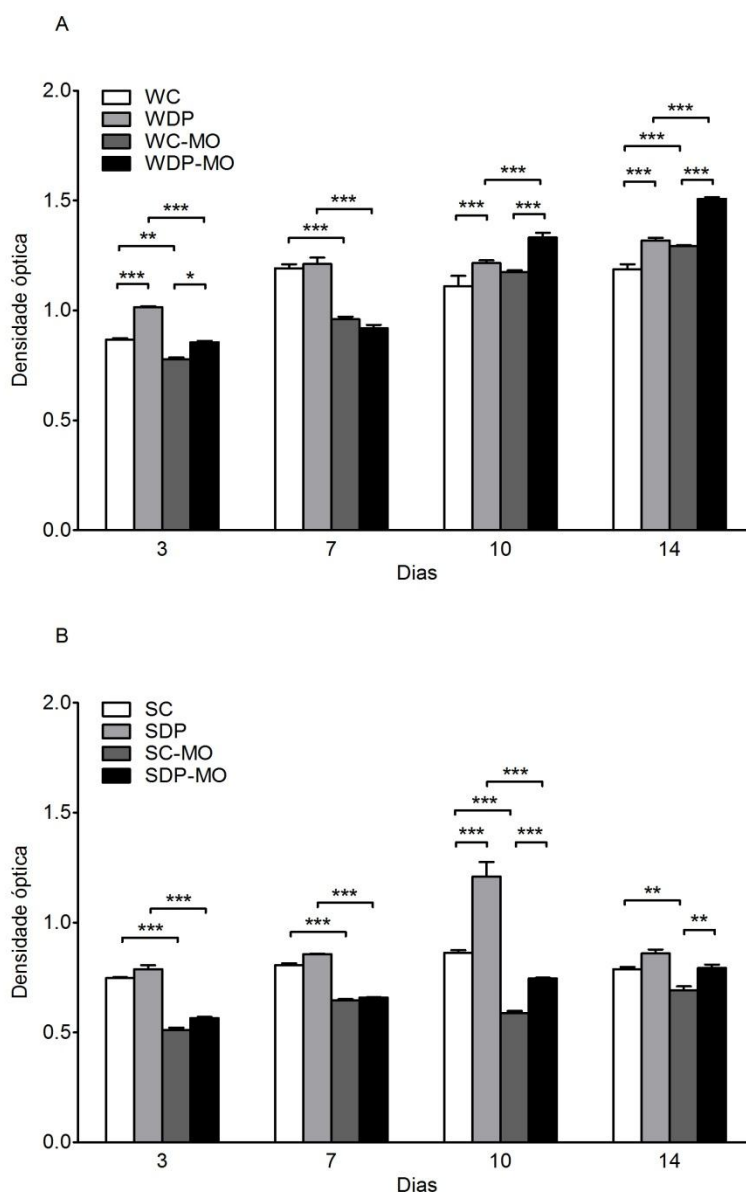


Figura 10 – Densidade óptica avaliada por espectrofotometria da atividade mitocondrial (absorbância em nanômetros) aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO). **Painel A:** Atividade mitocondrial das células dos animais nos grupos Wistar Controle com MEM (WC), Wistar com Doença Periodontal com MEM (WDP), Wistar Controle com MO (WC-MO), Wistar com Doença Periodontal com MO (WDP-MO). **Painel B:** Atividade mitocondrial das células dos animais nos grupos SHR Controle com MEM (SC) e SHR com Doença Periodontal com MEM (SDP). SHR Controle com MO (SC-MO) e SHR com Doença Periodontal com MO (SDP-MO). As barras representam a média \pm EPM. As barras representam a média \pm EPM. Todos os dados foram comparados por ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de múltipla comparação * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ = estatisticamente significativo.

4.3 Conteúdo de Proteína Total de CTMs de ratos Wistar e SHR com ou sem DP

A avaliação quanto ao conteúdo de proteína total mostrou um aumento progressivo com um padrão tempo-dependente em células derivadas de ratos Wistar. A quantificação proteica de células de ratos SHR mostrou um aumento inicial no sétimo dia e logo adquiriu um ligeiro aumento. Um distinto conteúdo de proteína de osteoblastos foi observado em ambas às células derivadas da linhagem Wistar e SHR com DP (Figura 11A e B). Por outro lado, não foram observadas diferenças na quantificação proteica entre os grupos WC e WDP nos períodos experimentais testados. A presença de meio osteogênico causou um aumento significativo nos níveis de proteína no D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,001$) no grupo WC-MO quando comparados com WC. Da mesma forma, o grupo WDP-MO exibiu um aumento da taxa de proteína no D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,001$) em comparação ao grupo WDP.

A comparação apenas com osteoblastos mostrou que o grupo WDP-MO apresentou valores de proteína inferiores ao grupo WC-MO ($p < 0,05$). Nos grupos derivados de animais SHR, um aumento significativo no D10 no grupo SDP quando comparado ao grupo SC ($p < 0,001$) foi observado, seguido por um pequeno decréscimo no D14 ($p < 0,05$). O grupo SC-MO apresentou um aumento significativo na quantidade de proteína no D7 ($p < 0,001$) e uma diminuição no D10 ($p < 0,05$) quando comparado o grupo SC. O grupo SDP-MO exibiu maior produção de proteína no D7 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,001$), mas inferior ao D10 ($p < 0,01$) em relação ao grupo WPD. Em comparação com o grupo SC-MO, uma diminuição significativa no conteúdo de proteína total no

grupo SDP-MO em D7 ($p < 0,05$) foi observado, seguido por um aumento no D10 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,01$).

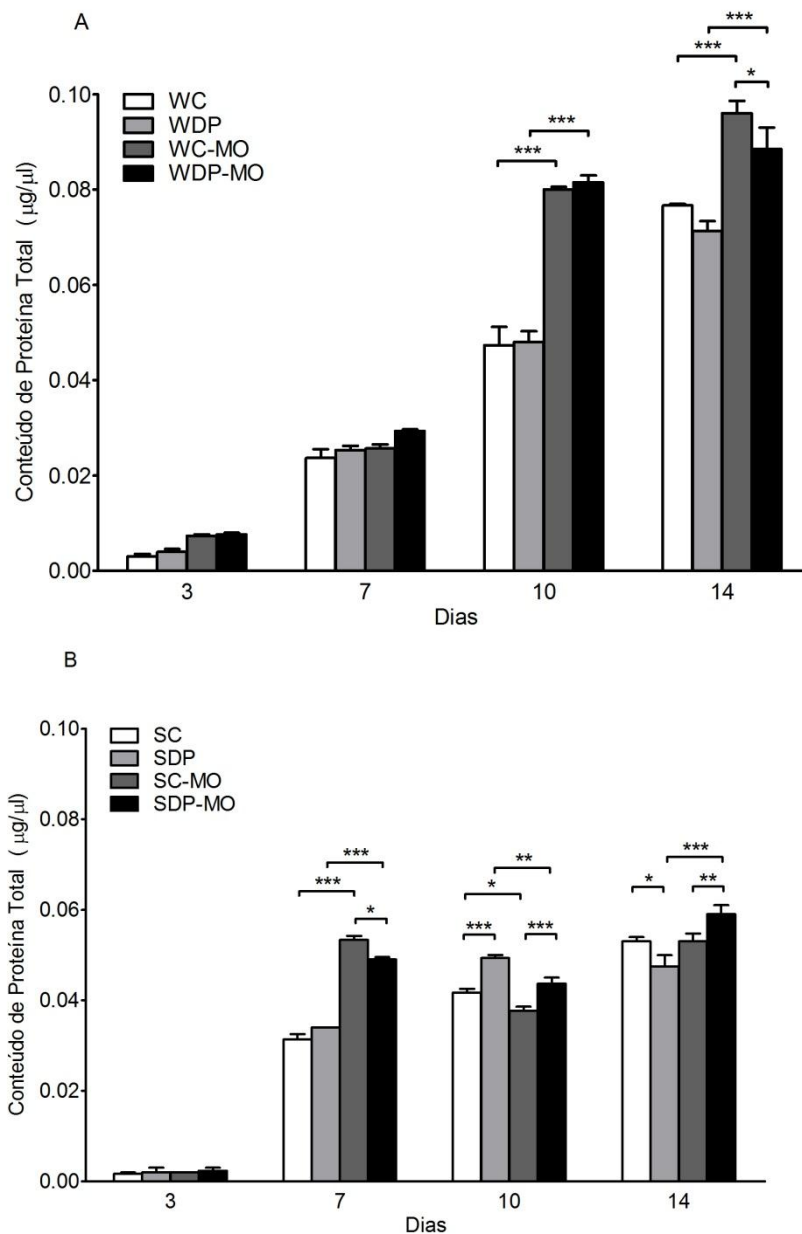


Figura 11 – Conteúdo de Proteína Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) das células dos animais Wistar e SHR com ou sem doença periodontal aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO). **Painel A:** Conteúdo de proteína total das células dos animais nos grupos Wistar Controle com MEM (WC), Wistar com Doença Periodontal com MEM (WDP), Wistar Controle com MO (WC-MO), Wistar com Doença Periodontal com MO (WDP-MO). **Painel B:** Conteúdo de proteína total das células dos animais nos grupos SHR Controle com MEM (SC) e SHR com Doença Periodontal com MEM (SDP). SHR Controle com MO (SC-MO) e SHR com Doença Periodontal com MO (SDP-MO). As barras representam a média \pm EPM. Todos os dados foram comparados por ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de múltipla comparação * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ = estatisticamente significativo.

4.4 Atividade da FAL de CTMs de ratos Wistar e SHR com ou sem DP

A atividade específica da enzima FAL mostrou diferenças entre as células obtidas das linhagens Wistar e SHR. O pico de atividade da enzima para as células de ratos Wistar ocorreu no D7, enquanto que as células SHR apresentaram um ligeiro aumento em todos os períodos experimentais (Figura 12A e B). A atividade de FAL foi menor nas culturas do grupo WDP em relação ao grupo WC no D3 ($p < 0,01$) e D7 ($p < 0,001$). A condição osteogênica provocou um aumento significativo da atividade de FAL no grupo WC-MO no D7 ($p < 0,001$) e D14 dias ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo WC. O mesmo foi observado para o grupo WDP-MO em comparação com o grupo WPD no D7 ($p < 0,001$). A comparação apenas de osteoblastos mostrou que uma menor atividade de FAL foi observada no grupo WDP-MO no D7 ($p < 0,001$) e D14 ($p < 0,05$) em comparação com o grupo WC-MO. Nas células de grupos derivados de animais SHR, foi observada uma diminuição significativa da atividade de FAL no grupo SPD no D10 e D14 ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo SC. A presença da condição osteogênica no grupo SC-MO causou um aumento significativo na atividade de FAL no D7, D10 e D14 ($p < 0,001$) quando comparados com o grupo SC. O grupo SDP-MO exibiu uma atividade de FAL maior durante D7, D10 e D14 ($p < 0,001$) em relação ao grupo SDP. Foi observada uma menor atividade de FAL no grupo SDP-MO durante o D10 e D14 ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SC-MO.

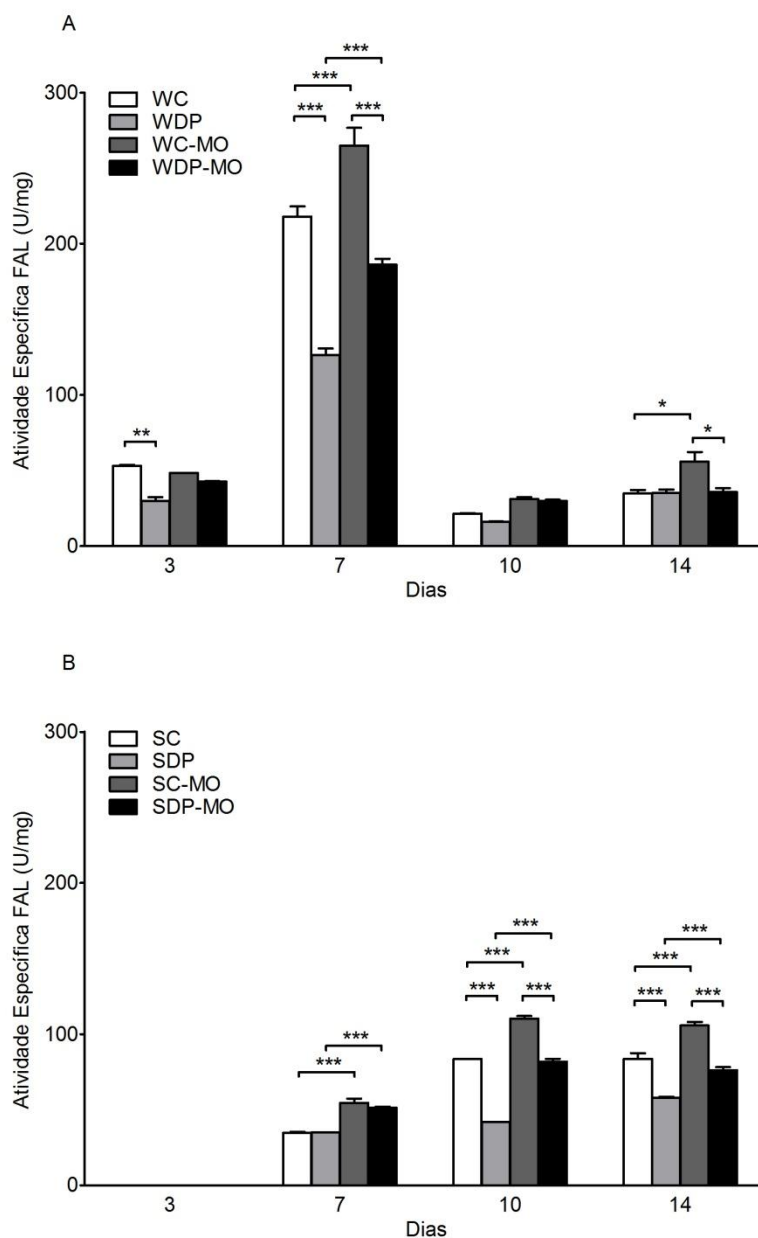


Figura 12 – Atividade específica da enzima FAL (U/mg) das células dos animais Wistar e SHR com ou sem doença periodontal aos 3, 7, 10 e 14 dias de cultura de CTMs com meio de proliferação (MEM) e após a diferenciação osteogênica com meio osteogênico (MO). A atividade específica foi normalizada pelo conteúdo de proteína total. **Painel A:** Atividade específica da FAL das células dos animais nos grupos Wistar Controle com MEM (WC), Wistar com Doença Periodontal com MEM (WDP), Wistar Controle com MO (WC-MO), Wistar com Doença Periodontal com MO (WDP-MO). **Painel B:** Atividade específica da FAL das células dos animais nos grupos SHR Controle com MEM (SC) e SHR com Doença Periodontal com MEM (SDP). SHR Controle com MO (SC-MO) e SHR com Doença Periodontal com MO (SDP-MO). As barras representam a média \pm EPM. As barras representam a média \pm SEM. Todos os dados foram comparados por ANOVA com correção de Bonferroni através de teste de múltipla comparação * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ = estatisticamente significativo.

4.5 Mineralização in vitro

A formação de nódulos com depósitos Alizarina-positivos foi encontrada na observação das placas com o auxílio do microscópio. Nódulos mineralizados foram observados apenas em células cultivadas em meio osteogênico. A marcação por Alizarina resultou em diferenças acentuadas entre culturas Wistar e SHR aos 17 dias. Por outro lado, os osteoblastos derivados de animais com doença periodontal não mostraram diferenças na mineralização da matriz (Figura 13).

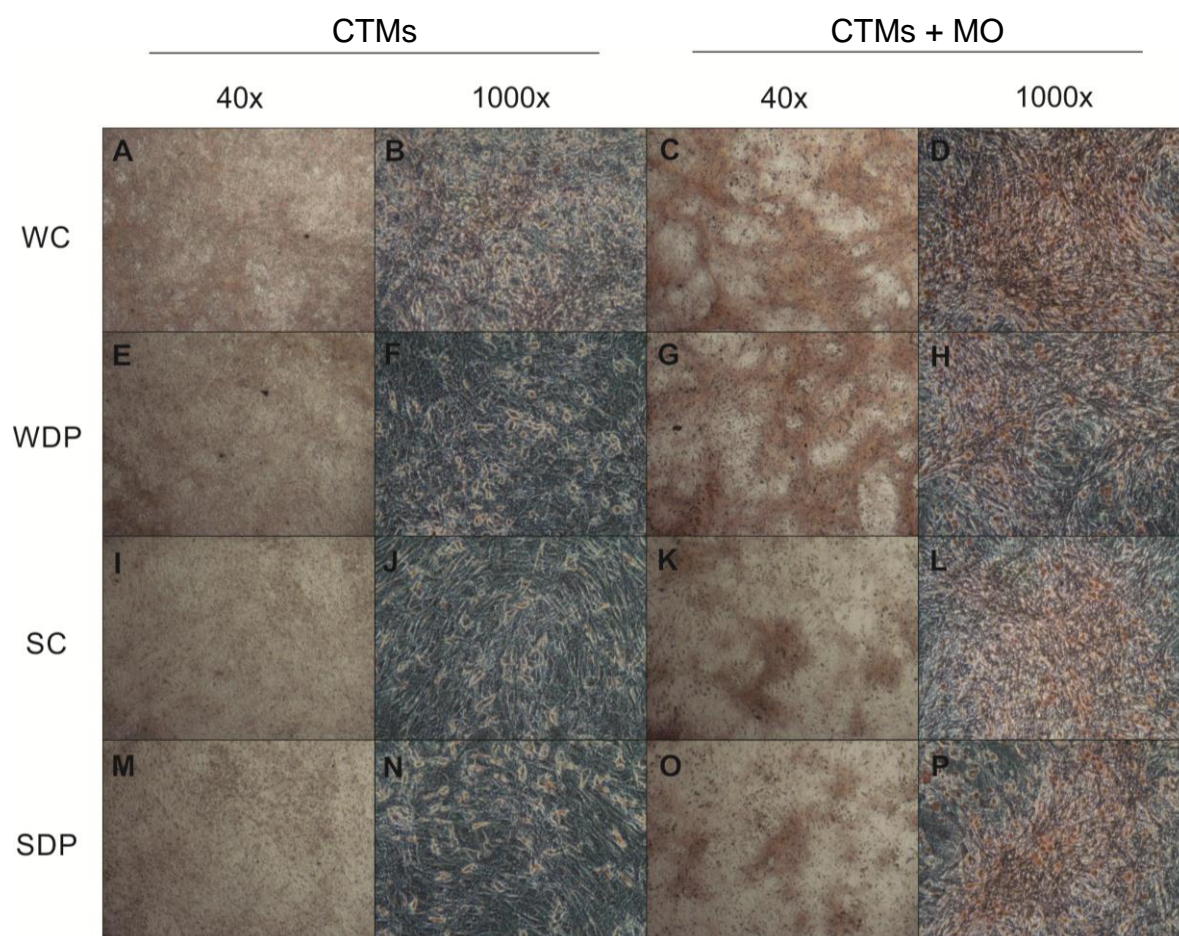


Figura 13 - Fotomicrografia do ensaio de mineralização in vitro das células de animais Wistar e SHR com ou sem doença periodontal cultivadas em meio de proliferação (MEM) ou meio osteogênico (MO). (**A e B**) Wistar Controle em MEM; (**C e D**) Wistar Controle em MO; (**E e F**) Wistar com Doença Periodontal em MEM; (**G e H**) Wistar com Doença Periodontal em MO; (**I e J**) SHR Controle em MEM; (**K e L**) SHR Controle em MO; (**M e N**) SHR com Doença Periodontal em MEM; (**O e P**) SHR com Doença Periodontal em MO. Coloração realizada com Alizarina vermelha S. Magnificação original em **A, C, E, G, I, K, M e O**: 40x, **B, D, F, H, J, L, N, P**: 1000x.

DISCUSSÃO

5 Discussão

Nossos resultados demonstraram que o DP promove respostas diferentes no osso alveolar de ratos Wistar e SHR. Além disso, as CTMs derivadas de animais SHR diferenciadas em osteoblastos apresentaram menor taxa de proliferação celular, conteúdo de proteína total e atividade específica da FAL do que as células da linhagem Wistar. Adicionalmente, os osteoblastos de animais com periodontite experimentalmente induzida em ambas as linhagens foram capazes de aumentar a taxa de proliferação, teor de proteína e reduzir a atividade de ALP, sugerindo que a inflamação crônica é capaz de mudar o fenótipo dos osteoblastos independente da pressão arterial.

O equilíbrio correto de expressão OPG-RANKL é um importante indicador da integridade óssea. OPG é uma molécula solúvel circulante produzida por osteoblastos e inibe a ativação de osteoclastos por meio da ligação a RANKL (48, 49). Os nossos dados indicam que a expressão de RANKL é fraca em ambas as linhagens Wistar e SHR, e há um aumento estatisticamente significativo na expressão de RANKL e OPG em animais SHR quando os mesmos se encontram com DP. TNF- α e IL-6 são citocinas que ativam as vias catabólicas da reabsorção óssea (50). Durante DP há uma grande variedade de citocinas e quimiocinas que são liberadas durante o desenvolvimento da doença, talvez favorecendo o osteoblasto e/ou ativação dos osteoclastos, que pode ser dependente da quantidade de OPG e/ou ligação RANKL-RANK. Além disso, o nível de OPG melhor observado em nossos resultados pode ser devido a uma resposta compensatória ao aumento da atividade dos osteoclastos ou ao equilíbrio negativo da remodelação em

algumas condições sistêmicas, principalmente notado no modelo SHR. Estes mecanismos compensatórios têm sido observados em outras condições sistêmicas, como diabetes e excesso de glicocorticoides (51).

A função fisiológica precisa da enzima BALP é ainda desconhecida, mas ela desempenha um papel importante na formação da matriz orgânica e mineralização óssea. A atividade de BALP é dependente da correta ligação de íons cálcio obtida pela atividade OC. A OC é ativa na organização da matriz extracelular envolvida no processo de mineralização do osteóide (52). Até o presente momento não existem relatos na literatura sobre a expressão de BALP e OC em níveis constitutivos ou durante a DP experimentalmente induzida. Nossos dados indicam que os animais SHR têm alta imunomarcagem para BALP e esta situação pode levar a alterações da histologia óssea. Além disso, nossos resultados mostraram uma tendência ao aumento da expressão BALP na presença de DP. Os resultados do presente estudo demonstram que ambas as linhagens de ratos Wistar e SHR têm níveis reduzidos de expressão de OC no tecido periodontal em condições normais. Nosso estudo também mostrou que há um aumento na expressão de OC após a DP experimentalmente induzida. Em conjunto, estes dados reforçam a ideia do mecanismo compensatório que está ocorrendo após a DP, principalmente em animais SHR.

MMP-2 desempenha um papel na reabsorção da matriz extracelular e osso desmineralizado orgânico (53). MMP-9 é expressa especificamente nas linhagens de células ósseas, e degrada o colágeno formado e proteínas relacionadas à matriz óssea (54). Nossos resultados demonstram que a MMP-2 é fracamente marcada nos grupos Controle Wistar e SHR controle. No entanto,

um ligeiro aumento na expressão foi observado apenas no grupo WDP. Este padrão diferente pode ser dirigido ao aumento do remodelamento ósseo observado em animais SHR (23, 55), que é um indicativo de alta atividade dos osteoblastos na produção e mineralização da matriz óssea orgânica. Nos nossos achados, a expressão de MMP-9 no grupo SC é menor do que em WC, mas na presença de DP a maior expressão de MMP-9 foi encontrada em animais SHR. Estes dados sugerem que a maior produção de MMP-9 favorece o aumento da reabsorção óssea observada nos animais SHR com DP.

O remodelamento do periodonto pode ser avaliado pela atividade enzimática de células formadoras de osso ou de reabsorção óssea, tais como FAL e TRAP, respectivamente. Alguns estudos experimentais têm mostrado que os animais SHR apresentam elevada perda de osso alveolar após periodontite experimentalmente induzida por ligadura (17, 56, 57). Nossos resultados corroboram com essas observações, e apontam para um novo conhecimento sobre a fragilidade óssea alveolar em estado de hipertensão, que pode ser dirigido ao elevado número de osteoclastos, mesmo sem DP ($p < 0,01$). Embora tenha sido observado um aumento significativo no número de células TRAP-positivas em decorrência da DP experimental para ambas as linhagens ($p < 0,001$), o grupo SDP exibiu maior número de osteoclastos do que o grupo WDP ($p < 0,05$). A ativação de osteoclastos durante o colapso periodontal pode ainda contribuir para a dissolução de fibras do ligamento periodontal e reabsorção óssea durante a DP. No entanto, não há relatos na literatura que relacionam o fenótipo osteoblástico de CTMs de animais Wistar e SHR frente a reabsorção óssea causada por uma inflamação crônica como DP.

SHR é um modelo animal de hipertensão genética que pode apresentar sintomas de osteoporose devido a vários mecanismos sistêmicos. Estudos anteriores demonstraram que o conteúdo mineral do íon cálcio no osso não foi diferente entre animais SHR e normotensos (58). No entanto, os animais SHR apresentaram volume trabecular ósseo diminuído, aumento do remodelamento ósseo (23, 55) e maior número de osteoclastos (25, 59). Um dos objetivos do presente estudo pode sugerir, em certa medida, que a perda de massa óssea observada na osteoporose pode ser dirigida pela menor taxa de proliferação dos osteoblastos. Estas alterações poderiam ser o resultado de diferenças na programação destas células que ocorrem ao longo do curso da doença (60). A evidência para a senescência de células progenitoras endoteliais em ratos hipertensos experimentais e em pacientes com hipertensão essencial sugere que o mesmo pode ocorrer com células progenitoras derivadas de outros tecidos, tais como medula óssea (61). Isso explicaria a sua menor capacidade proliferativa em comparação com as células progenitoras obtidas dos animais normotensos. Além disso, até o presente momento, não há evidência de alterações na atividade dos osteoblastos devido à presença de inflamação crônica. Nós especulamos que um dos possíveis mecanismos envolvidos com o aumento da perda de massa óssea pode ser a menor taxa de proliferação celular de osteoblastos derivados das CTMs dos ratos SHR em comparação com os ratos Wistar. No intuito de esclarecer isto, as CTMs de ratos Wistar e SHR foram cultivadas *in vitro* sob condições apropriadas de diferenciação osteogênica, permitindo a comparação da sua taxa de proliferação celular. Este manuscrito traz a primeira evidência científica de que a taxa de proliferação celular dos osteoblastos derivados de ratos hipertensos adultos são menores

do que a observada em ratos normotensos. Adicionalmente, os osteoblastos de animais com a DP demonstraram aumento da taxa de proliferação celular em ambas as linhagens em comparação com seus respectivamente grupos sem DP. Em estudos *in vivo* foi identificado um aumento do remodelamento ósseo em animais SHR, provavelmente associado a altos níveis do hormônio da paratireoide (PTH) em um estado hiperparatireoideo observado em animais SHR (62-64). Por outro lado, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são mais conhecidas por seu papel destrutivo em fraturas ou osso lesionado. Células osteoprogenitoras no sítio da fratura expressam proteínas morfogenéticas ósseas (65, 66), que guiam CTMs para proliferarem e se diferenciarem (67, 68). Além disso, o TNF- α , IL-12 e interferon- γ (IFN- γ) (69, 70) e IL-1, IL-6, IL-11 (71) estão aumentados no local da fratura, podendo contribuir para modificações no fenótipo celular. No entanto, não existem estudos que identificaram a influência de fatores ambientais e programação epigenética diretamente na expressão gênica de osteoblastos e seu respectivo fenótipo em modelos hipertensos e a possível interferência de um estado inflamatório.

Numerosas vias de sinalização e fatores de transcrição estão envolvidos na diferenciação osteogênica (72). O fator de transcrição relacionado à Runt-2 (Runx-2) é um importante regulador do fenótipo osteogênico via osteocalcina (OC) e a regulação epigenética também é crucial para a atividade de Runx-2 (73-75). Nossos dados indicam que os osteoblastos derivados de CTMs de linhagens que apresentavam DP experimentalmente induzida previamente proliferaram mais do que as células obtidas para o seu grupo controle. Este pode ser um indicativo de que a produção de mediadores locais e sistêmicos,

que ocorre durante o estabelecimento DP crônica, pode alterar a conformação genética das células que ainda estão em um estágio indiferenciado.

A qualidade do osso é muito importante na substituição óssea e nas terapias regenerativas, uma vez que o fator determinante é a força que incide sobre o tecido ósseo (76). A matriz do osso é composta por uma fase orgânica que consiste principalmente em colagénio do tipo I, que proporciona a resistência, e uma fase inorgânica, que constitui a deposição de íons cálcio que conferem a rigidez ao osso (77, 78). O nosso estudo mostrou que a quantidade de proteína total produzida por osteoblastos derivados de diferentes modelos seguem o que acontece na taxa de proliferação celular. Isto está de acordo com o que é observado por Coelho (79), que é uma demonstração de que as importantes alterações morfológicas ocorrem no citoesqueleto e o comportamento celular durante a fase de diferenciação (80). Pode ser sugerido que a maior produção de proteína ocorre devido a uma maior taxa de proliferação celular e conseqüente produção de matriz extracelular. O aumento da taxa de proliferação celular é seguido por um aumento do conteúdo de proteína total, sugerindo uma melhoria no metabolismo ósseo total. Isso explicaria porque a gravidade da DP é aumentada em SHR e também ilustra o fato de que a DP evoca uma resposta compensatória, evidenciada pelo aumento do metabolismo de células derivadas desta condição patológica sistêmica. Em células de ratos Wistar, o aumento na produção da proteína ocorre de forma tempo-dependente, o que, por sua vez, não é observada em células de animais SHR. Podemos especular que este resultado talvez seja devido a um possível estágio de desenvolvimento dos osteoblastos de animais SHR.

A deposição mineral de osteoblastos in vitro inicia após hidrólise do β -GP pela FAL em fosfato de cálcio, que proporciona as condições químicas para que ocorra a mineralização biológica (81-83). Os resultados apresentados sobre a atividade de ALP apresentaram níveis diminuídos em osteoblastos derivados de animais SHR em comparação com ratos Wistar. Como observado anteriormente na literatura, sob condições ambientais osteogênicas adequadas, o pico da atividade específica desta enzima ocorre no 7º dia (36, 79, 84, 85). No entanto, este estudo mostrou ainda que o nível de FAL dos osteoblastos derivados de CTMs de animais SHR esteve crescente durante 3 e 7 dias, e mostrou poucas mudanças após o 10º dia. Este resultado sugere que não só a produção de matriz orgânica é prejudicada em osteoblastos derivados de CTMs obtidos a partir de animais SHR, mas também a produção de matriz. Mais uma vez, pode-se especular que a menor atividade de FAL e taxa de mineralização de matriz estariam associadas com a maior perda óssea ou maior fragilidade para formação óssea, principalmente pela menor diminuição de íons fosfatos, observada em animais SHR quando comparados com ratos Wistar. Considerando-se que a fosfatase alcalina é uma enzima presente principalmente nas fases finais da cicatrização periodontal, não se espera encontrar a sua atividade acentuada durante as fases iniciais da doença periodontal.

Entender os fatores que regulam o crescimento ósseo, o remodelamento do osso contínuo ao longo da vida e a regeneração do tecido lesado são questões biológicas básicas e preocupações clínicas atuais para o tratamento de doenças ósseas (36). Compreender o comportamento exclusivo dos osteoblastos com base nas condições sistêmicas distintas, tais como

hipertensão pode ajudar ainda mais o clínico para projetar terapias mais corretamente.

Além disso, os resultados do presente estudo indicam que, no modelo animal de hipertensão, modificações celulares intrínsecas ocorrem em células que não estão diretamente relacionadas com a doença cardiovascular. Isto ainda é importante para que seja possível identificar em que fase do desenvolvimento osteoblástico estas alterações aparecem e se podem ser revertidas. Para isso, tornam-se necessários mais estudos com modelos animais SHR de diferentes idades submetidos a terapias anti-hipertensivos diferentes avaliando o mecanismo pelo qual essas alterações acontecem principalmente a nível molecular.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

Tomados em conjunto, os nossos resultados indicam que a hipertensão essencial em ratos e a DP promovem aumento do remodelamento ósseo por meio de mudanças no fenótipo osteoblástico *in vivo*. No entanto, a hipertensão tende a diminuir a taxa de proliferação de osteoblastos, produção de matriz orgânica e atividade de FAL *in vitro*, enquanto a DP tende a aumentá-los.

REFERÊNCIAS

7 Referências Bibliográficas

1. Yuan H, Gupte R, Zelkha S, Amar S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2011;38(11):1029-36.
2. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontology* 2000.58(1):10-25.
3. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 1997;14:112-43.
4. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997;14:216-48.
5. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;53:55-69.
6. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000. 1997;14:33-53.
7. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):108-20.
8. Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol* 2000. 2001;25:21-36.
9. Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke GW, Tzakis AG, Ricordi C, et al. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. *Hum Immunol*. 2004;65(2):93-103.
10. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
11. Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):163-202.
12. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1994;9(8):1137-41.
13. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(2 Suppl):S3-11.
14. Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG, et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol*. 1996;67(10 Suppl):1076-84.
15. Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(3):349-56.
16. Armitage GC. Periodontal infections and cardiovascular disease--how strong is the association? *Oral Dis*. 2000;6(6):335-50.
17. Leite CL, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2005;27(6):523-31.
18. Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis. *Sci Prog*. 1995;78 (Pt 1):19-34.
19. Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. *J Periodontol*. 2005;76(11 Suppl):2033-41.
20. Castelli WA, Diaz-Perez R, Nasjleti CE, Caffesse RG. Effect of renovascular hypertension on the morphology of oral blood vessels. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;46(4):576-82.
21. Beck JD, Pankow J, Tyroler HA, Offenbacher S. Dental infections and atherosclerosis. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S528-33.

22. Metz JA, Karanja N, Young EW, Morris CD, McCarron DA. Bone mineral density in spontaneous hypertension: differential effects of dietary calcium and sodium. *Am J Med Sci.* 1990;300(4):225-30.
23. Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner.* 1993;20(3):251-64.
24. OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963;27:282-93.
25. Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(6):605-7.
26. Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TE, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol.* 2010;81(7):1075-83.
27. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-40.
28. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells.* 2001;19(3):219-25.
29. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98(8):2396-402.
30. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988;254(2):317-30.
31. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988;106(6):2139-51.
32. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J.* 1990;4(13):3111-23.
33. Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res.* 1997;15(4):546-57.
34. Caverzasio J, Bonjour JP. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism. *Kidney Int.* 1996;49(4):975-80.
35. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.* 2005;70:301-39.
36. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J.* 1995;15:118-40.
37. Fujisawa R, Nodasaka Y, Kuboki Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcif Tissue Int.* 1995;56(2):140-4.
38. Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(1):79-98.
39. Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducey P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone.* 1998;23(3):187-96.
40. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281-90.
41. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42(4):606-15.
42. Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):106-11.
43. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143(1):31-48.

44. Irie K, Ejiri S, Sakakura Y, Shibui T, Yajima T. Matrix mineralization as a trigger for osteocyte maturation. *J Histochem Cytochem.* 2008;56(6):561-7.
45. DeMoss DL, Wright GL. Sex and strain differences in whole skeletal development in the rat. *Calcif Tissue Int.* 1998;62(2):153-7.
46. Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism.* 2000;49(9):1130-3.
47. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
48. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 1998;76(6):899-910.
49. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* 2000;157(2):435-48.
50. Gunson MJ, Arnett GW, Milam SB. Pathophysiology and pharmacologic control of osseous mandibular condylar resorption. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(8):1918-34.
51. Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Müller F, Frøland SS, Aukrust P. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess--possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol.* 2001;145(6):685-90.
52. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):97-122.
53. Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, da Silva Paiva KB, Pereira Lauris JR, Cestari TM, Taga R, et al. Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. *J Mol Histol.* 2005;36(4):311-6.
54. Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol.* 1994;124(6):1091-102.
55. Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, Barbagallo CM, Boiardi L, Passeri G, et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience.* 1991;2(1):15-7.
56. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977;43(5):707-19.
57. Bonato CF, do-Amaral CCF, Belini L, Salzedas LMP, Oliveira SHP. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *Journal of Periodontal Research.* 2012;47(6):783-92.
58. Bindels RJ, van den Broek LA, Jongen MJ, Hackeng WH, Löwik CW, van Os CH. Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflugers Arch.* 1987;408(4):395-400.
59. Merke J, Lucas PA, Szabo A, Cournot-Witmer G, Mall G, Bouillon R, et al. Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1989;13(3):233-42.
60. Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee WS. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec.* 1997;249(2):173-80.
61. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2005;28(9):763-72.
62. Wright GL, DeMoss DL, Geng W. Analysis of skeletal development on the basis of body mass and bone resorption. *Life Sci.* 2000;67(12):1397-407.
63. Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol.* 1982;243(3):H365-70.
64. McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1981;3(3 Pt 2):1162-7.

65. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):513-20.
66. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1585-90.
67. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res.* 1999;14(11):1805-15.
68. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury.* 2005;36(12):1392-404.
69. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-84.
70. Rundle CH, Wang H, Yu H, Chadwick RB, Davis EI, Wergedal JE, et al. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone.* 2006;38(4):521-9.
71. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179-86.
72. Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci.* 2008;13:2001-21.
73. Villagra A, Gutiérrez J, Paredes R, Sierra J, Puchi M, Imschenetzky M, et al. Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone-specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2002;85(1):112-22.
74. Thomas D, Kansara M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. *J Cell Biochem.* 2006;98(4):757-69.
75. Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, et al. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int.* 2011;2011:201371.
76. Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S. Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation.* 2012;84(2):185-92.
77. Kihara T, Hirose M, Oshima A, Ohgushi H. Exogenous type I collagen facilitates osteogenic differentiation and acts as a substrate for mineralization of rat marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(4):1029-35.
78. Viguier-Carrin S, Garnerio P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):319-36.
79. Coelho MJ, Cabral AT, Fernande MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials.* 2000;21(11):1087-94.
80. IAP G. Cell biology at interfaces. *J Mat Sci Mat Med: Elsevier;* 1994. p. 357-60.
81. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner.* 1991;14(1):27-40.
82. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(4):305-11.
83. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Differential effects of fluoride during initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed in vitro. *J Bone Miner Res.* 1993;8(11):1357-63.

84. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14(4):424-42.

85. Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials.* 2000;21(11):1095-102.

**ANEXO A
(ARTIGO)**

Experimentally induced periodontitis changes osteoblast phenotype in normotensive and hypertensive rats

Caril Constante Ferreira do-Amaral¹, Antonio Hernandes Chaves-Neto, Thamine Landim de Barros¹, Victor Gustavo Balera Brito, Maria Helena Raposo Fernandes², Sandra Helena Penha Oliveira^{1*}.

¹ The Multicentric Graduate Studies Program in Physiological Sciences – SBFis, Dept. of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, SP, Brazil.

² Laboratory for Bone Metabolism and Regeneration, Faculty of Dental Medicine, University of Porto (FMDUP), Porto, Portugal.

* Corresponding author: Sandra Helena Penha Oliveira. Dept. of Basic Sciences, School of Dentistry of Araçatuba, Univ Estadual Paulista-UNESP, Rodovia Marechal Rondon km 527/528 - CEP: 16018-850 - Araçatuba, SP, Brazil; Tel: +55-18-3636-28146/ Fax: +55-18-3636-3332; e-mail: shpoliv@foa.unesp.br

Running title:

Periodontitis changes osteoblast phenotype in rats.

Abstract

This study aimed to evaluate the effect of experimentally induced periodontitis in the mechanisms involved in osteoblastic activity and bone matrix mineralization from femoral bone marrow-derived stem cells in normotensive and hypertensive rats. Wistar and SHR rats (180–220 g) were divided into 2 groups each: Wistar control [WC] and SHR control [SC], and Wistar with PD [WPD] and SHR with PD [SPD] groups. Immunohistochemical analysis of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) of the furcation region were assessed 15 days after PD. Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were collected and assessed for osteogenic differentiation. Proliferation rate, total protein content, and ALP activity were analyzed at 3, 7, 10, and 14 days. Mineralization of matrix was analyzed at 17 days. RANKL was weakly expressed in both strains, but was moderately expressed in SPD animals. OPG was moderately expressed in animals without PD, but strongly expressed in those with PD. The expression of BALP was higher in SPD than in WPD animals. Immunolabeling for OC was absent or weak in both strains and exhibited a tendency to increase in the presence of PD. MMP-2 expression was absent or weak in animals without PD, but it increased slightly in WPD animals. MMP-9 was moderately expressed in animals without PD, but strongly expressed after PD, especially in the SPD group. The numbers of TRAP-positive cells observed in the WC, SC, WPD, and SPD groups were 16.25 ± 6.24 , 48 ± 9.83 , 69.25 ± 6.75 , and 95 ± 13.34 ,

respectively. Proliferation rate, total protein content, ALP activity, and bone-like nodule formation were increased in osteoblasts from Wistar rats compared with those from SHR. Inflammatory conditions increased proliferation rate and total protein content, but decreased ALP activity in both strains. SHR tended to exhibit a lower osteoblast proliferation rate, and organic and mineral matrix production than Wistar rats. The presence of PD tended to increase proliferation rate and total protein content but decrease ALP activity in both strains.

1. Introduction

Periodontal disease (PD) is a chronic inflammation of periodontal tissues frequently associated with progressive alveolar bone loss [1]. The severity of the ensuing periodontal tissue destruction is dependent upon dynamic interactions between the microbial challenge and the host immune-inflammatory response [2-4]. Concurrently, periodontitis may also be influenced by a series of risk factors, including systemic conditions such as diabetes, immunodeficiency diseases, stress, hypertension, and osteoporosis [5-10].

Osteoporosis is characterized by a skeletal disorder presenting reduced bone mass and compromised bone strength, which leads to bone fragility, increased risk of fracture, reduced bone repair, and often, bone loss [11, 12]. Some clinical studies have identified a relationship between periodontitis and osteoporosis [13-16]. The mechanisms underlying these associations remain elusive. However, there may be an accentuation of the periodontitis condition in patients with osteoporosis.

Different clinical and experimental studies have shown that human subjects with hypertension and spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit significant changes in bone metabolism, such as increased bone turnover and reduction in cortical and trabecular bone [17-19]. The subjacent mechanisms involved in bone disorders are still unclear. Moreover, morphological differences in bone histology [20] and susceptibility to fracture [21] may lead to more aggressive bone loss in clinical or experimentally-induced periodontitis [22, 23].

Biochemical markers of bone turnover are broadly divided into 2 categories: markers of bone resorption, and markers of bone formation. The most sensitive

and specific markers of bone formation include serum bone alkaline phosphatase (BALP) and total osteocalcin (OC).

Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into several cell types, such as osteoblasts, thereby providing important data regarding the behavior of these isolated cells and their metabolism. Osteogenic differentiation *in vitro* has been characterized by the expression of the osteoblastic phenotype, can be divided into 3 distinct phases: proliferation, extracellular matrix maturation, and mineralization [24-26], and holds promise for applications in bone regeneration and tissue engineering. Data obtained from literature indicate alterations in skeletal development in SHR rats [27, 28]. However, there are no reports about the osteoblastic phenotype of MSCs obtained from this strain and the influence of previous chronic inflammatory conditions such as PD in osteogenic differentiation in these hypertensive models. In this context, the purpose of this study was to evaluate the effect of experimentally induced periodontitis in the mechanisms involved in osteoblastic activity and bone matrix mineralization from femoral bone marrow-derived stem cells in normotensive and hypertensive rats. Our studies suggest that hypertension tends to diminish the osteoblast proliferation rate and organic matrix production, and PD tend to increase them.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and ethical aspects

Experiments were reviewed and approved by the Institutional Animal Welfare Committee at the School of Dentistry of Araçatuba (UNESP – Univ Estadual Paulista, SP, Brazil - Process # FOA-367/11). A total of 20 male Wistar rats and 20 male SHR were used, weighing between 180 and 220 g. Systolic blood pressure (SBP) was assessed by tail plethysmograph (Narco Bio-systems, Houston, TX, USA). Only SHR presenting SBP readings equal to or higher than 150 mmHg were chosen. These animals were kept in cages under constant and controlled room temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55\% \pm 3\%$) in a 12-hour light-dark cycle, and received water and standard food *ad libitum*.

2.2. Experimental periodontitis

First, the animals were divided into 4 groups of 10 animals each as follows: (1) Wistar Control (WC), (2) Wistar with PD (WPD), (3) SHR Control (SC), and (4) SHR with PD (SPD). The rats were anesthetized with 80 mg/mL of ketamine hydrochloride (Dopalen; Vetbrands, Paulinia, SP, Brazil) and 10 mg/mL of xylazine hydrochloride (Anasedan; Vetbrands). Both mandibular first molars of each animal received a silk (4-0) thread ligature in the cervical region surrounding the submarginal position. Fifteen days after ligature placement, the animals were euthanized by placing them in a glass jar, where they breathed a mixture of 2% halothane (Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brazil) in atmospheric air for 10 minutes. Femora and mandibles were obtained from these rats for histologic and cellular assays, respectively.

2.3. Histologic Analysis and Immunohistochemistry Quantification

The mandibles were removed and fixed in 4% neutral paraformaldehyde for 24 h. The specimens were washed and decalcified with a solution containing 10% ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) for 30 days. After this procedure, the mandibles were dehydrated and embedded in paraffin. Semiserial longitudinal 6- μ m thick sections were obtained and stained to determine the expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), BALP, OC, and type 2 and 9 matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) included goat monoclonal anti-RANKL (1:100), anti-OPG (1:50), anti-OC (1:100), anti-MMP-9 (1:50), and anti-TRAP (1:500), mouse monoclonal anti-MMP2 (1:250), and rabbit monoclonal anti-BALP (1:250). Biotinylated donkey anti-goat (1:500), anti-mouse (1:500), and anti-rabbit (1:500) antibodies were used as secondary antibodies (Jackson Immuno research Laboratories, West Grove, PA, USA). The avidin-biotin complex (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) was used to amplify the signal of the reaction developed with diaminobenzidine (Dako Corp.) as the chromogen. The procedure was completed by nuclear counterstaining using Harry's hematoxylin. All samples were accompanied by a negative control. Selected images were digitalized at high and low magnification using a light microscope (Stemi 2000-C; Carl Zeiss do Brasil Ltda.) coupled with a digital camera (Axio Cam MRc5; Carl Zeiss do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Background originating from digitalization, color balance, brightness, and contrast were corrected. For quantitative immunohistochemistry analysis, 6 sections were randomly selected

to examine the furcation between the inter-radicular mandibular first molar by one of the authors (CCFA). The total number of immunostained cells in this region was counted using a counter grid incorporated into the eyepiece of the microscope. Counting was performed with the 100× objective under a light microscope. In brief, the proportion of positive staining throughout the entire slide was assessed as 0, 1, 2, 3, or 4 corresponding to negative, weak, intermediate, strong or very strong immunoreactivity, respectively. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey post hoc test using a statistical program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences were considered significant at a p-value <5%.

2.4. Isolation, preparation, and culture of rat stem cells

Bone marrow was obtained from both femora, and flushed out using 20 mL of minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 1% antibiotics (100 U/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin and 0.3 µg/mL amphotericin B) (Sigma). The cell suspension was filtered through a 70-µm size cell strainer and through 22 and 26-gauge needles. After a quick centrifugation, the cell pellet was suspended in culture medium and then seeded in 75 cm² tissue culture flasks (Santa Cruz Biotechnology). The cells were grown in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. After 10 days, once confluent, the cells were harvested using trypsin-EDTA solution (Sigma). Nucleated cells were counted by means of a hemocytometer (Neubauer chamber) and then seeded for subculture at 5.0×10^5 cells/well in 24-well tissue culture plates (Santa Cruz Biotechnology).

2.5. Osteogenic differentiation

After 4 days, the cells were cultured in osteogenic medium containing MEM supplemented with 10 nM β -glycerophosphate (β -GP), 50 μ g/mL ascorbic acid and 10 nM dexamethasone (Sigma). After 3, 7, 10, and 14 days, cell viability was assessed by means of the conversion of [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) (Sigma) into formazan crystals. ALP activity and total protein content were assessed at 3, 7, 10, and 14 days and the production of mineralized nodules at 17 days.

2.6. MTT reduction assay.

Culture cell proliferation and viability of osteoblasts were measured at 3, 7, 10, and 14 days using the classical MTT method [29].

2.7. Total protein content

Total protein amount after 3, 7, 10, and 14 days was quantified using the Lowry [30] method.

2.8. ALP activity

ALP activity was assessed by means of the release of thymolphthalein from thymolphthalein monophosphate using a commercial kit (Labtest Diagnostica SA, Ribeirão Preto, SP, Brazil).

2.9. Bone-like nodule formation

Mineralization in osteoblast cultures was determined by staining of Alizarin Red S (Sigma) after 17 days in culture [31].

2.10. Statistical analysis

All data were displayed as means \pm standard error of mean (SEM), analyzed by 1- or 2-way ANOVA followed by Tukey or Bonferroni all pairs post-hoc method was used. GraphPad Prism 5 software was used for all statistical calculations, and significance was set at a p value of < 0.05 .

3. Results

3.1. Qualitative and Quantitative Immunohistochemical Analysis

The expression levels of the RANKL, OPG, BALP, OC, MMP-2, MMP-9, and TRAP proteins in groups WC, SC, WPD and SPD are presented in Figures 1 and 2. Immunohistochemical analysis showed that RANKL is weakly expressed in all groups (Figure 3A-D). A significant increase in RANKL expression occurred in SPD compared to SC animals ($p < 0.05$) (Figure 1A). The expression of OPG showed moderate immunomarcation in the WC and SC groups (Figure 3E-H). The presence of PD induced an increase in immunostaining for OPG in the SPD group when compared with the SC group ($p < 0.05$) (Figure 1B). SHR animals exhibited high expression of BALP before and after PD (Figure 3I-L). The expression of BALP was higher in SPD than in WPD animals ($p < 0.05$) (Figure 1C). Immunostaining was weak or absent for OC in the WC and SC groups (Figure 3M-P). A slight tendency towards increased OC immunomarcation occurred after PD in both strains, but it was not significant (Figure 1D). MMP2 expression was weak or absent in WC and SC (Fig 4A-D); a slight tendency towards increased expression was observed in the WPD group, but it was not significant (Figure 2A). Wistar and SHR animals presented weak to moderate expression of MMP9 without PD (Fig 5E-H).

However, after PD induction, a moderate to strong MMP9 expression pattern was observed, and statistical differences were seen between the WC and WPD ($p < 0.05$), SC and SPD ($p < 0.001$), and WPD and SPD groups ($p < 0.05$) (Figure 2B). The numbers of TRAP-positive cells observed in the WC, SC, WPD, and SPD groups were 16.25 ± 6.24 , 48 ± 9.83 , 69.25 ± 6.75 and 95 ± 13.34 , respectively. Higher numbers of TRAP-positive cells were observed in the SC than in the WC ($p < 0.01$), in the WPD than in the WC ($p < 0.001$), in the SPD than in the SC ($p < 0.001$), and in the SPD than in the WPD ($p < 0.05$) groups (Figures 2C and 4I-L).

3.2. Proliferative rate

At 3 (D3), 7 (D7), 10 (D10), and 14 (D14) days of differentiation, osteoblasts from SHR presented lower proliferative rates than those from Wistar rats (Figures 5A and B). A distinct cell proliferation profile was observed in the presence of osteogenic medium (OM) in both Wistar and SHR rats with or without PD. The culture growth rate was higher for WPD than WC cultures at 3, 10, and 14 days ($p < 0.001$). When cultured with OM, a significant decrease in cell proliferation at 3 ($p < 0.01$) and 7 ($p < 0.001$) days was observed for WC in comparison to proliferative medium. However, on day 14, a significant increase ($p < 0.001$) in cell proliferation was observed. WPD osteoblasts cultured in OM (WPD-OM) exhibited a lower capacity to convert MTT during early days in culture at D3 and D7 ($p < 0.001$), but were higher than WPD osteoblasts at D10 and D14 ($p < 0.001$). A higher capacity to convert MTT into formazan crystals was observed for WPD-OM at D3 ($p < 0.05$), D10 ($p < 0.001$), and D14 ($p < 0.001$) than for WC-OM.

With respect to the SHR groups, a significant increase in cell proliferation rate was observed at D10 in the SPD group compared to SC ($p < 0.001$). The presence of osteogenic conditions in the SC-OM group caused a significant decrease in cell proliferation in all experimental periods: D3 ($p < 0.001$), D7 ($p < 0.001$), D10 ($p < 0.001$), and D14 ($p < 0.01$), compared to the SC group. The SPD-OM group exhibited a lower capacity to convert MTT at D3 ($p < 0.001$) and D7 ($p < 0.001$) compared to SPD. With respect to the results obtained in osteogenic conditions, a higher capacity to convert MTT into formazan crystals was observed at D10 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.01$) for SPD-OM in comparison to SC-OM.

3.3. Total protein content

Total protein content showed a progressive increase in a time-dependent manner in Wistar rats. SHR showed an initial increase on day 7 and soon exhibited a slight improvement. Distinct total protein content was observed in the presence of osteogenic medium for both Wistar and SHR with PD (Figures 6A and B). On the other hand, no differences in total protein content were observed between WC and WPD in the experimental periods tested. The osteogenic condition caused a significant increase in protein levels at D10 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.001$) for WC-OM compared to WC. WPD-OM also exhibited a higher protein synthesis rate at D10 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.001$) in comparison to WPD.

Under osteogenic conditions, WPD-OM exhibited lower protein amounts than WC-OM ($p < 0.05$). In SHR groups, a significant increase at was observed at D10 in the SPD group compared to SC ($p < 0.001$) followed by a slight decrease at D14 ($p < 0.05$). The presence of osteogenic conditions in SC-OM

caused a significant increase in protein amounts at D7 ($p < 0.001$) and thus a decrease at D10 ($p < 0.05$), compared to SC. The SPD-OM group exhibited higher protein synthesis at D7 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.001$), but lower at D10 ($p < 0.01$) than WPD. In comparison to SC-OM, a significant decrease in total protein content in SPD-OM was observed at D7 ($p < 0.05$), followed by an increase at D10 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.01$).

3.4. ALP activity

ALP specific activity showed differences between Wistar and SHR strains. The enzyme activity peak for Wistar rat cells occurred at D7, while SHR cells exhibited a slight increase in all experimental periods (Figures 7A and B). ALP activity was lower for WPD than for WC cultures at D3 ($p < 0.01$) and D7 ($p < 0.001$). Osteogenic conditions caused a significant increase in ALP activity at D7 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.05$) in WC-OM compared with the WC group. The same was observed for WPD-OM in comparison to WPD at D7 ($p < 0.001$). Under osteogenic conditions, lower ALP activity was observed at D7 ($p < 0.001$) and D14 ($p < 0.05$) in WPD-OM in comparison to WC-OM. In the SHR groups, a significant decrease of ALP activity was observed at D10 and D14 ($p < 0.001$) for the SPD group compared to SC. The presence of osteogenic conditions in SC-OM caused a significant increase in ALP activity at D7, D10, and D14 ($p < 0.001$) compared to SC. The SPD-OM group exhibited higher ALP activity at D7, D10, and D14 ($p < 0.001$) than did the SPD group. Under osteogenic conditions, lower ALP activity was observed at D10 and D14 ($p < 0.001$) in SPD-OM than in SC-OM.

3.5. Mineralization *in vitro*

Nodule-like formation was found under microscopic observation. Mineralized nodules were observed only in cells cultured in osteogenic medium. Alizarin Red staining resulted in marked differences between Wistar and SHR cultures at 21 days. On the other hand, PD cells did not show differences in matrix mineralization (Figure 8).

4. Discussion

Our results demonstrate that PD evokes different responses in alveolar bone for SHR and Wistar rats. Moreover, MSCs differentiated into osteoblasts exhibited lower proliferation rate, protein content, and ALP activity when derived from SHR than from Wistar rats. Additionally, osteoblasts derived from animals with PD in both strains showed increased proliferation rate, protein content, and reduce ALP activity, suggesting that chronic inflammation was able to alter the osteoblast phenotype independent of blood pressure.

The correct balance of OPG-RANKL expression is an important indicator of bone integrity. OPG is a soluble circulating molecule produced by osteoblasts, and inhibits osteoclast activation by linking to RANKL [32, 33]. Our data indicate that the expression of RANKL is weak in both Wistar and SHR strains and a statistically significant increase in RANKL and OPG expression was observed in SHR animals with PD. Tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 are cytokines that activate the catabolic pathways of bone resorption [34]. During PD, a great variety of cytokines and chemokines are released during disease development, perhaps favoring osteoblast and/or osteoclast activation that may be dependent on the amount of OPG and/or RANKL-RANK ligation.

Furthermore, the enhanced OPG levels observed in our results may be a compensatory response mechanism to enhanced osteoclast activity or negative bone remodeling balance in some systemic conditions, mainly in the SHR model. These compensatory mechanisms have been observed in other systemic conditions such as diabetes and excess glucocorticoids [35, 36].

The precise physiological function of the BALP enzyme is yet unknown, but it plays an important role in bone matrix formation and bone mineralization. The activity of BALP is dependent on correct calcium binding obtained by OC activity. OC is active in the organization of extracellular matrix involved in the process of osteoid mineralization [37]. There are no reports in the literature about BALP and OC expression at constitutive levels or during experimental PD. Our data indicate that SHR animals exhibit high immunostaining for BALP and this situation may lead to alterations in bone histology. In addition, our results showed a tendency towards increased BALP expression in the presence of PD. The results of the present study demonstrate that both Wistar and SHR have weak levels of OC expression under normal conditions. Moreover, it was observed that the levels of OC increased in experimental PD. Taken together these data strengthen the idea that a compensatory mechanism occurs in PD, mainly in SHR animals.

MMP-2 plays a role in the resorption of the extracellular matrix and demineralized organic bone [38]. In addition, MMP-9 is specifically expressed in the lineages of bone cells, and degrades collagens and related proteins in the bone matrix [39]. Our results demonstrate that MMP-2 is weakly expressed in the Wistar and SHR control groups. However, a slight increase was observed in the WDP group. This different pattern could be attributed to the increased bone

turnover in SHR animals [18, 19], which is indicative of the high activity of osteoblasts in producing and mineralizing organic bone matrix. In our findings, MMP-9 expression in the SC group was lower than in the WC group, but in the presence of PD, a higher expression of MMP-9 was found in SHR animals.

These data suggest that the higher production of MMP-9 favors the enhanced bone resorption observed in SHR with PD.

Periodontium remodeling can be assessed by enzymatic activity of bone-forming or bone-resorbing cells, such as BALP and TRAP, respectively. Some experimental reports have shown that SHR animals present elevated alveolar bone loss after ligature-induced periodontitis [22, 23, 40]. Our results corroborate these observations, and point to new knowledge of alveolar bone fragility in hypertension status, which may be associated with the elevated number of osteoclast even without PD ($p < 0.01$). Although a significant increase in the number of TRAP-positive cells was observed following experimental PD in both strains ($p < 0.001$), the SPD groups exhibited higher numbers of osteoclasts than the WPD groups ($p < 0.05$). The activation of osteoclasts during the periodontal collapse may still to contribute to the dissolution of periodontal ligament fibers and bone resorption during PD.

However, there are no reports in literature that relate the osteoblastic phenotype of Wistar and SHR MSCs to bone resorption caused by a chronic inflammation as PD.

SHR is an animal model of genetic hypertension that can exhibit symptoms of osteoporosis due to several systemic mechanisms. Prior studies have demonstrated that bone calcium content was not different between SHR and normotensive animals [41]. However, SHR animals showed decreased

trabecular bone volume and increased bone turnover [18, 19], and also an increased number of osteoclasts [17, 42]. The results of the present study may suggest, to some extent, that the bone mass loss observed in osteoporosis may be attributed to the decreased proliferation rate of osteoblasts. These alterations could be a result of differences in the programming of these cells that occur through the course of the disease [43]. The evidence for senescence in endothelial progenitor cells in experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension could be extrapolated to progenitor cells derived from other tissues, like bone marrow [44]. This would explain their diminished ability to proliferate, compared to progenitor cells taken from normotensive animals. Moreover, no evidence of alterations in the activity of osteoblasts due to the presence of chronic inflammation has been published to date. We speculated that one possible mechanism involved in increased bone loss might be the difference in cellular proliferation rate between SHR and Wistar osteoblasts. In order to clarify this, osteoblasts from Wistar and SHR rats were cultured *in vitro*, allowing a comparison of their proliferation rate. This manuscript provides the first scientific evidence that the proliferation rate of osteoblasts derived from adult hypertensive rats are lower than that observed for normotensive ones. Additionally, osteoblasts from animals with PD demonstrated increased proliferation rates in both strains in comparison to their respective OM groups. *In vivo* studies have demonstrated increased bone turnover in SHR animals, probably associated with high levels of parathyroid hormone (PTH) in a hyperparathyroid state observed in SHR animals [45-47]. On the other hand, proinflammatory cyto- and chemokines are best known for their destructive role in fractured or injured bone. Osteoprogenitor cells at the

fracture site express bone morphogenetic proteins [48, 49], which guide MSCs to proliferate and differentiate [50, 51]. Additionally, TNF- α , IL-12, interferon- γ (IFN- γ) [52, 53], IL-1, IL-6, and IL-11 [54] are upregulated at the fracture site. However, no studies have identified the influence of environmental factors and epigenetic programming directly on osteoblast gene expression and thereby phenotype in hypertensive models, and the possible interference of inflammatory status.

Numerous signaling pathways and transcriptional factors are involved in osteogenic differentiation [55]. Runt-related transcription factor 2 (Runx-2) is a major regulator of osteogenic phenotype through the OC pathway and epigenetic regulation is also crucial to Runx-2 activity [56-58]. Our data indicate that osteoblasts derived from lineages taken from previous PD models proliferate to a greater extent than do cells taken from the corresponding control group. This is indicative that the alterations evoked during PD may alter the genetic conformation of cells that are still undifferentiated.

The quality of bone is very important in bone replacement and regenerative therapies, as it is the main determinant of bone strength [59]. The bone matrix is composed of an organic phase consisting mainly of collagen type I that provides toughness, and an inorganic phase consisting of calcium that gives stiffness to the bone [60, 61]. Our study shows that the amount of total protein produced by osteoblasts derived from different models follows changes in the proliferation rate. This is in accordance with the observations of Coelho [62], which is a demonstration that morphological changes occurs in the cytoskeleton and cell behavior during differentiation [63]. It can be suggested that higher protein production occurs due to a higher rate of cell proliferation and the consequent

production of extracellular matrix. Proliferation rate augmentation is followed by total protein content increase suggesting an improvement in whole bone metabolism. This would explain why the severity of PD is increased in SHR and also illustrate the fact that PD evokes a compensatory response, evidenced by the increased metabolism present in cells derived from this systemic pathologic condition. In Wistar rats, improvement in protein production occurs in a time-dependent manner, which in turn is not observed in SHR. We may speculate that these findings are maybe due to a possible developmental stage in SHR osteoblasts.

Mineral deposition of osteoblasts *in vitro* is initiated after hydrolysis of β -GP by ALP in calcium phosphate, which provides chemical conditions for biological mineralization [64-66]. Our results indicate decreased ALP activity levels in SHR osteoblasts compared to Wistar rats. As previously observed in the literature, under appropriate osteogenic conditions, the peak of the activity of this enzyme occurs on day 7 [62, 67-69]. However, in this study, ALP levels continued to increase in SHR during days 3 and 7 and showed few changes after day 10. This demonstrates that not only the production of organic matrix, but also the production of mineralized matrix is jeopardized in MSC-derived osteoblasts taken from SHR. We speculate that the lower ALP activity and matrix mineralization rate might be involved in the higher bone loss observed in SHR than in Wistar rats. Considering that ALP is an enzyme present mainly in the final stages of periodontal healing, it is not expected to exhibit pronounced activity during the earlier stages of PD.

Understanding the factors regulating bone growth, the continued remodeling of bone throughout life, and the regeneration of injured tissue are basic biological

questions and concerns today's clinician in the treatment of bone disorders [67]. Understanding the unique behavior of osteoblasts based on distinct systemic conditions such as hypertension may further help clinicians design appropriate therapies.

Furthermore, the results of the present study indicate that, in an animal model of hypertension, intrinsic cellular modifications occur in cells that are not directly related to cardiovascular disease. It is still important to identify in which phase of development these alterations appear, and whether they can be reversed. To clarify this, further studies with SHR of different ages subjected to different anti-hypertensive therapies are needed.

Taken together, our data indicate that, while essential hypertension in rats causes increased bone turnover even after ligature-induced periodontitis, important changes in the osteoblast phenotype were observed in both conditions, hypertension and PD. Whereas hypertension tends to diminish the osteoblast proliferation rate and organic matrix production, PD tend to increase them. These changes may be a compensatory mechanism in response to enhanced osteoclast activity or negative bone remodeling balance in some systemic conditions, particularly in the SHR model.

5. Acknowledgements

This work was supported by São Paulo State Research Foundation – FAPESP (Grant # 2011/06070-5 to SHPO and Grant # 2010/14590-6 to CCFA). The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

Figure captions

- Fig 1 Quantitative immunostaining values for (A) RANKL, (B) OPG, (C) BALP, (D) OC. The bars represent mean \pm SEM. All data were compared by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test; * $p < 0.05$ = statistically significant.
- Fig 2 Quantitative immunostaining values for (A) MMP-2, (B) MMP-9, (C) TRAP. The bars represent mean \pm SEM. All data were compared by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test; * $p < 0.05$ = statistically significant.
- Fig 3 Photomicrograph at the furcation of first molars sampled from rats euthanized after 15 days of experiments. Expression of RANKL in (A) WC, (B) SC, (C) WPD, (D) SPD. Expression of OPG in (E) WC, (F) SC, (G) WPD, (H) SPD. Expression of BALP in (I) WC, (J) SC, (K) WPD, (L) SPD. Expression of OC in (M) WC, (N) SC, (O) WPD, (P) SPD. Original magnification: 100 \times .
- Fig 4 Photomicrograph at the furcation of first molars sampled from rats euthanized after 15 days of experiments. Expression of MMP-2 in (A) WC, (B) SC, (C) WPD, (D) SPD. Expression of MMP-9 in (E) WC, (F) SC, (G) WPD, (H) SPD. Expression of TRAP in (I) WC, (J) SC, (K) WPD, (L) SPD. Original magnification: 100 \times (A-H) and 400 \times (I-L).
- Fig 5 Mitochondrial activity (absorbance in nanometers) of MSC cultures grown after osteogenic differentiation at 3, 7, 10, and 14 days. The bars represent mean \pm SEM. All data were compared by two-way ANOVA and Bonferroni's post test. Symbols indicate statistical differences. WC = Wistar Control with MEM; WC-OM = Wistar Control with OM; WPD =

Wistar with PD with MEM; WPD-OM = Wistar with PD with OM. SC = SHR Control with MEM; SC-OM = SHR Control with OM; SPD = SHR with PD with MEM; SPD-OM = SHR with PD with OM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig 6 Total protein content ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protein) of MSC cultures grown after osteogenic differentiation at 3, 7, 10, and 14 days. The bars represent mean \pm SEM. All data were compared by two-way ANOVA and Bonferroni's post test. Symbols indicate statistical differences. WC = Wistar Control with MEM; WC-OM = Wistar Control with OM; WPD = Wistar with PD with MEM; WPD-OM = Wistar with PD with OM. SC = SHR Control with MEM; SC-OM = SHR Control with OM; SPD = SHR with PD with MEM; SPD-OM = SHR with PD with OM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig 7 Alkaline phosphatase specific-activity (U/mg protein) of MSC cultures grown after 3, 7, 10, and 14 days of osteogenic differentiation. The bars represent mean \pm SEM. All data were compared by two-way ANOVA and Bonferroni's post test. Symbols indicate statistical differences. WC = Wistar Control with MEM; WC-OM = Wistar Control with OM; WPD = Wistar with PD with MEM; WPD-OM = Wistar with PD with OM. SC = SHR Control with MEM; SC-OM = SHR Control with OM; SPD = SHR with PD with MEM; SPD-OM = SHR with PD with OM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Fig 8 Photomicrograph of *in vitro* mineralization of MSC cultures grown after 17 days of osteogenic differentiation. WC = Wistar Control with MEM (A and B); WC-OM = Wistar Control with OM (C and D); WPD = Wistar

with PD with MEM (E and F); WPD-OM = Wistar with PD with OM (G and H). SC = SHR Control with MEM (I and J); SC-OM = SHR Control with OM (K and L); SPD = SHR with PD with MEM (M and N); SPD-OM = SHR with PD with OM (O and P). Original magnification in A, C, E, G, I, K, M and O; $\times 1000$ in B, D, F, H, J, L, N, and P.

References

- [1] Yuan H, Gupte R, Zelkha S, Amar S. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand antagonists inhibit tissue inflammation and bone loss in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38: 1029-36.
- [2] Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000* 2010;53: 55-69.
- [3] Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14: 216-48.
- [4] Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14: 112-43.
- [5] Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005;366: 1809-20.
- [6] Ebersole JL, Dawson DR, Morford LA, Peyyala R, Miller CS, González OA. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol 2000* 2013;62: 163-202.
- [7] Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke GW, Tzakis AG, Ricordi C, Miller J, Esquenzai V. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow. *Hum Immunol* 2004;65: 93-103.
- [8] Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998;3: 108-20.
- [9] Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 1997;14: 33-53.
- [10] Garcia RI, Henshaw MM, Krall EA. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol 2000* 2001;25: 21-36.
- [11] Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9: 1137-41.
- [12] Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194: S3-11.
- [13] Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG, Ho AW, Hausmann E, Hreshchyshyn MM. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67: 1076-84.
- [14] Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann Periodontol* 2001;6: 197-208.
- [15] Chesnut CH. The relationship between skeletal and oral bone mineral density: an overview. *Ann Periodontol* 2001;6: 193-6.
- [16] Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100: 349-56.
- [17] Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int* 1985;37: 605-7.
- [18] Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, Barbagallo CM, Boiardi L, Passeri G, Arlunno B, Delsignore R, Passeri M. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience* 1991;2: 15-7.
- [19] Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner* 1993;20: 251-64.

- [20] Furuse M, Okumura M, Watanabe T, Okumura J. Mineral balance and bone histology in spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav* 1992;52: 731-6.
- [21] Naito S, Ito M, Sekine I, Hirano T, Iwasaki K, Niwa M. Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). *Bone* 1993;14: 745-53.
- [22] Leite CL, Redins CA, Vasquez EC, Meyrelles SS. Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2005;27: 523-31.
- [23] Bonato CF, do-Amaral CCF, Belini L, Salzedas LMP, Oliveira SHP. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2012;47: 783-792.
- [24] Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 1990;4: 3111-23.
- [25] Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988;106: 2139-51.
- [26] Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res* 1997;15: 546-57.
- [27] Wright GL, DeMoss DL, Geng W. Analysis of skeletal development on the basis of body mass and bone resorption. *Life Sci* 2000;67: 1397-407.
- [28] DeMoss DL, Wright GL. Sex and strain differences in whole skeletal development in the rat. *Calcif Tissue Int* 1998;62: 153-7.
- [29] Zancanela DC, Primo FL, Rosa AL, Ciancaglini P, Tedesco AC. The effect of photosensitizer drugs and light stimulation on osteoblast growth. *Photomed Laser Surg* 2011;29: 699-705.
- [30] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-75.
- [31] de Melo WM, de Oliveira FS, Marcantonio E, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Autogenous bone combined with anorganic bovine bone for maxillary sinus augmentation: analysis of the osteogenic potential of cells derived from the donor and the grafted sites. *Clin Oral Implants Res* 2013.
- [32] Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 1998;76: 899-910.
- [33] Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, Rattan A, Scully S, Fletcher F, Juan T, Kelley M, Burgess TL, Boyle WJ, Polverino AJ. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2000;157: 435-48.
- [34] Gunson MJ, Arnett GW, Milam SB. Pathophysiology and pharmacologic control of osseous mandibular condylar resorption. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70: 1918-34.
- [35] Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Müller F, Frøland SS, Aukrust P. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immune activation or glucocorticoid excess--possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol* 2001;145: 685-90.
- [36] Silva JA, Lopes Ferrucci D, Peroni LA, de Paula Ishi E, Rossa-Junior C, Carvalho HF, Stach-Machado DR. Periodontal disease-associated compensatory expression of osteoprotegerin is lost in type 1 diabetes mellitus

and correlates with alveolar bone destruction by regulating osteoclastogenesis. *Cells Tissues Organs* 2012;196: 137-50.

[37] Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26: 97-122.

[38] Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, da Silva Paiva KB, Pereira Lauris JR, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Expression of metalloproteinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. *J Mol Histol* 2005;36: 311-6.

[39] Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *J Cell Biol* 1994;124: 1091-1102.

[40] Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;43: 707-19.

[41] Bindels RJ, van den Broek LA, Jongen MJ, Hackeng WH, Löwik CW, van Os CH. Increased plasma calcitonin levels in young spontaneously hypertensive rats: role in disturbed phosphate homeostasis. *Pflugers Arch* 1987;408: 395-400.

[42] Merke J, Lucas PA, Szabo A, Cournot-Witmer G, Mall G, Bouillon R, Drüeke T, Mann J, Ritz E. Hyperparathyroidism and abnormal calcitriol metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1989;13: 233-42.

[43] Liang H, Ma Y, Pun S, Stimpel M, Jee WS. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats. *Anat Rec* 1997;249: 173-80.

[44] Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I. Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2005;28: 763-72.

[45] McCarron DA, Yung NN, Ugoretz BA, Krutzik S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1981;3: 1162-7.

[46] Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982;243: H365-70.

[47] Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism* 2000;49: 1130-3.

[48] Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002;17: 513-20.

[49] Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108: 1585-90.

[50] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36: 1392-404.

[51] Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Growth factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999;14: 1805-15.

[52] Rundle CH, Wang H, Yu H, Chadwick RB, Davis EI, Wergedal JE, Lau KH, Mohan S, Ryaby JT, Baylink DJ. Microarray analysis of gene expression during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone* 2006;38: 521-9.

- [53] Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003;88: 873-84.
- [54] Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14: 179-86.
- [55] Deng ZL, Sharff KA, Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Bennett E, Reid R, Manning D, Xue A, Montag AG, Luu HH, Haydon RC, He TC. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development. *Front Biosci* 2008;13: 2001-21.
- [56] Villagra A, Gutiérrez J, Paredes R, Sierra J, Puchi M, Imschenetzky M, Wijnen Av A, Lian J, Stein G, Stein J, Montecino M. Reduced CpG methylation is associated with transcriptional activation of the bone-specific rat osteocalcin gene in osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002;85: 112-22.
- [57] Thomas D, Kansara M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. *J Cell Biochem* 2006;98: 757-69.
- [58] Teven CM, Liu X, Hu N, Tang N, Kim SH, Huang E, Yang K, Li M, Gao JL, Liu H, Natale RB, Luther G, Luo Q, Wang L, Rames R, Bi Y, Luo J, Luu HH, Haydon RC, Reid RR, He TC. Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem Cells Int* 2011;2011: 201371.
- [59] Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S. Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2012;84: 185-92.
- [60] Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 2006;17: 319-36.
- [61] Kihara T, Hirose M, Oshima A, Ohgushi H. Exogenous type I collagen facilitates osteogenic differentiation and acts as a substrate for mineralization of rat marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341: 1029-35.
- [62] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000;21: 1095-102.
- [63] IAP G. Cell biology at interfaces. In. *J Mat Sci Mat Med: Elsevier*; 1994. p. 357-60.
- [64] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 1991;14: 27-40.
- [65] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Differential effects of fluoride during initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed in vitro. *J Bone Miner Res* 1993;8: 1357-63.
- [66] Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 1992;51: 305-11.
- [67] Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J* 1995;15: 118-40.
- [68] Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993;14: 424-42.

[69] Coelho MJ, Cabral AT, Fernande MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials* 2000;21: 1087-94.

Figure 1.

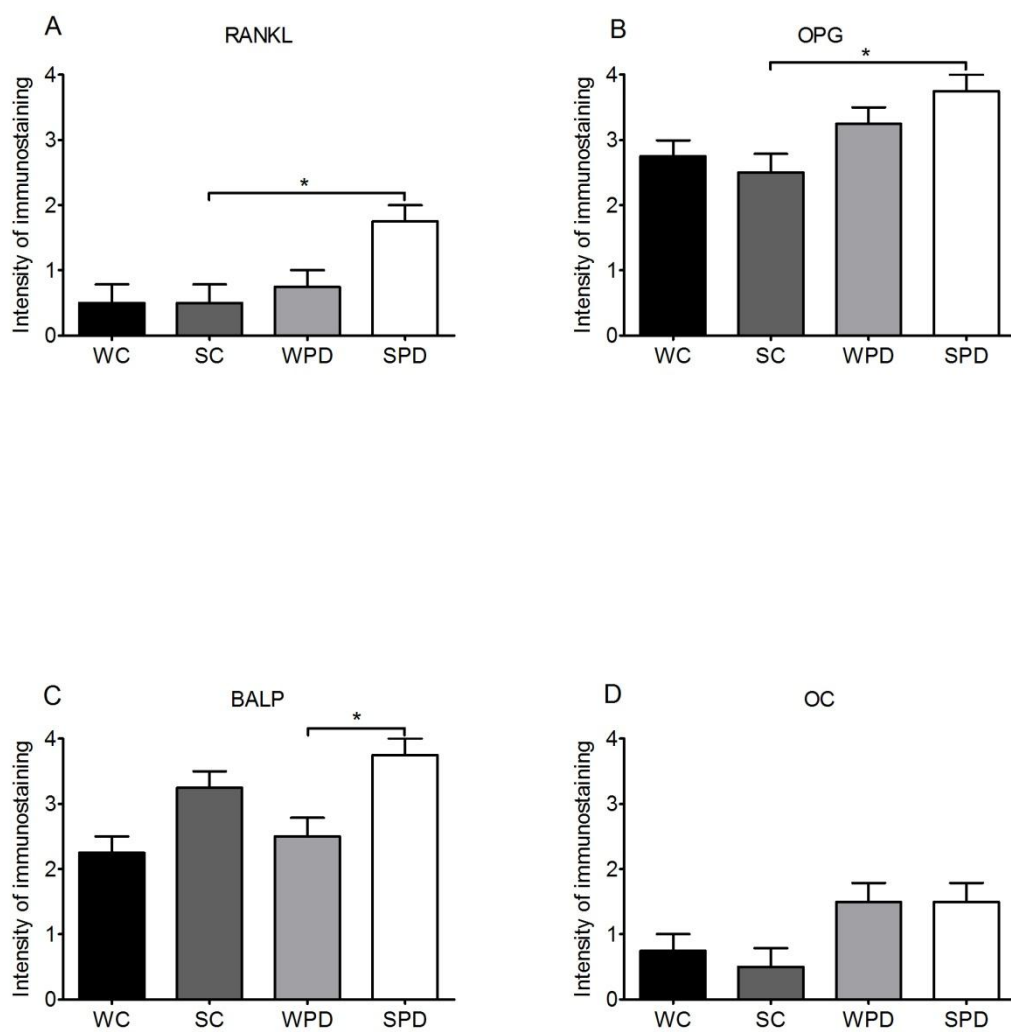


Figure 2.

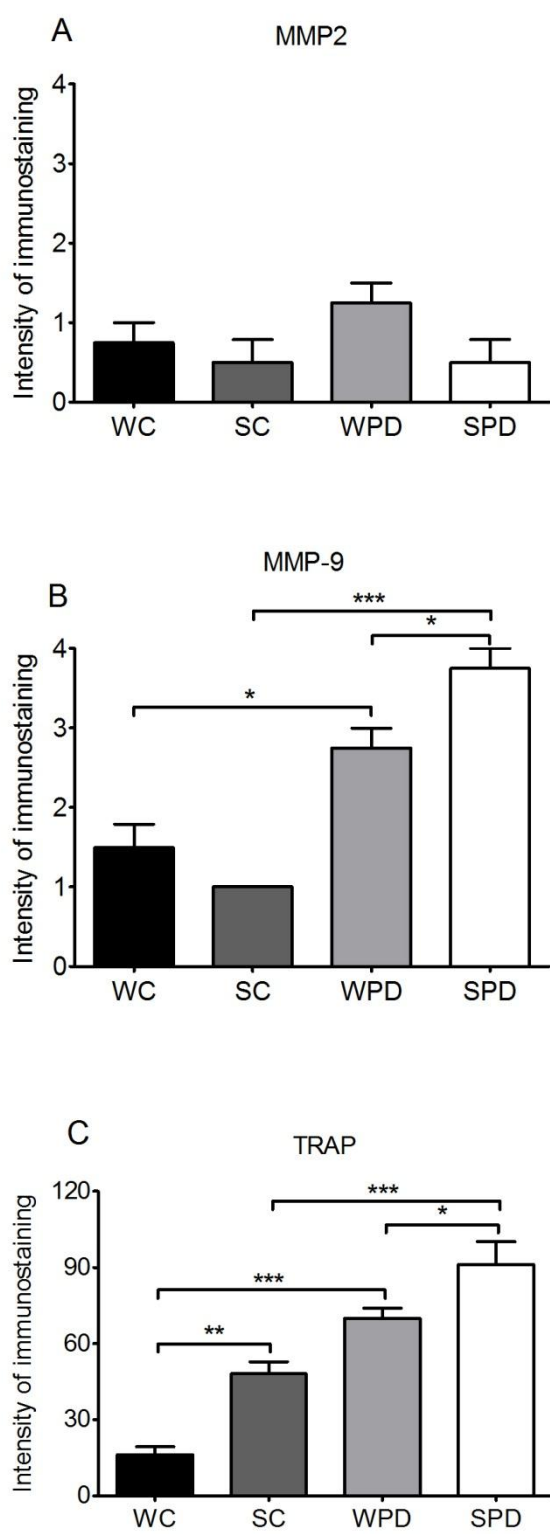


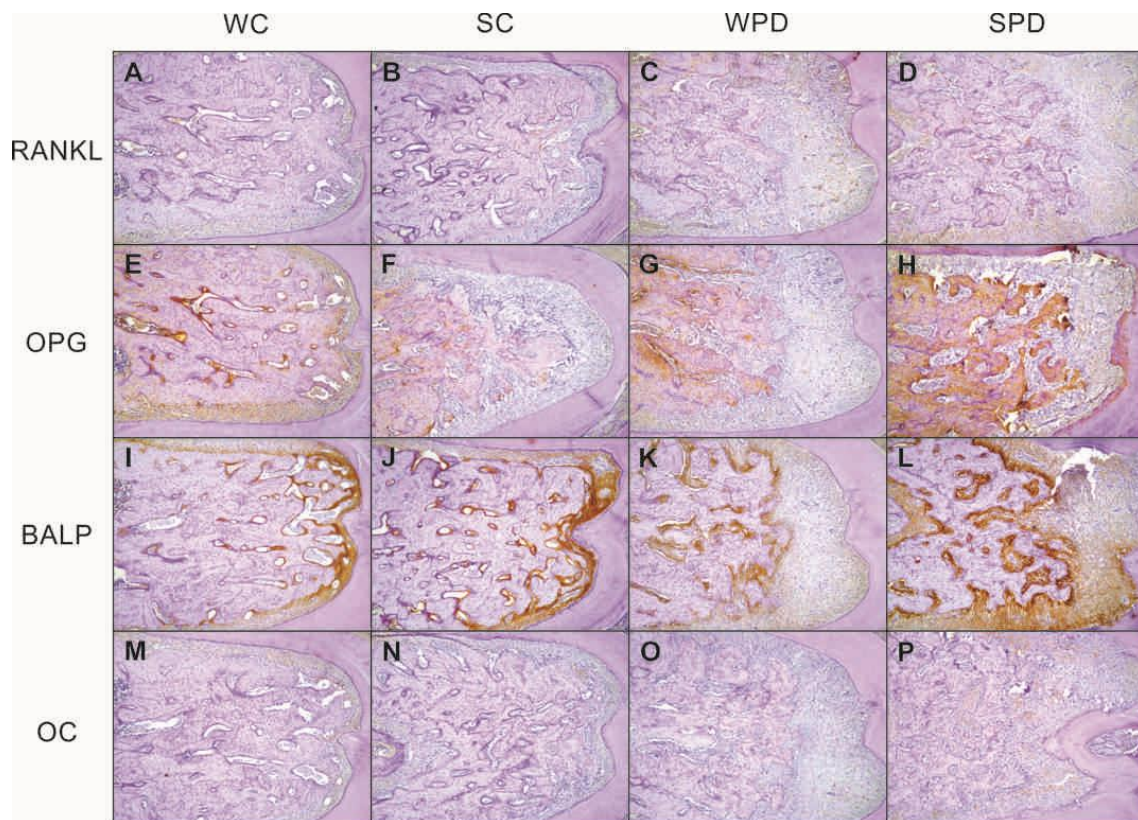
Figure 3.

Figure 4.

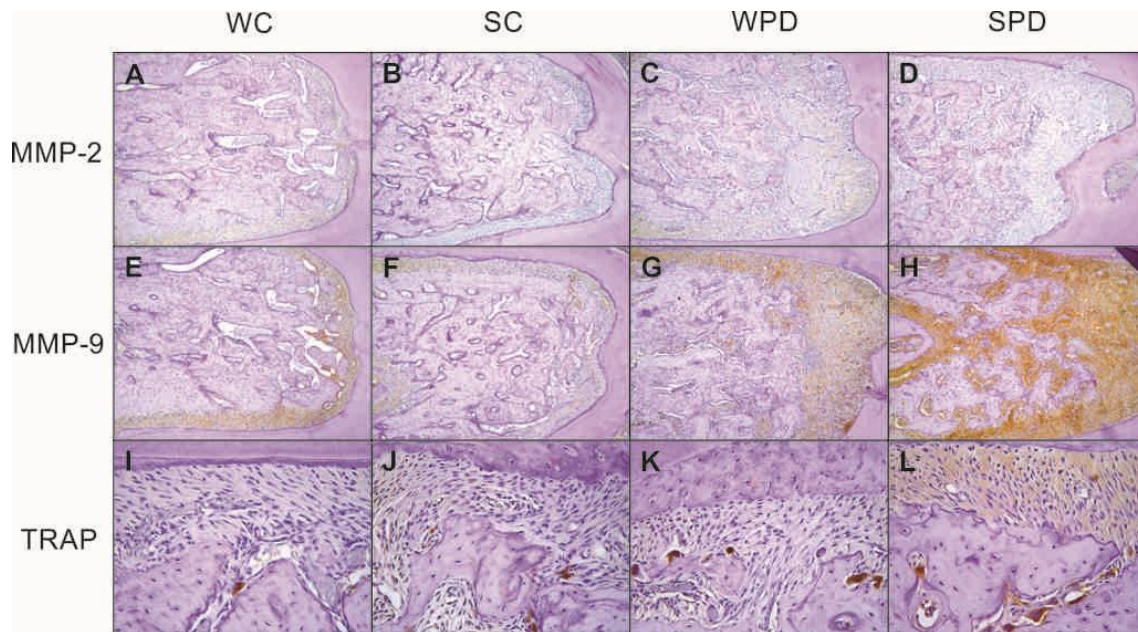


Figure 5.

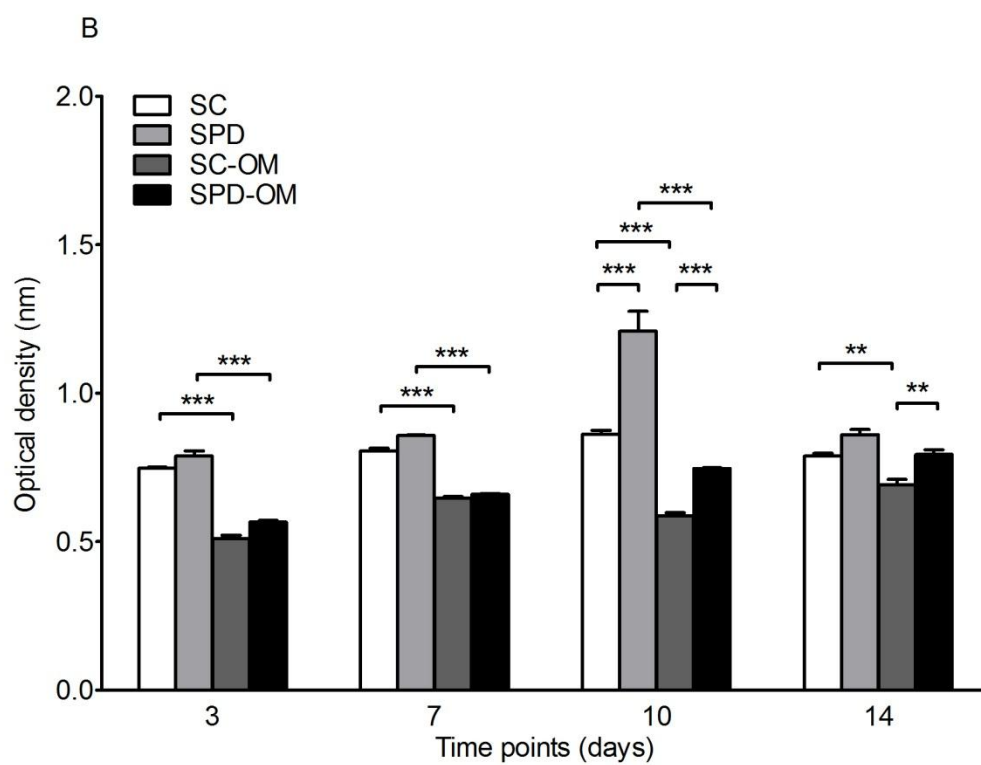
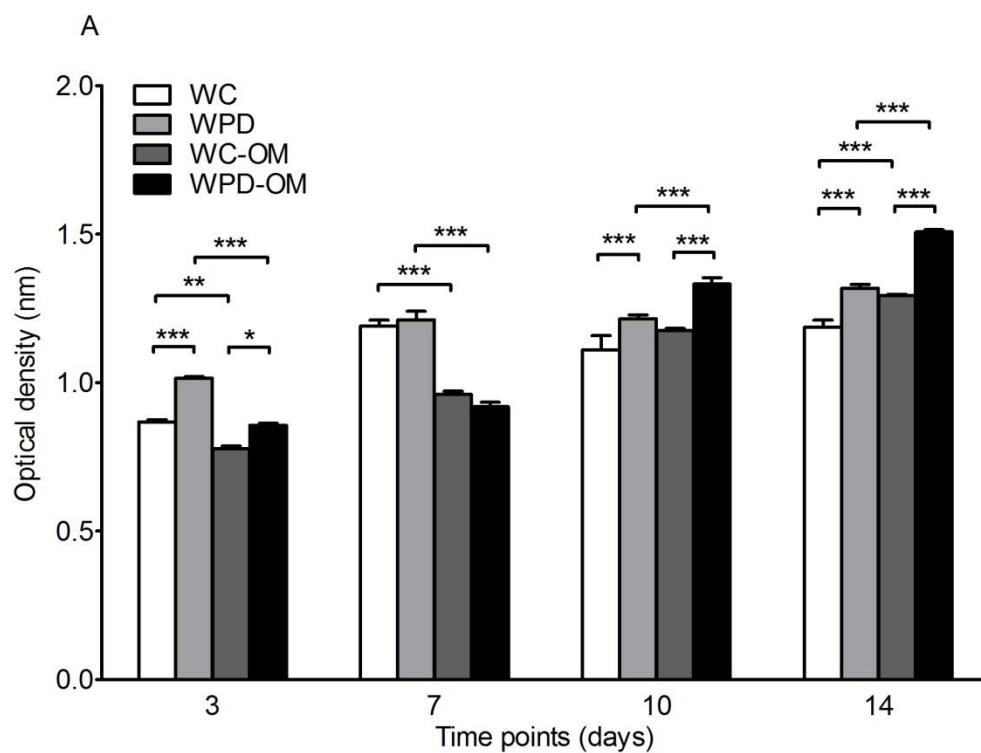


Figure 6.

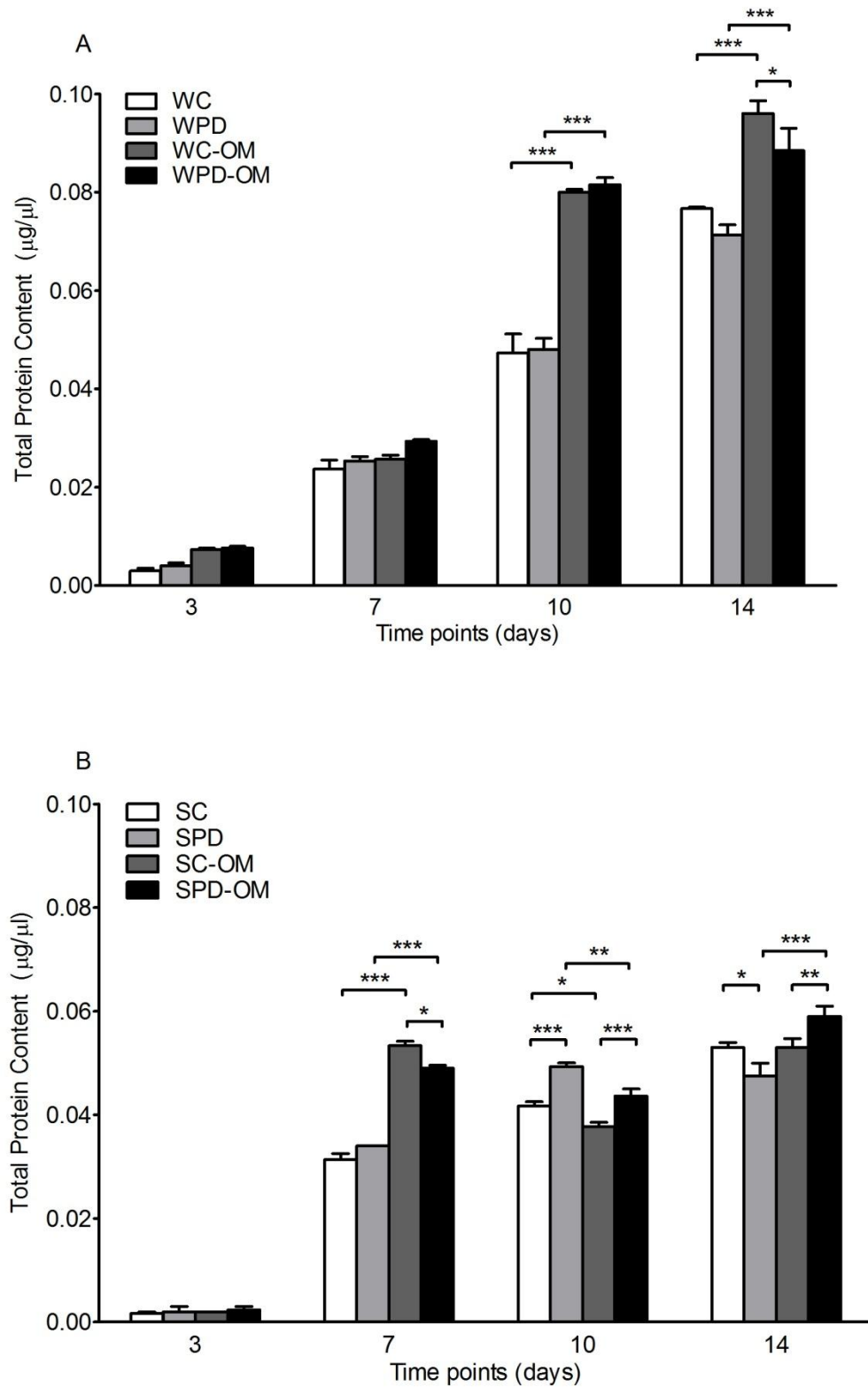


Figure 7.

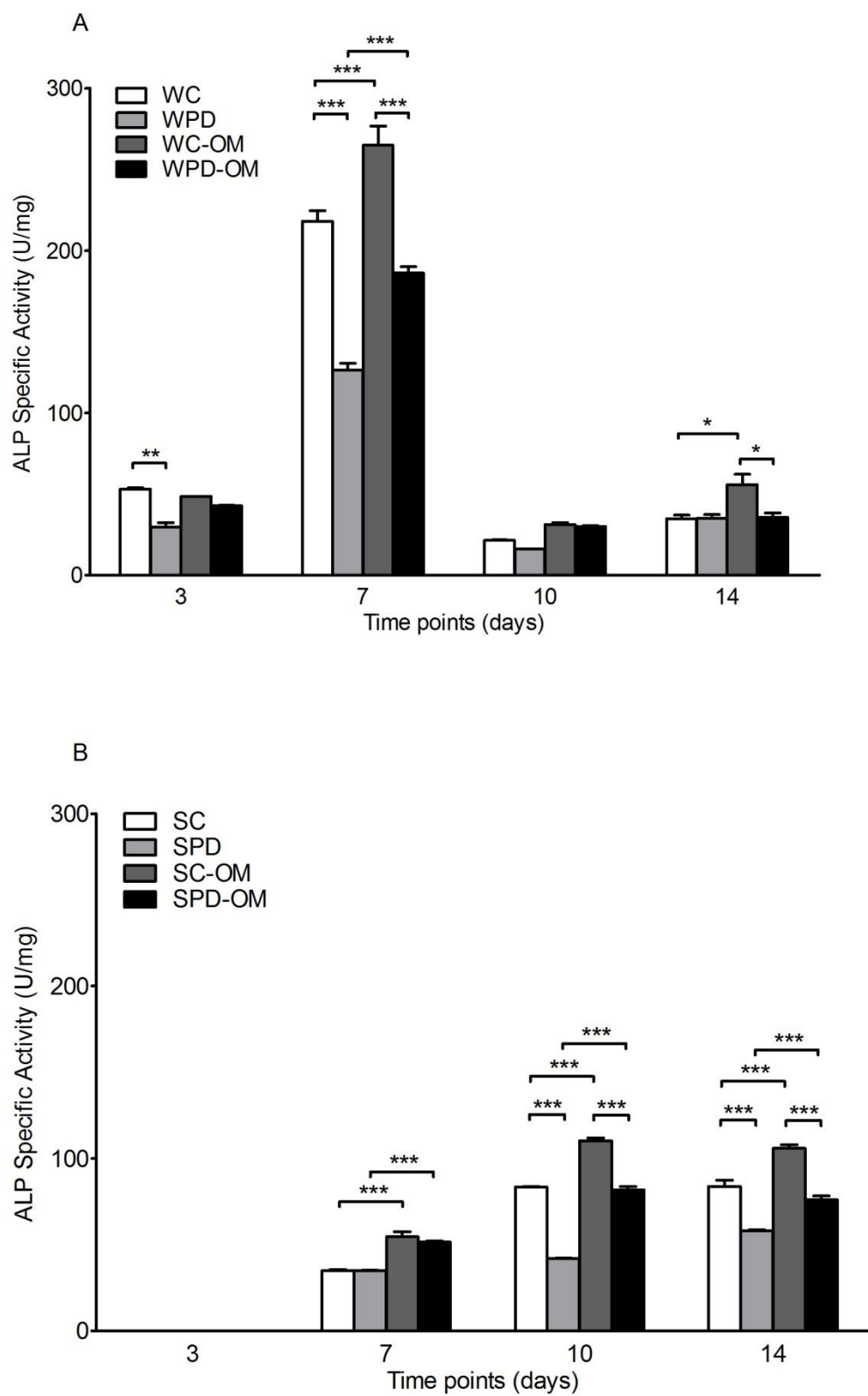
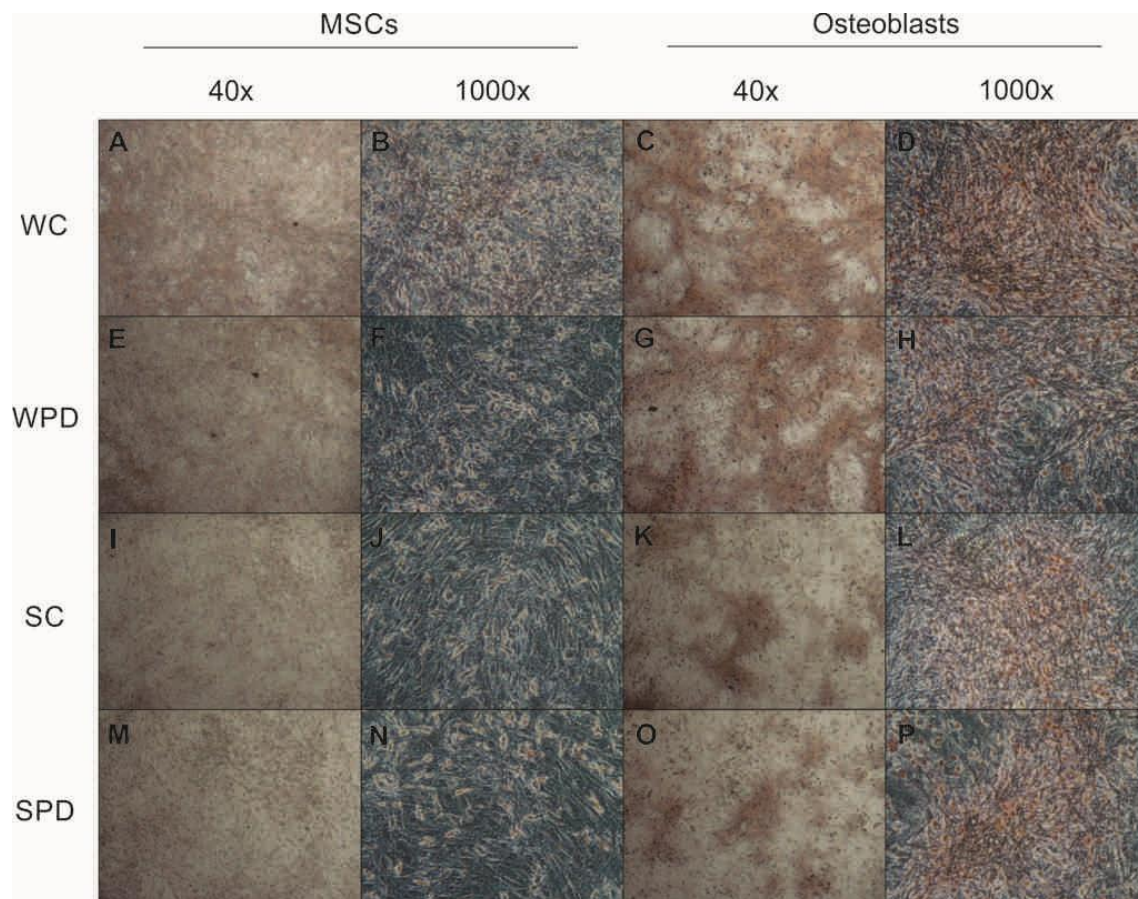


Figure 8.



ANEXO B
(NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO “BONE”)

BONE



Contents lists available at ScienceDirect

Bone

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bone



ISSN:8756-3282

Imprint: ELSEVIER

Statistics

Impact Factor: 3.823

5-Year Impact Factor: 4.247

Issues per year: 12

Guide for Authors

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment Official Journal of the International Bone and Mineral Society

BONE provides a peer-reviewed, interdisciplinary forum for monthly publication of original, experimental, and clinical studies, along with review articles on normal and pathological processes occurring in bone and other tissues affecting calcium metabolism. Additionally, well-documented case reports are invited.

Submissions of manuscripts

Manuscripts must be submitted on BONE's submission and review Web site, <http://ees.elsevier.com/bone>. If you have a preference, please indicate which editor or associate editor you would like to process your manuscript

according to their expertise. The Editors, however, reserve the right to select a different editor or associate editor to monitor the review process, as the expertise of the proposed editor or associate editor should closely match the subject matter of the manuscript. Please also suggest five possible reviewers. When recommending reviewers, authors should avoid naming more than one scientist from any one institution or from closely related scientists/institutions. For each reviewer, please provide name of institution, telephone number, and e-mail address. Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work is carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. Manuscripts are published in English only.

For questions regarding submission, please contact:

Bone editorial office 525 B Street, Suite 1900 San Diego, CA 92101-4495, USA

Telephone: (619) 699-6782 Fax: (619) 699-6211 Email: bone@elsevier.com

English editing. The following individuals or services are members of the (United States) Council of Science Editors or other professional organizations and have expressed interest in helping authors of manuscripts submitted to BONE with English editing. Authors may contact these individuals or services directly by mail, phone, fax, or e-mail. All financial arrangements are strictly between the two parties. BONE neither endorses nor recommends any specific

individual or service. Professional editing, while often recommended by reviewers, does not ensure acceptance or publication of a manuscript. Diana B. Mathis, ELS, 5559 Raleigh Street, Pittsburgh, PA 15217-1534, USA; telephone: 412-521-6346; fax: 412-422-5082; e-mail: dbmathis@fyi.net Lynda Charters, Medical International, P.O. Box 5966, Marlboro, MA 01752, USA; telephone: 508-788-0726; fax: 508-788-0742; e-mail: medintl@aol.com MedEdit, USA, 15101 Magnolia Boulevard, E24, Sherman Oaks, CA 91403, USA; telephone: 818-986-1715; fax: 818-986-5507; e-mail: adawson@hsc.usc.edu Karin Mesches, Ph.D., SciTechEdit International, 7012 East Mountain Brush Circle, Highlands Ranch, CO 80130, USA; fax: 303-773-6660; e-mail: editor@scitechedit.com; Web page: <http://www.scitechedit.com> Gary D. Novack, Ph.D., Member, AMWA, PharmaLogic Development, Inc., 17 Bridgegate Drive, San Rafael, CA 94903, USA; telephone: 415-472-2181; fax: 415-472-2183; e-mail: gary_novack@pharmalogic.com; Web page: www.pharmalogic.com Rhana Pike (Ms), ELS, Sydney, NSW 2001, Australia; telephone: 61-2-9569-7831; e-mail: rhana@australianeditor.com. Susan Erickson, 130 Winchester Street, Brookline, MA 02446, USA; telephone: 617-731-3415; e-mail: rhanap@ozemail.com.au.

Language Polishing: Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor take responsibility for any products, good or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more

information please refer to our Terms and Conditions
<http://www.elsevier.com/termsconditions>

Only one revision will be permitted. A subsequent revision will be treated as a new submission.

Conflict of interest policy. Authors are required to disclose commercial or similar relationships to products or companies mentioned in or related to the subject matter of the article being submitted. Sources of funding for the article should be acknowledged on the title page. Affiliations of authors should include corporate appointments relating to or in connection with products or companies mentioned in the article, or otherwise bearing on the subject matter thereof. Other pertinent financial relationships, such as consultancies, stock ownership, or other equity interests or patent-licensing arrangements, should be disclosed in the cover letter at the time of submission. Such relationships may be disclosed in the journal at the discretion of the editor-in-chief in footnotes appearing on the title page. Questions about this policy should be directed to the editor-in-chief.

Copyright. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a “Journal Publishing Agreement” (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript with a “Journal Publishing Agreement” form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions.

Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Ethics:

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, with the approval of the appropriate local ethics committee, and in compliance with national legislation and the Code of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>.

When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimise pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (“Public Access”) Policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Expedited review for Rapid Communications provides authors the opportunity to rapidly publish data they consider particularly novel or valuable to the scientific community. If accepted, the paper will be inserted into the next available issue still in press (usually after approximately 3 months), provided that it is a maximum of 4000 words printed pages and does not require extensive revisions. Authors should note that **acceptance criteria for this category are significantly more stringent.**

Editorials, Reviews, and Minireviews. Although these are most often by invitation, authors who wish to express their opinion or write reviews about scientific matters of interest to the community can submit such manuscripts to BONE. Editorials and minireviews should be 2000-3000 words printed pages and not require extensive revisions to be acceptable for publication.

Sponsored supplements and/or commercial reprints: for more information please contact Elsevier Life Sciences Commercial Sales, Radarweg 29, 1043 NX, Amsterdam, The Netherlands; phone (+31) (20) 4852939/2059; email: LSCS@elsevier.com.

Nomenclature

For chemical nomenclature, follow the Subject Index of Chemical Abstracts, capitalize trade names, and give manufacturers' or suppliers' names and addresses. Give the meaning of an abbreviation the first time it appears. Define a nonstandard abbreviation when it first appears in the text. For detailed text entry instructions, see <http://www.elsevier.com/locate/guidepublication>

For manuscripts dealing with bone histomorphometry, please use the nomenclature approved by the American Society for Bone and Mineral Research (Parfitt AM, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry nomenclature, symbols and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Min Res* 1987;2:595-610).

For DXA nomenclature and decimal digits. The ISCD Official Position is as follows. DXA Nomenclature u DXA - not DEXA. u T-score - not T score, t-score, or t score u Z-score - not Z score, z-score, or z score DXA Decimal Digits

Preferred number of decimal digits for DXA reporting: u BMD: 3 digits (example, 0.927 g/cm²) u T-score: 1 digit (example, -2.3) u Z-score: 1 digit (example, 1.7) u BMC: 2 digits (example, 31.76 g) u Area: 2 digits (example, 43.25 cm²) u % reference database: Integer (example, 82%)

For manuscripts dealing with osteoclast differentiation and osteoclast function, please use the Proposed Standard Nomenclature for New Tumor Necrosis Factor Members Involved in the Regulation of Bone Resorption (Report of the ASBMR President's Committee on Nomenclature. *Bone* 2000;27:761-4).

For manuscripts dealing with bone markers, please use the Recommendation for Bone Marker Nomenclature and Abbreviations (position paper, Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Bone* 2001;28:575-6).

Preparation of manuscripts

Papers should be *double spaced* with at least 1-inch (2.5 cm) margins. Number all pages consecutively. Type tables, footnotes, and figure legends double spaced on separate pages.

The *title page* should show the paper's title, authors, and the complete names of institutions where work was done. Please include the name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom correspondence and proofs are to be sent. Each manuscript should include an abstract of not more than 350 words, intelligible to the general reader without reference to the text. List 5 keywords on a separate sheet for use by indexing and abstract services. Manuscript text should follow standard arrangement:

Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion.

Acknowledgments should be on a separate page at the end of the text.

References should be cited in the text by a number in square brackets and listed at the end of the paper in numerical order. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Include full article titles and abbreviate journal titles according to the List of Journals Indexed in Index Medicus. Format references as shown in the examples below.

[1] Brockstedt H, Kassem M, Ericksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age- and sex-related changes in the iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993;14:681-91.

[2] Coccia PF. Bone marrow transplantation for osteoporosis. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, editors. *Bone marrow transplantation*. Boston, MA: Blackwell; 1993; 874, 882.

[3] Lacowikz, J. R. *Principles of fluorescence*. New York: Plenum; 1983, p. 112-53.

Tables. Type each table on a separate page at the end of the manuscript, cite in order in the text, and number consecutively with Arabic numerals. Each table should have a title typed above it. Indicate table footnotes by superscript lowercase letters.

Figures must be self-explanatory, titled, cited in order in the text, and numbered consecutively with Arabic numerals. On separate pages, type figure titles with their (brief) legends. Figures should not be embedded in text. Several figures may be grouped into a plate on one page. Lettering on micrographs should be clearly legible. Letters 2 mm high are recommended. Limit the field of

micrographs to structures specifically discussed in the report. Symbols and areas of special interest should not be close to the edges. Give figure magnification in the legends and on the figures (micrometer scale). Symbols (minimum 3 mm height) used on micrographs must be explained in the figure legends. For detailed artwork instructions, see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Color Figures If together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.]

Authors should not that a request to revert from full colour to colour only in the electronic publication at the stage of typesetting and proof correction, will require separate editorial agreement, with possible re-review if necessary, and may significantly delay publication of your manuscript.

Color cover photos. Authors are encouraged to include a color image of any subject in relation to their submitted manuscript for use as cover of the issue in which their manuscript will appear. If the image is also used as illustration within the original manuscript, the costs of the specific plate will be waived.

Supplementary material:

Electronic supplementary material is now accepted to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Corporate Website at <http://www.elsevier.com/authors>

Proofs:

Proofs will be sent to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes may be made, and corrections should be returned promptly.

Offprints:

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF offprint by default, but can choose to receive 50 paper copies instead.

Author enquiries:

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at

<http://www.elsevier.com/locate/bone>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.

ANEXO C
(CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*Estudo do fenótipo osteoblástico em células-tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR) na presença ou não de doença periodontal*", sob a responsabilidade de **SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA** está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado em 09/02/2011, de acordo com o Processo FOA-367/11.

Araçatuba, 09 de fevereiro de 2011.



FABIANO ANTONIO CADIOLI
Vice-Presidente da CEUA

mfsr.

ANEXO D
(SUBMISSÃO DO MANUSCRITO)

Submission Confirmation

Assunto: Submission Confirmation
De: "BONE (ELS)" <bone@elsevier.com>
Data: 04/07/2013 18:31
Para: shpoliv@foa.unesp.br

Dear Sandra,

Your submission entitled "Experimentally induced periodontitis changes osteoblast phenotype in normotensive and hypertensive rats." has been received by Bone

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bone/>.

Your username is: shpoliv
If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/bone/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Editorial Office
Bone