MAIDY REHDER WIMMERS FERREIRA

**Identificação de genes diferencialmente expressos em células
humanas do osso alveolar cultivadas sobre diferentes
superfícies de titânio**

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

Área de concentração: Reabilitação
Oral.

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

Ribeirão Preto

2014

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Ferreira, Maily Rehder Wimmers

Identificação de genes diferencialmente expressos em células
humanas do osso alveolar cultivadas sobre diferentes superfícies de
titânio. Ribeirão Preto, 2014.

160 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Bombonato-Prado, Karina Fittipaldi.

1. Modificação de superfície 2. Células osteoblásticas 3. Expressão
gênica 4. Oligo *microarrays*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maidy Rehder Wimmers Ferreira

Identificação de genes diferencialmente expressos em células humanas do osso alveolar cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio

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

Área de concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu a vida. Aos meus pais, Sérgio e Moníca, que me ensinaram a correr atrás dos meus objetivos com dedicação e amor. Ao meu esposo Gabriel, pelo companheirismo e por sempre me estimular a alcançar meus objetivos. Dedico este trabalho também ao meu irmão Samuel, que esteve sempre ao meu lado.

Agradecimento especial

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, que me apresentou à pesquisa e que me orientou na Iniciação Científica, no Mestrado e no Doutorado. Pela fundamental colaboração e ensinamentos no projeto PAE. Por ter acreditado e confiado em mim. Obrigada por tudo!

Agradecimientos

Agradeço,

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo Digníssimo Diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros e pela Vice-diretora Profª Drª Léa Assed Bezerra da Silva.

À Coordenação Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na pessoa do Prof Dr Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia (Reabilitação Oral) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na pessoa da Profª Drª Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza.

Ao Roger Rodrigo Fernandes, técnico do Laboratório de Cultura de Células, e à Fabíola Singareti de Oliveira, técnica do Laboratório de Biologia Molecular, por me ensinarem com paciência as técnicas utilizadas neste trabalho, e por sempre poder contar com eles.

A todos os colegas e amigos do curso de pós-graduação, em especial à Fernanda e Mayara, pela cumplicidade e apoio sempre.

A todos os meus amigos e familiares pelos incentivos e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Células e do Laboratório de Imunogenética Molecular pelas alegrias, ensinamentos e colaborações.

Ao Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos e sua equipe pela disponibilidade e auxílio para a realização de alguns experimentos em seu laboratório.

À Janaína e à Amanda por sua paciência e disponibilidade. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecimentos e pela sua inestimável ajuda neste trabalho.

Agradeço a CAQI/IQSC/USP pela disponibilidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Aos professores do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia e do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pelas disciplinas que contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela dedicação e auxílio.

Enfim, agradeço a todos que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço pelo apoio financeiro, fundamental para a realização deste trabalho, assim como pela bolsa de doutorado concedida (processos 2011/21982-0 e 2011/14046-7).

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Resumo

Ferreira, M.R.W. Identificação de genes diferencialmente expressos em células humanas do osso alveolar cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio. Ribeirão Preto, 2014. 160 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Implantes de titânio têm sido extensivamente utilizados na Ortopedia e na Odontologia, principalmente como substitutos de elementos dentários ausentes. O titânio é um implante metálico de escolha devido à sua alta biocompatibilidade e resistência à corrosão, e também porque não provoca reações imunológicas, ao mesmo tempo em que promove a osseointegração. A biocompatibilidade do implante depende da resposta celular em contato com a sua superfície; sendo assim, mudanças nesta superfície podem provocar impactos benéficos na osseointegração através de alterações nas interações com as células presentes no local do implante, como, por exemplo, células osteoblásticas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a resposta celular de células osteoblásticas humanas provenientes da crista óssea alveolar em contato com diferentes superfícies de titânio: controle (polido), nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa.

Os ensaios bioquímicos realizados foram: proliferação e viabilidade celular, quantidade de proteína total e atividade de fosfatase alcalina, além da detecção e quantificação de nódulos mineralizados, com a utilização do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney com $p \leq 0,05$. Também foi realizada a avaliação da modulação gênica nas células em contato com as diferentes superfícies de titânio por meio do método de oligo *microarray*, utilizando lâminas *Agilent* formato 4x44 K e análise de microRNAs utilizando lâminas *Agilent* 8x15 K. A fim de identificar alterações na expressão gênica foi utilizado o programa GeneSpring GX. A expressão gênica foi validada pela reação de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Observamos um pico na proliferação celular aos 10 dias de cultura e um aumento gradual da viabilidade

celular ao longo do tempo. Entre as superfícies tratadas observou-se maior quantidade de proteína total na nanotextura em relação à nano+submicrotextura aos 10 dias de cultura ($p \leq 0,05$) e um aumento progressivo da atividade de fosfatase alcalina, com maior atividade na nanotextura em relação à nano+submicrotextura aos 14 dias de cultura ($p \leq 0,05$). Não houve diferença qualitativa na formação dos nódulos mineralizados, apesar de a microtextura rugosa apresentar maior quantidade de cálcio que a nanotextura ($p \leq 0,05$). Os resultados encontrados evidenciaram expressão diferenciada de 716 mRNAs ($fold\ change \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$) e 32 microRNAs ($fold\ change \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$) com funções associadas ao processo de osteogênese, principalmente mineralização, adesão celular, apoptose, proliferação e diferenciação celular. Os resultados sugerem que, diante do protocolo utilizado neste trabalho, o tratamento químico realizado na superfície do titânio provoca variações no metabolismo de células osteoblásticas tanto em nível celular como de expressão gênica.

Palavras-chave: modificação de superfície, células osteoblásticas, expressão gênica, oligo *microarrays*.

Abstract

Ferreira, M.R.W. Identification of differentially expressed genes in human alveolar bone cells cultured on different titanium surfaces. Ribeirão Preto, 2014. 160 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

Titanium implants have been extensively used in orthopedics and dentistry, mainly as a replacement for missing teeth. Titanium is the metal implant of choice due to its high biocompatibility and corrosion resistance, as well as absence of immune response, while promoting osseointegration. The biocompatibility of the material depends on cellular response in contact with the surface; therefore, changes on this surface can have beneficial impacts on osseointegration through changes in interactions with cells at the implant site, such as osteoblastic cells. The objective of this study was to characterize the cellular response of osteoblastic cells from human alveolar crest in contact with different titanium surfaces: control (polished), nanotextured, nano+submicrotextured and rough microtexture. The performed biochemical assays included cell proliferation and viability, total protein content and alkaline phosphatase activity, in addition to the detection and quantification of mineralized nodules, using the non-parametric statistical tests of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney ($p \leq 0,05$). Osteoblastic gene modulation was evaluated by means of an oligo microarray method using Agilent format 4 x 44 K slides and Agilent 8x15 K slides for microRNAs analysis. In order to identify changes in gene expression, it was used the GeneSpring GX program. Gene expression was validated by quantitative PCR real time (qRT-PCR). It was observed a peak in cell culture proliferation at 10 days and a gradual increase in cell viability over the periods. Among the treated surfaces, we observed an increase in the amount of total protein in nanotextured when compared to nano+submicrotextured at 10 days of culture ($p \leq 0,05$), and a progressive increase of alkaline phosphatase activity, with higher activity in nanotextured compared to nano+submicrotextured at 14 days of culture ($p \leq 0,05$). There was

no qualitative difference among the groups with regards to mineralized nodules, although the rough microtexture group showed higher amounts of calcium than the nanotextured group ($p \leq 0,05$). Our results showed a differential expression of 716 mRNAs (fold change $\geq 2,0$ and $p \leq 0,05$) and 32 microRNAs (fold change $\geq 1,5$ and $p \leq 0,01$), with functions associated to the osteogenesis process, mainly mineralization, cell adhesion, apoptosis, cell proliferation and differentiation. The results suggest that, with the protocols used in this investigation, the treatments performed in the titanium surface induce changes in the metabolism of osteoblastic cells, both at the cellular as well as at the gene expression levels.

Keywords: surface modification, osteoblastic cells, gene expression, oligo microarrays.

Sumário

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	27
2. HIPÓTESE	45
3. PROPOSIÇÃO	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Obtenção das diferentes superfícies no titânio	53
4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	54
4.3 Obtenção das células da crista óssea alveolar humana	55
4.4 Métodos de Avaliação das Respostas Celulares	56
4.4.1 Proliferação celular	57
4.4.2 Viabilidade celular	57
4.4.3 Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina	58
4.4.4 Conteúdo de proteína total.....	58
4.4.5 Medidas da atividade de fosfatase alcalina.....	59
4.4.6 Detecção e quantificação de matriz mineralizada	60
4.4.7 Análise estatística	61
4.5 Extração de RNA Total.....	61
4.6 Avaliação da integridade do RNA	63
4.7 Oligo <i>microarrays</i>	65
4.7.1 mRNAs <i>microarrays</i>	65
4.7.2 microRNAs <i>microarrays</i>	69
4.8 Análise dos dados de oligo <i>microarrays</i>	72
4.9 Confirmação dos dados de oligo <i>microarrays</i>	73
4.9.1 Confirmação dos dados de mRNA pela técnica de PCR quantitativa em tempo real	73
4.9.2 Confirmação dos dados de microRNA pela técnica de PCR quantitativa em tempo real.....	75
4.9.3 Análise estatística dos dados de mRNA e de microRNA por PCR quantitativa em tempo real.....	77
5. RESULTADOS	81
5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
5.2 Proliferação Celular.....	81
5.3 Viabilidade Celular	82
5.4 Conteúdo de proteína total.....	83
5.5 Atividade de Fosfatase Alcalina	84

5.6	Formação e quantificação de matriz mineralizada	85
5.7	Avaliação da integridade do RNA total	86
5.8	Análise dos mRNAs diferencialmente expressos	87
5.9	Análise dos microRNAs diferencialmente expressos	91
5.10	Confirmação dos dados de mRNA por PCR quantitativa em tempo real	93
5.11	Confirmação dos dados de microRNA por PCR quantitativa em tempo real	98
6.	DISCUSSÃO.....	105
6.1	Avaliações das Respostas Celulares	105
6.2	Perfis de expressão gênica e validação por qRT-PCR.....	109
7.	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS	127
	ANEXOS	143

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado constituído por células osteogênicas e matriz óssea. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica (35%) e uma parte inorgânica (65%). A matriz orgânica é composta, em sua grande maioria, por proteínas colágenas, como o colágeno tipo I, bem como por proteínas não colágenas, incluindo glicoproteínas, proteoglicanas e fatores de crescimento (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; POLO-CORRALES *et al.*, 2014). Já a matriz inorgânica é composta basicamente por íons de fosfato e cálcio, formando cristais de hidroxiapatita, juntamente com sódio e magnésio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; DOWNEY e SIEGEL, 2006).

As principais células presentes neste tecido são: osteoclastos, osteócitos, osteoblastos e uma linhagem de células osteoprogenitoras. Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas de origem hematopoiética, geralmente localizados na periferia do tecido ósseo, sendo responsáveis pela reabsorção da matriz óssea, tanto em condições normais como patológicas. Através da reabsorção óssea, há a manutenção das concentrações adequadas de íons extracelulares, ou seja, a homeostase do cálcio. Já os osteócitos, os osteoblastos e as células osteoprogenitoras são células de origem mesenquimal. Os osteócitos são osteoblastos envoltos pela matriz e representam 90% das células do tecido ósseo. São células extremamente importantes, sendo

responsáveis pela comunicação celular, manutenção e nutrição do tecido, pois através de seus canalículos presentes na matriz, ocorrem as trocas de íons e moléculas entre os capilares e outros osteócitos e/ou osteoblastos. Já os osteoblastos são os responsáveis pela produção e mineralização da matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; DOWNEY e SIEGEL, 2006; LIAN *et al.*, 2012).

Quando ativos, os osteoblastos são células ovais que contêm uma grande quantidade de organelas, como retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocôndrias e complexo de Golgi, além de microtúbulos, microfilamentos, lisossomos, glicogênio e lipídios. Apresenta-se com um núcleo único e central (DOWNEY & SIEGEL, 2006). Os osteoblastos inicialmente expressam e secretam proteínas da matriz extracelular sob a forma de uma matriz óssea não mineralizada, também conhecida como osteoide. Sequencialmente, ocorre a maturação do osteoide, formando uma estrutura que é mais forte e mais estável. Fibrilas de colágeno tipo I são os principais componentes do osteoide; posteriormente, no interior e entre estas são depositados cristais de hidroxiapatita, formando a matriz óssea mineralizada (DOWNEY e SIEGEL, 2006; LIAN *et al.*, 2012; POLO-CORRALES *et al.*, 2014).

A mineralização da matriz confere a este tecido extrema dureza. No entanto, o osso é uma estrutura altamente dinâmica, que sofre remodelação constante durante toda a vida do indivíduo. Todo o processo de remodelação do tecido ósseo é dependente da ação conjunta de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; LIAN *et al.*, 2012).

Em resposta a forças mecânicas e aos níveis de cálcio e fósforo no sangue, o tecido ósseo é continuamente remodelado (LIAN *et al.*, 2012). A partir do momento em que o equilíbrio entre a reabsorção e a deposição torna-se negativo, ou seja, a quantidade de reabsorção excede a deposição, problemas patológicos começam a surgir, como por exemplo a osteoporose (DOWNEY e SIEGEL, 2006).

Figura 1. Processo de remodelação e regulação da homeostase do tecido ósseo (adaptado de LIAN *et al.*, 2012).

Durante a década de 1950, Branemark estudou a osseointegração do osso com o titânio, tendo observado que o tecido ósseo possui a capacidade de se unir de forma estável e funcional com este material (BRANEMARK, 1968; BRANEMARK *et al.*, 1969). Este fenômeno ocorre pois há migração das células ósseas para a superfície deste metal, e a formação de um tecido ósseo organizado e saudável (SCHWARTZ e BOYAN, 1994).

Inicialmente, as pesquisas focavam a adesão de células osteoblásticas e a formação de tecido ósseo mineralizado sobre o titânio (GOTO *et al.*, 2004). Atualmente, vários investigadores têm se aprofundado neste tema, buscando o entendimento dos fatores envolvidos na adesão de osteoblastos ao substrato e na propagação e proliferação dos osteoblastos em materiais. Interações entre as células e as proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, osteopontina, osteocalcina, têm importância na adesão celular e na reorganização dos microfilamentos de actina, além de influenciar o citoesqueleto, a morfologia celular e a migração (GOTO *et al.*, 2004). Terapias com fatores de crescimento em tecido ósseo foram aplicadas para induzir a formação de osso novo nos defeitos ósseos, em locais de fratura, e adjacente a dispositivos de implantes (SCHLIEPHAKE, 2002; KLOEN *et al.*, 2003; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Figura 2. Cinco passos iniciais de fixação e subsequente comportamento celular no biomaterial (adaptado de GOTO *et al.*, 2004).

No processo de diferenciação de osteoblastos durante a osseointegração, várias proteínas da matriz extracelular do tecido ósseo são produzidas. A fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e a osteocalcina (OCN) são proteínas expressas durante a mineralização do tecido ósseo e vistas como importantes marcadores da osteogênese (HARA *et al.*, 2012).

O desenvolvimento do osso, incluindo a diferenciação celular, crescimento e reparo, é controlado por fatores genéticos. A atividade gênica regula a diferenciação celular durante o desenvolvimento ósseo, assim como sua morfogênese (DOWNEY e SIEGEL, 2006). Métodos utilizando tecnologias como oligo *microarray* e PCR (*polymerase chain reaction*) em tempo real também estão sendo muito utilizados para identificar, analisar e estudar genes determinantes ou novos genes envolvidos na osteogênese (KIM *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2008; YAMAMICHI *et al.*, 2008; BOMBONATO-PRADO *et al.*, 2009).

Titânio

Nas últimas décadas, a Ortopedia e Cirurgia Oral e Maxilofacial vêm utilizando o titânio e suas ligas como materiais metálicos de escolha. Esta grande utilização é devido à sua excelente biocompatibilidade, atribuída principalmente a fatores como: 1) melhor adaptação de suas propriedades mecânicas (especialmente módulo de elasticidade) ao tecido ósseo; 2) por possuir uma superfície recoberta por uma camada de óxido de espessura de

alguns nanômetros, responsável pela resistência à corrosão do material e 3) por ser biologicamente inerte *in vivo* (BOZZINI *et al.*, 2008; POPA *et al.*, 2008). Este comportamento permite que haja boa osseointegração do material, especialmente em pacientes saudáveis (BHOLA *et al.*, 2011).

Devido às características favoráveis do titânio, este vem sendo utilizado na Odontologia com diversas finalidades, desde a substituição de elementos dentais por meio de implantes dentários (TAKAHASHI *et al.*, 2008), como também na confecção de estruturas metálicas em próteses parciais removíveis (TORRES *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010; KOIKE, 2012), ou mesmo no reparo de danos faciais por doenças ou traumas (FUJIMOTO, 2011; KUNG, 2012).

Entretanto, diversos fatores podem interferir na osseointegração, como localização, suprimento sanguíneo, qualidade e quantidade de tecido ósseo, determinando o sucesso ou o fracasso dessa terapia (TOLSTUNOV, 2007). Além disso, a morfologia, topografia e composição química de superfícies do titânio influenciam grandemente os eventos celulares e extracelulares que ocorrem durante o processo de osseointegração (BOYAN *et al.*, 1998; NISHIO *et al.*, 2000).

Problemas precoces com os implantes e problemas de cicatrização podem ocorrer em pacientes que apresentam fatores predisponentes, como hábitos nocivos (fumo), doenças crônicas, como diabetes e osteoporose, ou inflamações crônicas (ESPOSITO *et al.*, 1998; VAN STEENBERGHE *et al.*, 2002; VANDAMME *et al.*, 2011). Além do mais, o aumento gradual do tempo de vida da população leva a um aumento do número de pacientes com qualidade

óssea deficiente, aumentando a exigência de revisões após a cirurgia primária (JOHNSSEN *et al.*, 2006). Todos estes desafios requerem uma superfície de excelência, para que ocorra interação osso-biomaterial adequada e funcional (BHOLA *et al.*, 2011). Sendo assim, a procura por um material que tenha alta biocompatibilidade, resistência à corrosão e ausência de indução de reações imunológicas recai sobre o titânio, culminando com a promoção da osseointegração (PALAIOLOGOU *et al.*, 2012).

Juntamente com os problemas de cicatrização, o titânio comercialmente puro (Ti cp) e a liga Ti-6Al-4V (Ti G5) apresentam outras limitações para aplicações biomédicas. Uma das limitações está relacionada à grande diferença entre os módulos de elasticidade do titânio e do osso, resultando em um fenômeno conhecido como *stress shielding* (NIINOMI e NAKAI, 2011; ELIAS *et al.*, 2013). Este fenômeno refere-se à redução da densidade óssea (osteopenia) como resultado da remoção de tensão normal do osso por um implante (NIINOMI e NAKAI, 2011). A baixa resistência mecânica do Ti cp é outra limitação que dificulta a fabricação de implantes osseointegráveis com paredes finas (ELIAS *et al.*, 2013).

A capacidade de promover interação com os tecidos adjacentes, promover melhores respostas biológicas e orientar processos celulares ao longo de vias predeterminadas são os principais objetivos de um biometrial (VARIOLA *et al.*, 2009). Em busca de melhorar ainda mais estas condições, observou-se que, independente do tipo de biomaterial, a topografia pode determinar a resposta celular (KRIPARAMANAN *et al.*, 2006). A topografia da superfície é reconhecida como um fator capaz de alterar a resposta das células dos tecidos

adjacentes, modificando a migração, inserção, proliferação e síntese de colágeno no local (BHOLA *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012). Em adição à topografia, a superfície química é outra variável chave para aposição óssea peri-implantar (LEE *et al.*, 2012).

Uma variedade de técnicas está sendo desenvolvida para produzir mudanças na superfície do titânio e promover um maior crescimento e fixação do tecido ósseo ao material. Jateamento de superfície, ataque ácido e a combinação das duas técnicas, anodização, laser e *spray* de plasma são métodos amplamente utilizados para promover mudanças na superfície topográfica (MALUF *et al.*, 2007; FERGUSON *et al.*, 2008; WENNERBERG e ALBREKTSSON, 2009; LEE *et al.*, 2012). A variação do tempo e da temperatura de condicionamento por ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), assim como a mudança de proporção entre ácidos e bases, permitem a obtenção de diferentes superfícies metálicas com aspectos nanotopográficos (VARIOLA *et al.*, 2009; VETRONE *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram a influência dos diferentes tipos de tratamentos, e evidenciaram como as superfícies obtidas influenciam os padrões de formação óssea, comportamento das células e até mesmo o tipo cicatricial obtido a partir da conformação dos tecidos adjacentes às superfícies dos implantes (BHOLA *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2011; COLOMBO *et al.*, 2012; SVERZUT *et al.*, 2012).

Tratamentos químicos com ácidos e oxidantes podem melhorar a adesão e proliferação de células osteogênicas (QU *et al.*, 2007), precipitação de apatita e a expressão de genes relacionados à osteogênese (CHAKRAVORTY *et*

al., 2012; COLOMBO *et al.*, 2012). Sendo assim, modificações superficiais como jateamento e tratamento químico com ácidos têm sido usadas para modificar a topografia em microescala e estimular a resposta celular tecidual (VETRONE *et al.*, 2009; KUBIES *et al.*, 2011; BONFANTE *et al.*, 2011). A influência das características superficiais do titânio no comportamento celular, de biomoléculas ou em sua morfologia tem sido amplamente investigada, mas ainda existem questões em aberto sobre a sua interação com diferentes células em um microambiente.

O estudo com culturas celulares é considerado uma ferramenta útil, devido à possibilidade de estudo da interação célula e matriz com a superfície do titânio (RAUSCH-FAN *et al.*, 2008). Maeda *et al.* (2007) comprovaram a eficiência de superfícies de titânio utilizadas como arcabouços na adesão, proliferação e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais de ratos. Colombo *et al.* (2012) demonstraram que a resposta celular de células da medula óssea de ratos, assim como a expressão de citocinas e fatores de crescimento importantes na regulação da reparação óssea, avaliada por meio de PCR em tempo real, foram influenciadas por diferentes superfícies de titânio. Em mais um estudo, observou-se a estimulação da proliferação e da atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas da calvária de fetos de ratos em contato com titânio de superfície bioativa (AHT - *alkali- and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium*), quando comparado ao titânio comercialmente puro (LEE *et al.*, 2012).

Grande quantidade de estudos clínicos e *in vivo* também vêm sendo feitos para avaliar a reação do tecido ósseo, a síntese de matriz extracelular

pelas células osteoblásticas e a mineralização da matriz, através da comparação de diversas superfícies de titânio. Entre eles, Sverzut *et al.* (2012) analisaram o crescimento do tecido ósseo em contato com implantes osseointegráveis de titânio com superfícies modificadas por plasma (ASD-AK - *anodic spark deposition*) implantados em mandíbulas de cachorros. Além disso, investigações sobre o efeito da implantação de diferentes superfícies de titânio em animais ovariectomizados foram feitas com o intuito de se observar a osseointegração em casos de osteoporose (KUBO *et al.*, 2009; YILDIZ *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2011). Entre estes estudos, podemos citar Xiao *et al.* (2011), os quais observaram que implantes tratados com ácido fluorídrico e anodização para formar uma superfície micro/nanotexturizada apresentaram melhor osseointegração em mandíbulas de ovelhas ovariectomizadas após doze semanas de implantação.

Oligo microarrays

Transcriptoma é um termo utilizado para se referir ao conjunto de RNAs, ou seja, os transcritos de um célula, e pode variar segundo o momento, estado fisiológico, estímulos físicos, químicos, biológicos ou doenças. O transcriptoma engloba o RNA mensageiro (mRNA), RNA transportador (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA). Como os mRNAs são os responsáveis pela codificação da síntese de proteínas, eles representam o centro dos interesses da pesquisa de genômica funcional. No entanto, recentemente, houve a descoberta de novos

RNAs, como os microRNAs (miRNAs) e os pequenos RNA nucleares (snRNAs) (GRIFFITHS *et al.*, 2009).

Os miRNAs, recentemente descobertos, são constituídos de pequenos RNAs de aproximadamente 22 nucleotídeos que induzem a degradação ou a repressão translacional (LEE *et al.*, 1993). Consequentemente, estão envolvidos na regulação da expressão gênica pós transcricional (BARTEL, 2004; LIM *et al.*, 2005; KIM e NAUM, 2006; KIM *et al.*, 2009; HAUSSER e ZAVOLAN, 2014). Apesar de ser uma descoberta relativamente recente, sabe-se que os miRNAs são uma das classes mais abundantes de moléculas reguladoras de genes em organismos multicelulares e influenciam muitos genes codificadores de proteínas (BARTEL, 2004), possuindo a capacidade de se ligar a centenas de sítios em todo o transcriptoma (HAUSSER e ZAVOLAN, 2014).

Os miRNAs também têm importante papel na manutenção da estrutura da cromatina, por mediar a expressão gênica e estabilidade genômica (GUIL e ESTELLER, 2009), além de estarem envolvidos em numerosos processos biológicos, como apoptose (LYNAM-LENNON *et al.*, 2009) e progressão do ciclo celular (BUENO *et al.*, 2008).

Em busca de se medir a concentração relativa dos transcritos e analisar o quanto cada gene está expresso em células e tecidos, algumas metodologias como Northern blot, dot blots e RT-PCR (*real time* PCR) foram desenvolvidas. Entretanto, todas estas metodologias apresentam a desvantagem de analisarem poucos genes de cada vez (FELIX *et al.*, 2002).

A tecnologia dos oligo *microarrays* é uma das últimas inovações e tornou-se uma ferramenta padrão em muitos laboratórios de pesquisa genômica,

pois revolucionou a abordagem da investigação biológica (LEUNG e CAVALIERI, 2003).

Os oligo *microarrays* constituem uma tecnologia que possibilita a mensuração da expressão de mRNA de centenas ou mesmo milhares de genes em um único ensaio de hibridização, tornando-se uma ferramenta atrativa para a obtenção de uma visão global do estado de células em termos de expressão transcricional em grande escala (transcriptoma) em diferentes situações fisiológicas ou patológicas (PÄÄKKÖNEN e TJÄDERHANE, 2010).

Por volta dos anos 90, a *Affymetrix* desenvolveu métodos para síntese de polímeros espacialmente localizados em superfícies, abrindo caminho para o desenvolvimento dos *microarrays*. Hoje, várias tecnologias coexistem para fazer DNA *microarrays* espacialmente dissociados. A *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, EUA) utiliza a impressão baseada em jato de tinta de nucleotídeos em uma superfície, ou seja, pela síntese direta de sondas de oligonucleotídeos em lâminas de vidro previamente preparadas por um sistema de impressão, conhecido como SurePrint (KOSURI e CHURCH, 2014).

Atualmente, para a realização de oligo *microarrays* estão sendo utilizadas diferentes plataformas por meio de *chips* que contêm todo o genoma de diferentes espécies (humano, rato, camundongo e *Drosophila melanogaster*) ou de miRNAs conhecidos até o momento. Estes *chips* são lâminas de vidro nas quais sondas são sintetizadas e fixadas de forma ordenada. Cada lâmina contém milhões de cópias de um determinado transcrito, ou um segmento gênico em particular. Todo o desenvolvimento nesta área de oligo *microarray* permitiu o uso

cada vez maior e a custo mais baixo de oligos sintetizados em uma matriz (GUINDALINI e TUFIK, 2007; KOSURI e CHURCH, 2014).

O princípio da técnica baseia-se principalmente na propriedade de hibridização por complementaridade dos ácidos nucleicos com as sondas do *array* que apresentarem sequências similares às dos genes de interesse. Para a realização dos experimentos, os nucleotídeos são marcados com fluoróforos, e, após a hibridização, a lâmina hibridizada é corada e submetida a um *scanner*, conectado a um *software* específico que analisa os dados e quantifica a intensidade da fluorescência em cada ponto (GUINDALINI e TUFIK, 2007) .

Com a realização do experimento e a determinação do perfil de expressão gênica, é possível avaliar quais os genes envolvidos e quais suas intensidades de expressão num determinado momento e processo biológico. É importante salientar que o número de genes expressos em uma célula é dependente das condições ambientais e de desenvolvimento. Em geral, somente uma fração de genes pode ser expressa em um determinado momento em uma célula ou tecido (PÄÄKKÖNEN e TJÄDERHANE, 2010).

Além disso, ferramentas como o oligo *microarray* podem ser utilizadas para a identificação de genes modulados em células em contato com biomateriais. Entre vários estudos (YAMAMICHI *et al.*, 2008; PALMIERI *et al.*, 2008; BOMBONATO-PRADO *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2006), podemos citar o exemplo de Vlacic-Zischke *et al.* (2011), que observaram uma diminuição da proliferação osteoblástica correlacionada com um aumento na expressão de marcadores da diferenciação osteogênica, como a sialoproteína óssea II e

osteocalcina, quando em contato com titânio microtexturizado, através do oligo *microarray*.

Atualmente, a busca de informações sobre os padrões de expressão gênica está aumentando, com o intuito de determinar os papéis funcionais dos genes e viabilizar sua aplicação em terapias celulares. Hara *et al.* (2012) instalaram implantes com topografias diferentes no fêmur de ratos e, por meio de RT-PCR, verificaram que as diferentes topografias da superfície dos implantes exercem influência na expressão de genes como fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCN), conhecidos como importantes marcadores ósseos. Em outro estudo, pode-se observar pela análise da adesão e proliferação, juntamente com a avaliação da expressão gênica de uma linhagem de células osteoblásticas (MC3T3-E1) em contato com a zircônia e o titânio, que a zircônia obteve respostas biológicas e níveis de expressão similares ao titânio (GONG *et al.*, 2013).

Os miRNAs estão envolvidos na regulação gênica que coordena um amplo espectro de processos biológicos, incluindo crescimento, diferenciação e morte celular, controle metabólico e atividade funcional das células, indicando seu papel relevante no tecido ósseo (LIAN *et al.*, 2012). Por esta razão, houve um aumento na busca para melhor determinar as funções dos miRNAs, inclusive seu envolvimento na osteogênese. Vários estudos vêm demonstrando que os miRNAs desempenham funções importantes durante a proliferação, diferenciação e apoptose dos osteoblastos (ZHOU *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2013; MOORTHY *et al.*, 2013; VAN WIJNEN *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014).

O estudo do perfil de expressão dos miRNAs e sua potencial regulação na diferenciação osteogênica também estão sendo feitos para analisar a influência de diferentes superfícies de titânio e de outros biomateriais (CHAKRAVORTY *et al.*, 2012; MOORTHY *et al.*, 2013).

2. *Hipótese*

2. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é a de que o contato de células osteoblásticas provenientes da crista óssea alveolar humana com superfícies de titânio modificadas quimicamente possa influenciar o metabolismo celular e o perfil de expressão de genes associados à osteogênese.

3. *Proposição*

3. PROPOSIÇÃO

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferenças na resposta celular de células humanas do osso alveolar cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio por meio de ensaios bioquímicos e de expressão gênica.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar, por meio de ensaios bioquímicos: i) proliferação celular, ii) viabilidade celular, iii) atividade de fosfatase alcalina, iv) quantidade de proteína total, v) detecção e quantificação de nódulos mineralizados.
- Identificar os perfis de expressão de mRNAs (transcriptoma) de células osteoblásticas em contato com as diferentes superfícies de titânio, utilizando a tecnologia de oligo *microarray*.
- Identificar os perfis de expressão de microRNAs (miRNoma) de células osteoblásticas em contato com as diferentes superfícies de titânio, utilizando a tecnologia de oligo *microarray*.

4. *Material e Métodos*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das diferentes superfícies no titânio

Discos de titânio comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro por 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil) e usinados passaram por um processo de padronização por meio de lixas d'água (3M, Sumaré, SP, Brasil) e polimento em feltro. A sequência de lixamento iniciou-se com uma lixa grossa e, consecutivamente, com lixas mais finas: 320, 500, 800, 2500 e 4000 (quanto maior o número da grana, mais fina é a lixa). Os discos de titânio foram lixados na Máquina Exakt 400 CS (Exakt Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Alemanha) do Laboratório de Histologia do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia. Posteriormente, foi realizado, manualmente, o polimento dos discos em feltro com partículas abrasivas de alumina em pasta (Al_2O_3) de 0,05 μm (Arotec S/A, Cotia, SP, Brasil).

Com o término do lixamento e polimento, os discos foram lavados no aparelho Ultrasonic Cleaner 1440D (Odontobras) em três soluções diferentes: i. água destilada + detergente; ii. álcool 70%; e iii. água destilada, sendo cada lavagem realizada por um período de 30 minutos.

Para obtenção das superfícies de titânio foram utilizados ácido sulfúrico concentrado (95-97%, equivalente a 36 N) ($\text{H}_2\text{SO}_4^{\text{conc}}$) e 30% de peróxido de hidrogênio aquoso (Fisher Scientific) ($\text{H}_2\text{O}_2^{\text{aq}}$) seguindo as instruções de Variola *et al.* (2009).

O preparo das soluções $\text{H}_2\text{SO}_4^{\text{conc}}/\text{H}_2\text{O}_2^{\text{aq}}$ foi realizado em um béquer seguido da adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio. Movimento constante foi realizado para garantir uma mistura homogênea dos dois componentes. As soluções foram resfriadas em gelo para reduzir sua temperatura ao valor desejado, devido à grande quantidade de calor gerada durante a mistura. Os condicionamentos a 25°C e 50°C foram realizados imergindo-se o béquer em banho isotérmico colocado sobre uma placa quente com controle de *feedback* automático (Figura 3) (Ecotherm HS40, Torrey Pines Scientific). Após o equilíbrio térmico ser alcançado, os discos de titânio foram colocados no béquer por uma hora. Após o condicionamento, os discos foram lavados em água destilada e secos ao ar para posteriormente serem esterilizados para seu uso na cultura celular.

Figura 3. Para controlar a temperatura da solução, o bequer foi imerso em água mantida na temperatura desejada por uma placa quente com controle de *feedback*.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da morfologia das superfícies dos discos de titânio foi realizada na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o microscópio ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15kV.

4.3 Obtenção das células da crista óssea alveolar humana

Os experimentos com cultura de células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP-USP (CAAE - 0051.0.138.000-11 / CEP - 2011.1.1015.58.6).

Fragmentos de osso alveolar humano (explante) descartados de procedimentos cirúrgicos realizados na Clínica de Cirurgia da FORP-USP foram obtidos de doadores saudáveis (n=3). As células foram isoladas e cultivadas de acordo com métodos descritos por Mailhot e Borke (1998) e Maniatopoulos *et al.* (1988), com protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

Resumidamente, os explantes de osso alveolar foram triturados, transferidos para um tubo de centrifuga estéril para digestão com collagenase tipo II (Gibco) na concentração de 1mg/mL, colocados em banho de água a 37°C sob agitação constante. Após trinta minutos de digestão, o sobrenadante foi extraído e transferido para outro tubo de centrifuga contendo uma quantidade igual de meio de cultura. Este procedimento de digestão com collagenase foi

realizado seis vezes. Os sobrenadantes das duas primeiras digestões foram descartados e os das últimas quatro digestões foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. As células e os explantes foram ressuspensos e colocados em garrafas de cultura com α -MEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), dexametasona a 10^{-7} M (Sigma), 20 μ g/mL de ampicilina e 50 μ g/mL de vancomicina (Gibco), 0,3 μ g/mL de fungizone (Gibco), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco) e 7 mM β -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Após atingir a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), contadas utilizando um hemocítômetro, e a primeira passagem foi utilizada para cultivo em placas de 24 poços a uma densidade celular de 2×10^4 células por poço.

Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas em ambiente úmido com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Os grupos experimentais foram divididos em: 1) células cultivadas sobre discos de titânio polidos, 2) células cultivadas sobre discos de titânio com nanotextura; 3) células cultivadas sobre discos de titânio com nano+submicrotextura e 4) células cultivadas sobre discos de titânio com microtextura rugosa.

4.4 Métodos de Avaliação das Respostas Celulares

As células foram plaqueadas numa concentração de 2×10^4 células por poço em placas de 24 poços (n=5). Foram avaliados os parâmetros descritos abaixo:

4.4.1 Proliferação celular

Ao final de 7, 10 e 14 dias em cultura, o meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) aquecida a 37°C para retirar as células não aderidas. Em seguida, foram preenchidos com 1,5 mL de uma solução de EDTA 1 mM e tripsina 0,25%, para remover as células aderidas. Amostras dessa suspensão de células em solução enzimática foram utilizadas para contagem do número de células. Alíquotas das soluções de cada poço foram incubadas por 5 minutos com o mesmo volume de 1% de azul de Trypan (Sigma), que cora as células não viáveis, e as células viáveis foram contadas utilizando o aparelho *Countess automated cell counter* (Invitrogen) (Figura 4). A proliferação celular é expressa em número de células viáveis contadas.

Figura 4. Aparelho *Countess automated cell counter* utilizado na contagem de células.

4.4.2 Viabilidade celular

Ao final de 7, 10 e 14 dias em cultura, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT (*3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). As células foram incubadas com 10% de MTT (5 mg/mL) em meio de cultura a 37°C por 4 horas. O meio foi então aspirado do poço, e 1 mL de isopropanol (0,04 N HCl em isopropanol) foi adicionado a cada poço. As placas foram colocadas em um agitador por 5 minutos e 200 µL desta solução foi transferida a uma placa de 96 poços. A densidade óptica foi lida a 570 nm no leitor (µQuant; Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA), e os dados foram apresentados em absorbância.

4.4.3 Conteúdo de proteína total e atividade de fosfatase alcalina

Após remoção do meio de cultura, os poços contendo as células aderidas foram lavados três vezes com PBS (1,5 a 2 mL) aquecida a 37°C, para remoção das células não aderidas e do meio de cultura sobressalente. Em seguida, os poços foram preenchidos com 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) e deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final deste tempo, a solução de lauril sulfato de sódio 0,1% contida em cada poço foi utilizada para a determinação do conteúdo de proteína total e da atividade de ALP.

4.4.4 Conteúdo de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada seguindo o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Para isso, 1 mL da amostra contida em cada poço da placa de cultura foi transferida ao respectivo tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, uma alíquota de 0,5 mL da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteu (Sigma) foi adicionada aos tubos de ensaio, os quais foram submetidos à agitação e deixados em repouso à temperatura ambiente para desenvolvimento da coloração azul. Após 30 minutos, a absorbância de cada tubo foi determinada em um espectrofotômetro (CE3021-Cecil, UK) em comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado aos 7, 10 e 14 dias com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma). Os resultados foram utilizados para normalização da ALP.

4.4.5 Medidas da atividade de fosfatase alcalina

A atividade de ALP foi determinada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando-se um *Kit* comercial (Labtest Diagnostica SA, Brazil) e seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio devidamente identificados para os grupos teste, padrão e branco. Em todos os tubos foram adicionados 0,05 mL de substrato e 0,5 mL de solução tampão. Somente no tubo padrão foi acrescentado 0,05 mL da solução padrão. Posteriormente, todos os tubos foram

colocados em banho de água a 37°C para a realização do experimento. Alíquotas de 0,05 mL das amostras foram adicionadas aos respectivos tubos teste, etapa que foi realizada em um intervalo máximo de dez minutos. Decorridos dez minutos, foram adicionados aos tubos testes, padrão e branco 2 mL do reagente de cor e em seguida a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (CE3021-Cecil) no comprimento de 590 nm. A atividade de ALP foi determinada aos 7, 10 e 14 dias e os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total.

4.4.6 Detecção e quantificação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 21 dias de cultura. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecida a 37°C, preenchidos com 2 mL de formalina 10% e mantidos a 4°C. Decorridas 24 horas, após remoção da formalina, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em séries crescentes de álcoois (30°GL, 50°GL, 70°GL e 100°GL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica foi de 1 hora. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio foram evidenciadas pela coloração vermelha.

Para quantificação da coloração segundo método de Gregory *et al.* (2004), 150 µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos de

1,5 mL e agitadas em vórtex por 30 segundos. Em seguida, 100 µL de óleo mineral foi adicionado à amostra para evitar evaporação, que foi aquecida a 85° C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, posteriormente adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10% e 150 µL do sobrenadante foram utilizados para leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de alizarina de 0,5 a 3 mM em acetato de amônia (10% de ácido acético glacial e 5M de hidróxido de amônia).

4.4.7 Análise estatística

Os dados relativos aos parâmetros de análise de diferenciação celular acima especificados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Os dados foram submetidos aos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para comparação de cada um dos parâmetros avaliados. Foi utilizado o software estatístico SPSS 17.0 e a significância foi fixada em 5%.

4.5 **Extração de RNA Total**

A fim de prevenir a contaminação por ribonucleases durante a extração e manuseio dos RNAs, toda a vidraria, tubos plásticos, espátulas e pinças utilizadas foram previamente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado usando luvas de látex sem talco e descartáveis.

Para a extração de RNA total das células osteoblásticas utilizamos o *mirVana miRNA Isolation Kit*® (Ambion, USA), o qual permite a separação simultânea de RNAs de baixo peso molecular (≤ 200 nt, incluindo os miRNAs de aproximadamente 23 nt) e de RNAs de alto peso molecular (≥ 200 nt, incluindo os mRNAs). Este *kit* utiliza um eficiente filtro de fibra de vidro (GFF), que isola facilmente o RNA total e os pequenos RNAs.

Foram adicionados 1.000 μL de solução de lise em cada amostra, com vigorosa agitação por meio de um aparelho tipo vórtex, para a lise completa das células (lisado celular). Em seguida, foram adicionados 100 μL de *miRNA Homogenate Additive* com agitação no vórtex por 15 segundos e permanência em gelo picado por 10 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 1.000 μL de fenol:clorofórmio ácido com agitação vigorosa no vórtex por 60 segundos. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente para a formação de uma fase aquosa contendo os RNAs em solução. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual adicionou-se 1,25x seu volume com etanol 100% à temperatura ambiente.

Para cada amostra foi montada uma coluna em um tubo coletor, no qual 700 μL da mistura lisado/etanol foram pipetados na coluna e centrifugados por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até a filtração de toda a mistura. Em seguida, foram adicionados 700 μL de *miRNA Wash Solution 1* à coluna, com posterior centrifugação por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 μL de *miRNA Wash Solution 2/3* foram aplicados à coluna e centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g. Repetiu-

se o último passo e, após descartar o líquido, centrifugou-se por 1 minuto para remoção de resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 100 μ L de água DEPC pré-aquecida (95°C). Após centrifugação por 30 segundos para eluição do RNA, o mesmo foi conservado a -80°C .

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-VIS* (NanoDrop Technologies), sendo que 1 U A260 corresponde a 40 μg de RNA/mL.

4.6 Avaliação da integridade do RNA

A integridade das moléculas de RNA foi avaliada por eletroforese microfluídica em nanochips, usando o *kit RNA nano 6000* em aparelho *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figura 5).

Figura 5. Aparelho *Bioanalyzer 2100* Agilent e *RNA 6000 Nano Chips* utilizados na eletroforese microfluídica.

Antes do início do preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam a 4°C, foram mantidos por 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o preparo do gel foi realizado pipetando-se 550 µL do *RNA 6000 Nano gel* numa coluna com filtro e centrifugando por 1.500 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 µL foi colocada em um tubo de 0,5 mL livre de nuclease, com adição de 1 µL de *RNA 6000 Nano Dye* em vórtex por 10 segundos e posterior centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, foi iniciado o preparo do *RNA 6000 Nano chip*, o qual foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos para a leitura de RNAs. Primeiramente, pipetou-se 9 µL da mistura gel/dye na região G indicada no *chip* e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o *chip*. Em seguida, foram pipetados outros 9 µL da mistura nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se ainda 1 µL do marcador na posição indicada e 5 µL do *RNA 6000 Nano Marker* em cada uma das 12 amostras, bem como na posição do marcador. Por último, pipetou-se 1 µL de cada amostra nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e, com a ajuda de um vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, CHN), agitou-se o *chip* horizontalmente a 2.200 rpm por 1 minuto e, em seguida, colocou-se o *chip* no bioanalisador. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletrograma e densitometria dos géis) em 10 minutos de corrida eletroforética.

Após a eletroforese, um valor de integridade (*RNA integrity number* – RIN) é fornecido, o qual varia em uma escala de zero a dez. Somente as

amostras que apresentaram picos correspondentes aos padrões de bandas de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAr 5S e RNAt 4S e com RIN ≥ 9.0 foram utilizadas.

4.7 Oligo *microarrays*

4.7.1 mRNAs *microarrays*

Os oligos *microarrays* completos da *Agilent* formato 4 x 44k (Figura 6) são preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual 44.000 oligos de 60-mer são sintetizados *in situ* em lâminas de vidro (2,5 x 7,5 cm) especialmente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a fixação de oligonucleotídeos, sintetizando-os base a base com extrema precisão, utilizando arquivos de sequências de mRNAs a partir de banco de dados.

Figura 6. *Agilent microarrays* no formato 4 x 44k contendo oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de mRNAs.

A marcação das amostras foi feita com a utilização do *Quick Amp Labeling Kit One-Color* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O primeiro passo envolveu a diluição do *Agilent One-Color Spike-Mix*. Inicialmente, este foi aquecido a 37°C em banho-maria por 5 minutos, homogeneizado por meio de agitação e depois centrifugado brevemente antes do uso. Em seguida, foram feitas diluições seriadas segundo recomendação do fabricante, levando em consideração a quantidade inicial de RNA total. Feitas as diluições, foi realizado o protocolo de marcação das amostras. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e posteriormente em gelo por 5 minutos.

Durante o período de incubação, um *cDNA Master Mix* (por lâmina) foi preparado a partir de 18 µL do 5X *First Strand Buffer* (pré-aquecido a 80°C por 4 minutos), sendo adicionados 9 µL de 0,1M DTT; 4,5 µL de 10mM dNTP *mix*; 4,5 µL MMLV-RT e 2,3 µL de *RnaseOut*, sendo distribuído um volume de 8,5 µL do *mix* em cada tubo de amostra. Após homogeneização as amostras foram incubadas a 40°C em um banho-maria por 2 horas.

Ao final deste período de incubação, as amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C, incubadas por 15 minutos e posteriormente colocadas em gelo permanecendo incubadas por mais 5 minutos.

Imediatamente antes do uso foi preparado um *Transcription Master Mix* (por lâmina) a partir de 68,9 µL de água livre de nucleases; 90 µL de 4X *Transcription Buffer*; 27 µL de 0,1M DTT; 36 µL de NTP *mix*; 28,8 µL de 50% PEG (pré-aquecido a 40°C por 1 minuto); 2,3 µL de *RNaseOut*; 2,7 µL de *Inorganic pyrophosphatase*; 3,6 µL de *T7 RNA Polymerase* e 10,8 µL de *Cyanine*

3-CTP. Cada tubo de amostra recebeu 60 μ L *Transcription Master Mix* e, após homogeneização, foi incubado a 40°C em um banho-maria por 2 horas.

O passo que sucede à incubação envolve a purificação do RNA amplificado e marcado. Para tal procedimento foi utilizado o *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Um passo inicial de limpeza do RNA foi realizado adicionando-se 3,5X o volume da reação (280 μ L) do tampão RA1 em cada amostra. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 280 μ L de etanol 100% (equivalente também a 3,5X o volume da reação), com posterior homogeneização.

A purificação do RNA foi realizada através de minicolunas *RNAspin*, aplicando-se o volume total (640 μ L) de cada amostra na coluna, seguido de centrifugação por 30 segundos a 8000 xg. Cada coluna foi então transferida para um outro tubo coletor. Os passos de dessalinização da membrana sílica, digestão do DNA, lavagem e secagem da membrana sílica recomendados pelo *kit* não foram utilizados. A purificação foi retomada a partir da segunda lavagem aplicando-se 600 μ L do tampão RA3 em cada coluna, seguido de uma centrifugação de 1 minuto a 11000 xg. O líquido foi descartado e a coluna foi posta novamente no tubo para uma terceira lavagem, aplicando-se 250 μ L do tampão RA3, seguido de centrifugação por 2 minutos a 11000 xg.

O último passo do *kit* envolveu a eluição do RNA em alta concentração, adicionando-se 40 μ L de água livre de nucleases, seguido de centrifugação por 1 minuto a 11000 xg.

Em seguida, o RNA foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-VIS* (*NanoDrop Technologies*) e foi feito o cálculo para a massa total.

Além disso, foi detectada a incorporação do fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras através da leitura por pmol/ μ L. O valor da incorporação total dividido pela massa total fornece um valor que serve como referência para o prosseguimento do passo de hibridação. Somente as amostras que obtiveram valores acima de 9 foram utilizadas.

Anteriormente ao passo de hibridação, as amostras passaram por um processo de fragmentação utilizando o *Fragmentation mix* para 4x44K *microarrays*. Cada amostra contendo 1,65 μ g de RNA marcado e amplificado (cRNA) recebeu 11 μ L de 10X *Blocking Agent* (preparado com a adição de 500 μ L de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos). Nesse momento, o volume da reação não deve ser superior a 52,8 μ L, sendo necessário completar cada amostra com o volume de água livre de nucleases correspondente. Por último, adicionou-se 2,2 μ L de 25X *Fragmentation Buffer* em cada tubo, sendo o volume final da reação de 55 μ L. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60°C por 30 minutos.

Após a incubação, seguindo a recomendação do *kit* para lâminas de *microarrays* 4x44K, adicionou-se 55 μ L do 2X GEx *Hybridization Buffer HI-RPM* em cada tubo e, após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13000 xg. Um volume de 100 μ L de cada amostra foi utilizado imediatamente para o processo de hibridação no forno a 65°C em rotação durante 17 horas.

Após a hibridação, as lâminas passaram por um processo de lavagem na seguinte ordem: tampão 1 (GE *Wash Buffer 1* - 0,005% Triton X-102) por 1 minuto à temperatura ambiente; tampão 2 (GE *Wash Buffer 2* - 0,005% Triton X-

102) por 1 minuto a 37°C. Ambas as lavagens foram feitas em um agitador com o uso de barras magnéticas. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos à temperatura ambiente e, por último, na solução *Stabilization and Drying* por 30 segundos à temperatura ambiente, de modo a prevenir a degradação da Cianina 3 (Cy3) pelo ozônio. Após serem retiradas da solução, as lâminas foram escaneadas imediatamente, evitando o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais, através do *DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies)* e os dados foram extraídos através do *Agilent Feature Extraction Software*.

4.7.2 microRNAs microarrays

Para a obtenção do perfil de expressão dos miRNAs foram utilizados os *microarrays Agilent 8x15K* (Figura 7), preparados pelo processo *SurePrint* (sistema de impressão), no qual aproximadamente 15.000 oligos são depositados uniformemente em lâminas de vidro previamente preparadas.

Figura 7. *Agilent microarrays* no formato 8x15k contendo oligonucleotídeos sintetizados a partir de sequências de miRNAs.

A marcação das amostras foi feita com a utilização do *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a partir de 100 ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total para 50 ng/ μ L em água livre de nucleases. Posteriormente foram adicionados 2 μ L (100ng) dessa diluição em um tubo de 0,5 mL, o qual foi conservado no gelo enquanto foi preparado o *CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) Master Mix*, que foi feito sem a marcação do *Spike-In*. A reação por amostra do *CIP Master Mix* continha: 0,4 μ L de 10X *Calf Intestinal Phosphatase Buffer*, 1,1 μ L de água livre de nucleases e 0,5 μ L de *Calf Intestinal Phosphatase*, sendo o volume final em cada amostra de 4 μ L.

O passo seguinte envolveu a desfosforilação das amostras. Todos os tubos foram colocados a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, desnaturou-se as amostras, adicionando-se a cada uma delas 2,8 μ L de DMSO 100%, deixando a 100°C em banho-maria por 8 minutos. Após esse tempo, os

tubos foram colocados imediatamente em banho frio feito de uma mistura de água e gelo.

Após a desnaturação, foi feito o processo de ligação preparando-se o *Ligation Master Mix*. Nesse *mix* utilizou-se por amostra: 1 µL de *10X T4 RNA Ligase Buffer* (aquecido previamente a 37°C para dissolução de precipitado); 3 µL de Cyanine3-pCp e 0,5 µL de *T4 RNA Ligase* (mantida à temperatura ambiente durante o preparo da reação). Após a adição do *mix*, resultando num volume final de 11,3 µL, a amostra foi misturada gentilmente e uma baixa e rápida centrifugação foi feita antes que os tubos fossem levados para incubação a 16°C em um termociclador por 2 horas.

Decorrido o tempo da incubação, as amostras foram submetidas a uma secagem a vácuo a uma temperatura entre 45°C e 55°C, em aparelho *SC110A SpeedVac® Plus Concentrators* (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA), por aproximadamente 30 minutos, até que estivessem totalmente secas e sem resíduos de DMSO.

Na etapa que antecede a hibridação, as amostras foram ressuspensas em 18 µL de água livre de nucleases e, em seguida, foram adicionados 4,5 µL de *10X Blocking Agent* (preparado com a adição de 125 µL de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos) e 22,5 µL de *2X Hi-RPM Hybridization Buffer*, resultando num volume de 45 µL. Após serem misturadas gentilmente, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 5 minutos.

Enquanto ocorria a incubação, as câmaras de hibridação contendo as lâminas da *Agilent* foram preparadas para receber as amostras. Tudo deve

ocorrer num período máximo de 15 minutos. O processo de hibridação aconteceu em um forno a 55°C com 20 rpm de rotação durante 20 horas.

Após a hibridação, as lâminas foram submetidas a uma imersão no *GE Wash Buffer 1* (com 0,005% Triton X-102), à temperatura ambiente, para a liberação da lâmina em meio líquido, evitando o ressecamento e exposição ao ozônio capaz de degradar a cianina (*Cyanine3-pCp*). Em seguida, foram realizadas duas lavagens: a primeira no tampão 1 (*GE Wash Buffer 1* - 0,005% Triton X-102) à temperatura ambiente por 5 minutos e a segunda no tampão 2 (*GE Wash Buffer 2* - 0,005% Triton X-102) por 5 minutos a 37°C. A adição do Triton reduz a possibilidade de artefatos nos *microarrays*.

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram escaneadas imediatamente, de modo a evitar o impacto dos oxidantes ambientais na intensidade dos sinais, utilizando o *DNA Microarray Scanner* (*Agilent Technologies*) e os dados foram extraídos através do *Agilent Feature Extraction Software*.

4.8 Análise dos dados de oligo *microarrays*

Os dados extraídos de cada lâmina foram usados como *input* para análise, utilizando-se o programa *GeneSpring GX* (<http://www.Agilent.com/chem/genespring>), por meio do qual os dados de mRNAs foram normalizados, utilizando-se o 75º percentil, enquanto que para os dados de miRNAs foi realizada normalização por quantil. Ambas as análises

foram seguidas de análise estatística (ANOVA), cálculo do *fold-change* (razão entre os níveis de expressão de dois grupos experimentais) e agrupamento hierárquico baseado na correlação de Pearson não centralizado.

Para a caracterização funcional dos genes foi utilizado a base de dados *Gene Ontology* (The Gene Ontology Consortium, 2000).

4.9 Confirmação dos dados de oligo *microarrays*

Os mRNAs e miRNAs diferencialmente expressos considerados de interesse tiveram seus dados quantitativos também avaliados pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

4.9.1 Confirmação dos dados de mRNA pela técnica de PCR quantitativa em tempo real

A qRT-PCR foi utilizada para a confirmação dos dados de oligo *microarrays* para cinco genes que se apresentaram diferencialmente expressos entre os grupos experimentais. Os genes confirmados foram: SMURF2, NOTCH1, PHOSPHO1, COL24A1 e FGF1. O gene GAPDH foi usado como controle endógeno (Tabela I).

As reações de qRT-PCR foram feitas utilizando o reagente *SYBR Green* (Applied Biosystems) em placas de 48 poços com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi o *StepOne* (Applied

Biosystems) juntamente com o *software* de leitura de mesmo nome (Versão 2.1 - Applied Biosystems).

O processo constitui-se de duas etapas. A primeira delas consiste na avaliação da especificidade dos produtos PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso, foi realizada uma quantificação absoluta de cada par de *primers*, inclusive dos genes constitutivos, utilizando diluições seriadas 1:10 a 1:1000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.

A segunda etapa consiste na reação quantitativa propriamente dita. Para tal, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e para compará-las entre si. A reação final consiste de 20 µL com: 7,4 µL de água livre de nucleases; 0,8 µL de cada *primer*, 10 µL da solução de *SYBR Green* e 1 µL de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 µg de RNA).

O protocolo de ciclagem térmica foi: 1 x 95°C durante 10 minutos (*Holding stage*); 40x: desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento 60°C por 1 minuto (*Cycling stage*); obtenção da curva de melting (*Melting curve stage*). A curva é obtida após três passos, sendo o primeiro a 95°C por 15 segundos; o segundo a 60°C por 1 minuto e o terceiro a 95°C por 15 segundos.

Os *primers* utilizados foram desenhados com o auxílio do software Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de pareamento (*annealing*) a 60°C (Tabela I).

Tabela I – Primers utilizados nas reações de qRT-PCR e suas respectivas sequências sense e antisense.

Símbolo do gene	Primer	Sequências	Tm
SMURF2	Forward	5'-CATGTCTAACCCCGGAGGC-3'	60°C
	Reverse	5'-TCCATCAACCACCACCTTAGC -3'	
NOTCH1	Forward	5'-TACAAGTGCAACTGCCTGCT-3'	60°C
	Reverse	5'-ATAGTCCTCGGATTGCCTGC-3'	
PHOSPHO1	Forward	5'-ATACCTCAGCTAGCCCCCTT-3'	60°C
	Reverse	5'-TGTAGGGACTCTGTTGGCCT-3'	
COL24A1	Forward	5'-CCCCACGGCAAAAACGAAAT-3'	60°C
	Reverse	5'-GCCTCCAAGGCCTAGTTGAT-3'	
FGF1	Reverse	5'-ACGGGCTTTTATACGGCTCA-3'	60°C
	Forward	5'-ATGGTTCTCCTCCAGCCTTTC-3'	
GAPDH	Forward	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	60°C
	Reverse	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'	

4.9.2 Confirmação dos dados de microRNA pela técnica de PCR quantitativa em tempo real

A análise de expressão de miRNAs selecionados pela diferença de expressão no oligo *microarray* foi realizada utilizando o método de qRT-PCR utilizando sondas *TaqMan* (Applied Biosystems). Os miRNAs confirmados foram: miR-31-3p, miR-134, miR-136-3p, miR-376c-3p, miR-424-5p e miR-494. Como controle endógeno foi utilizada a sonda *TaqMan* RNU19 (Tabela II).

Para este protocolo, primeiramente o RNA total de cada grupo experimental foi retranscrito para cDNA com o uso de *primers* específicos para cada miRNA estudado. O cDNA convertido foi submetido ao método de qRT-PCR, utilizando o sistema de detecção *TaqMan AssayTM*. Essa reação foi realizada utilizando um *kit* específico para cada miRNA estudado (*TaqMan MicroRNA RT*, Applied Biosystems Foster City, CA), permitindo a conversão somente dos fragmentos específicos correspondentes aos miRNAs de interesse.

Após essa etapa foi realizado o qRT-PCR, quando foram utilizadas sondas específicas para cada miRNA analisado. A reação de qRT-PCR foi realizada em um aparelho *ABI 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Esta técnica baseia-se na utilização de um *primer* com estrutura do tipo *stem-loop*. Essa conformação é empregada para solucionar um ponto crítico em relação à detecção do miRNA maduro, que é o seu pequeno tamanho. O *stem-loop* do *primer* possui uma especificidade para apenas o miRNA maduro, permitindo a formação de uma junção *primer-microRNA*, estendendo a extremidade 5' do miRNA. Esse processo resulta em um *amplicon* maior, permitindo o uso de um método de detecção *TaqMan AssayTM* que permite quantificar a expressão do miRNA por qRT-PCR. Além disso, o fato de o *TaqMan AssayTM* possuir dois *primers* e uma sonda para qRT-PCR faz também com que o ensaio seja altamente específico, sendo capaz de distinguir miRNAs com alta similaridade entre si, até mesmo quando há diferenças de apenas uma base entre eles. As condições de reação utilizadas para a transcrição reversa foram 16°C por 30 minutos (desnaturação), 42°C por 30 minutos (anelamento de *primers*), 85°C por 5 minutos (extensão), com volume final de reação de 15 µL. Foram utilizados 10 ng de RNA para cada reação.

As condições de reação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 minutos, 60°C por 1 minuto (40 ciclos), para volume final de reação de 20 µL. Todo o estudo foi realizado em triplicata.

Tabela II – Primers utilizados nas reações de qRT-PCR

microRNA	ID- miRBASE
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504
hsa-miR-134	MI0000474
hsa-miR-136-3p	MIMAT0004606
hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341
hsa-miR-494	MI0003134

4.9.3 Análise estatística dos dados de mRNA e de microRNA por PCR quantitativa em tempo real

É importante notar que a avaliação da expressão dos transcritos por qRT-PCR ocorre por meio de análise diferente daquela empregada nos dados de oligo *microarrays*. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação do gene constitutivo, conforme descrito por PFAFFL (2001).

Para análise estatística dos dados, utilizou-se os testes estatísticos Tukey e One-way ANOVA por meio do *software* estatístico *GraphPad Prism 5.0* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

O gene constitutivo utilizado para normalização da expressão dos mRNAs foi GADPH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). A expressão de cada miRNA foi normalizada pelo endógeno RNU-19 (Applied Biosystems). Foram feitas triplicatas experimentais de cada amostra (triplicata técnica). Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de *Relative Gene Expression*, calculados utilizando como calibrador o menor dos valores de $\Delta\Delta Ct$ obtidos.

5. Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das superfícies dos discos de titânio foi observada a partir de fotomicrografias obtidas por MEV. As imagens revelam que o grupo controle apresentou a superfície mais lisa, com menor quantidade de ranhuras que os demais grupos (Figura 8).

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura das diferentes superfícies de titânio: i) superfície controle, ii) superfície nanotexturizada, iii) superfície nano+submicrotextura e iv) superfície com microtextura rugosa.

5.2 Proliferação Celular

A proliferação celular (Figura 9) teve pico no 10º dia em todos os grupos experimentais. Entre as superfícies estudadas, o grupo nanotexturizado apresentou proliferação celular significativamente maior aos 7 dias de cultura, quando comparado aos grupos nano+submicrotextura e microtextura rugosa ($p \leq 0,05$).

Figura 9. Proliferação celular após 7, 10 e 14 dias de cultura. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para $p \leq 0,05$ (denotado por #) no período de 7 dias. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: nanotextura e nano+submicrotextura; nanotextura e microtextura rugosa para $*p \leq 0,05$ no período de 7 dias.

5.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular (Figura 10) foi semelhante para todos os grupos em todos os períodos, exceto para o grupo microtextura rugosa, o qual mostrou

viabilidade significativamente maior quando comparado aos outros grupos controle, nanotextura e nano+submicrotextura após 7 dias ($p \leq 0,05$).

Figura 10. MTT após 7, 10 e 14 dias de cultura. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para $p \leq 0,05$ em nenhum dos períodos. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: controle e microtextura rugosa; nanotextura e microtextura rugosa; nano+submicrotextura e microtextura rugosa para $*p \leq 0,05$ aos 7 dias de cultura.

5.4 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total (Figura 11) apresentou aumento progressivo com o passar dos períodos. No entanto, houve diferença entre os grupos somente no período de 14 dias, segundo teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Já segundo o teste estatístico de Mann-Whitney, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos

nanotextura e nano+submicrotextura no período de 10 dias de cultura ($p \leq 0,05$). No período de 14 dias, houve diferença estatisticamente significativa do grupo controle em relação aos demais grupos estudados: nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa ($p \leq 0,05$).

Figura 11. Quantidade de proteína total após 7, 10 e 14 dias de cultura. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para $p \leq 0,05$ (denotado por #) no período de 14 dias. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: nanotextura e nano+submicrotextura aos 10 dias de cultura; e entre os grupos: controle e nanotextura; controle e nano+submicrotextura; controle e microtextura rugosa para $*p \leq 0,05$ aos 14 dias de cultura.

5.5 Atividade de Fosfatase Alcalina

A maior atividade de fosfatase alcalina, enzima relacionada ao processo de mineralização, foi observada aos 14 dias de cultura em todos os grupos

experimentais (Figura 12). Em relação aos grupos tratados, células cultivadas na superfície nanotexturizada foram as que apresentaram maior produção de ALP, com diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo de nano+submicrotextura aos 14 dias ($p \leq 0,05$).

Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina após 7, 10 e 14 dias de cultura. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para $p \leq 0,05$ em nenhum dos períodos. Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: controle e nano+submicrotextura; nanotextura e nano+submicrotextura $*p \leq 0,05$ no período de 14 dias.

5.6 Formação e quantificação de matriz mineralizada

A análise qualitativa da formação de nódulos mineralizados, realizada no 21º dia, não indicou diferença na quantidade, na forma ou na distribuição dos nódulos entre os grupos estudados (Figura 13). No entanto, a quantificação do vermelho de alizarina mostrou que houve diferença na quantidade de depósito

de cálcio entre os grupos, sendo que o grupo da microtextura rugosa foi o que apresentou maior quantidade de cálcio, com quantificação estatisticamente superior à nanotextura ($p \leq 0,05$) (Figura 14).

Figura 13. Imagens macroscópicas de nódulos calcificados, corados em vermelho de alizarina após 21 dias, referentes aos grupos a) controle, b) nanotextura, c) nano+submicrotextura, d) microtextura rugosa.

Figura 14. Formação de nódulos calcificados após 21 dias em cultura. Os dados representam média aritmética ($n = 5$). Segundo o teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos: nanotextura e microtextura rugosa para $*p \leq 0,05$.

5.7 Avaliação da integridade do RNA total

A qualidade das amostras de RNA total dos quatro grupos experimentais (controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa) foi avaliada através do *Bioanalyzer 2100* da *Agilent* (Figura 15).

Figura 15. Densitometria das amostras de RNA dos grupos experimentais. a) controle; b) nanotextura; c) nano+submicrotextura; d) microtextura rugosa.

5.8 Análise dos mRNAs diferencialmente expressos

Os *microarrays Agilent* contendo todo o genoma (44.000 oligos) foram utilizados para gerar o perfil transcricional dos grupos experimentais: controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa, após 10 dias de cultura.

No total, 716 genes apresentaram fold-change $\geq 2,0$ e $p \leq 0,05$ (Figura 16).

Genes diferencialmente expressos associados à osteogênese, adesão celular, apoptose, crescimento e diferenciação celular podem ser observados na Tabela III, e a diferença de expressão destes genes entre as diferentes superfícies estudadas é observada na Tabela IV.

Figura 16. Agrupamento hierárquico dos 716 genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa após 10 dias de cultura.

Tabela III. Genes diferencialmente expressos das amostras dos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa após 10 dias de cultura, com funções associadas segundo a base de dados *Gene Ontology* (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014).

(continua)

OSSO OSTEOGÊNESE MINERALIZAÇÃO	ADESÃO CELULAR	APOPTOSE	CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	DIFERENCIAÇÃO CELULAR
ATP6VOA4	AMICA1	AIPL1	E2F5	C10orf27
CDX1	SORBS1	LUC7L3	KIAA1109	SOX21
CYP27B1	NRXN1	ERBB3	LGI1	CYP24A1
SMURF2	PCDHA11	NOTCH1	CYP27B1	NANOG
NOTCH1	NRXN1	PSMD3	GRIN2A	HSF4

(conclusão)

OSSE OSTEOGÊNESE MINERALIZAÇÃO	ADESÃO CELULAR	APOPTOSE	CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR	DIFERENCIAÇÃO CELULAR
PHOSPHO1	FGF1	BTK	GPAM	LAMC3
	ERBB3	PTPRC	KDR	
	PCDHB10	ABCB9	MMP7	
	EPB41L5	KDR	PDE3A	
	UTRN	MAPT	CENPF	
	NOTCH1	GPAM	FGF1	
	NCKAP1L	RNF7	MECOM	
	COL24A1	CD28	PTPRK	

Tabela IV. Níveis de expressão relativa de genes de interesse, diferencialmente expressos entre as amostras dos grupos controle (C), nanotextura (N), nano+submicrotextura (N+S) e microtextura (MR) rugosa após 10 dias de cultura (significantes de acordo com análise de variância, com $p \leq 0,05$).

(continua)

GENE	C vs MR	C vs N+S	C vs N	MR vs N+S	MR vs N	N+S vs N
	FC	FC	FC	FC	FC	FC
ABCB9	2,423	1,045	1,106	-2,319	-2,191	1,059
AIPL1	1,055	-2,369	1,164	-2,500	1,103	2,758
AMICA1	2,308	1,693	2,524	-1,364	1,094	1,491
ATP6V0A4	-5,137	-1,532	-3,833	3,353	1,340	-2,502
BTK	-4,130	-1,516	-6,530	2,725	-1,581	-4,308
C10orf27	-2,049	-1,277	-1,827	1,605	1,122	-1,431
CD28	-3,104	-1,478	-2,068	2,101	1,501	-1,400
CDX1	-2,178	-1,136	-1,572	1,918	1,386	-1,384
CENPF	2,296	1,639	1,574	-1,401	-1,459	-1,041
COL24A1	2,308	1,076	-1,584	-2,144	-3,655	-1,705
CYP27B1	2,325	-1,042	4,278	-2,422	1,840	4,457
E2F5	2,572	1,012	3,240	-2,542	1,260	3,203
EPB41L5	2,725	1,796	2,440	-1,518	-1,117	1,359
ERBB3	-2,036	1,391	-1,934	2,832	1,052	-2,691
FGF1	1,929	1,309	2,792	-1,473	1,447	2,132
GPAM	3,438	-1,467	2,420	-5,045	-1,421	3,551
GRIN2A	2,065	-1,066	2,005	-2,202	-1,030	2,138
HSF4	-2,358	-2,213	-1,331	1,066	1,772	1,663
KDR	1,563	-1,134	2,118	-1,772	1,355	2,401
KIAA1109	1,948	1,340	2,146	-1,453	1,102	1,602
LAMC3	2,138	2,921	2,086	1,366	-1,025	-1,400
LGI1	3,533	1,452	4,124	-2,433	1,167	2,839
LUC7L3	2,064	1,673	1,507	-1,234	-1,370	-1,110
MAPT	6,567	1,653	4,711	-3,973	-1,394	2,849
MECOM	-2,952	-3,421	-8,666	-1,159	-2,936	-2,533
MMP7	2,731	1,120	2,208	-2,438	-1,237	1,972
NANOG	3,365	2,137	3,791	-1,575	1,127	1,774
NCKAP1L	-1,722	-2,257	-1,736	-1,311	-1,008	1,300

(conclusão)

GENE	C vs MR	C vs N+S	C vs N	MR vs N+S	MR vs N	N+S vs N
NOTCH1	1,306	-1,812	1,416	-2,367	1,084	2,565
NRXN1	2,462	1,377	-1,203	-1,788	-2,963	-1,657
PCDHA11	2,074	-1,266	2,259	-2,626	1,089	2,859
PCDHB10	3,328	-1,025	3,581	-3,411	1,076	3,669
PDE3A	-3,260	1,121	-3,908	3,656	-1,199	-4,382
PHOSPHO1	-2,024	-1,214	-1,757	1,667	1,152	-1,448
PSMD3	-2,075	-2,131	-1,353	-1,027	1,533	1,574
PTPRC	1,453	-1,392	1,475	-2,022	1,016	2,054
PTPRK	-3,909	-1,952	1,034	2,002	4,040	2,018
RNF7	2,803	1,199	1,387	-2,339	-2,021	1,157
SMURF2	1,193	-2,344	-1,142	-2,797	-1,362	2,053
SORBS1	-3,880	-3,008	-3,342	1,290	1,161	-1,111
SOX21	2,006	1,583	2,829	-1,267	1,411	1,787
UTRN	-1,602	-1,884	-2,062	-1,176	-1,287	-1,094

5.9 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos

Todos os miRNAs descritos (720 miRNAs) foram utilizados para gerar o perfil transcricional dos grupos experimentais: controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa após 10 dias de cultura.

Os resultados indicaram que 32 miRNAs apresentaram fold-change $\geq 1,5$ e $p \leq 0,01$ (Figura 17).

miRNAs diferencialmente expressos associados à osteogênese, apoptose e crescimento celular podem ser observados na Tabela V, e a diferença de expressão destes miRNAs entre as diferentes superfícies estudadas pode ser observada na Tabela VI.

No grupo microtextura rugosa, a grande maioria dos miRNAs foram expressos inversamente, quando comparados aos outros grupos experimentais.

Figura 17. Agrupamento hierárquico dos 32 miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras dos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa após 10 dias de cultura.

Tabela V. MicroRNAs diferencialmente expressos entre as amostras dos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa após 10 dias de cultura, com funções associadas segundo a base de dados *Gene Ontology* (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014) e literatura relevante indexada no Pubmed.

OSSO, OSTEOGÊNESE MINERALIZAÇÃO	APOPTOSE	CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR
hsa-miR-424-5p	hsa-miR-494	hsa-miR-134
hsa-miR-136-3p	hsa-miR-134	
hsa-miR-136-5p		
hsa-miR-31-3p		
hsa-miR-376c-3p		
hsa-miR-19b-3p		
hsa-miR-21-3p		
hsa-miR-21-5p		
hsa-miR-218-5p		
hsa-miR-29b-3p		

Tabela VI. Níveis de expressão relativa de miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras dos grupos controle (C), nanotextura (N), nano+submicrotextura (N+S) e microtextura (MR) rugosa após 10 dias de cultura (significantes de acordo com análise de variância, com $p \leq 0,01$).

miRNA	C vs MR	C vs N+S	C vs N	MR vs N+S	MR vs N	N+S vs N
	FC	FC	FC	FC	FC	FC
hsa-miR-101-3p	2,635	1,033	1,036	-2,551	-2,542	1,003
hsa-miR-106b-5p	1,511	-1,018	1,000	-1,539	-1,510	1,019
hsa-miR-1246	1,173	1,963	1,133	1,674	-1,036	-1,733
hsa-miR-1290	1,057	2,161	1,113	2,045	1,053	-1,941
hsa-miR-134	-1,478	-1,119	1,025	1,321	1,515	1,147
hsa-miR-136-3p	182,144	-1,044	4,031	-190,073	-45,188	4,206
hsa-miR-136-5p	67,552	1,001	-1,132	-67,496	-76,442	-1,133
hsa-miR-15a-5p	1,633	1,009	-1,027	-1,619	-1,678	-1,036
hsa-miR-1826_v15.0	-1,174	1,173	1,299	1,377	1,525	1,107
hsa-miR-1914-3p	-1,401	-1,001	1,186	1,399	1,662	1,188
hsa-miR-193a-3p	2,493	-1,059	-1,021	-2,640	-2,546	1,037
hsa-miR-19a-3p	2,033	-1,060	-1,069	-2,154	-2,173	-1,009
hsa-miR-19b-3p	1,544	-1,035	-1,053	-1,598	-1,627	-1,018
hsa-miR-21-3p	1,402	-1,205	-1,097	-1,688	-1,538	1,098
hsa-miR-21-5p	1,782	-1,000	-1,000	-1,782	-1,782	-1,000
hsa-miR-218-5p	1,931	1,054	-1,005	-1,832	-1,940	-1,059
hsa-miR-26b-5p	1,635	1,036	1,024	-1,579	-1,598	-1,012
hsa-miR-27a-3p	1,588	-1,000	-1,000	-1,588	-1,588	-1,000
hsa-miR-29b-3p	2,128	1,083	1,014	-1,964	-2,098	-1,068
hsa-miR-301a-3p	1,685	-1,041	1,034	-1,754	-1,630	1,076
hsa-miR-31-3p	1,464	-1,092	-1,120	-1,599	-1,640	-1,026
hsa-miR-374a-5p	1,868	-1,083	-1,093	-2,023	-2,041	-1,009
hsa-miR-376a-3p	1,411	-1,081	-1,046	-1,526	-1,477	1,033
hsa-miR-376b-3p	2,361	-1,105	1,085	-2,608	-2,176	1,199
hsa-miR-376c-3p	1,424	-1,141	-1,077	-1,625	-1,533	1,060
hsa-miR-377-3p	1,754	-1,019	1,005	-1,788	-1,745	1,025
hsa-miR-424-5p	2,125	1,051	1,043	-2,021	-2,038	-1,008
hsa-miR-450a-5p	202,710	1,121	3,964	-180,812	-51,138	3,536
hsa-miR-494	-1,416	1,006	1,120	1,424	1,585	1,113
hur_5	-1,357	1,120	1,132	1,519	1,537	1,011
miRNABrightCerner30	1,657	2,170	1,197	1,309	-1,385	-1,813
mr_1	-1,519	-1,000	-1,000	1,519	1,519	-1,000

5.10 Confirmação dos dados de mRNA por PCR quantitativa em tempo real

Os resultados dos oligo *microarrays* foram confirmados por qRT-PCR de cinco mRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos entre os grupos, a saber: SMURF2, NOTCH1, PHOSPHO1, COL24A1 e FGF1. Tais mRNAs estão associados à apoptose (NOTCH1), ao tecido ósseo e sua mineralização (SMURF2, NOTCH1 e PHOSPHO1), na adesão celular (COL24A1 e FGF1) e na proliferação celular (FGF1) (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014).

Os tipos de modulação (indução ou repressão) obtidos por qRT-PCR foram comparáveis aos dados encontrados com a técnica de oligo *microarray*.

O gene SMURF2 apresentou maior expressão na nanotextura, com significância estatística em relação aos outros grupos experimentais (Figura 18). Esta observação é contrária ao perfil de expressão gerado pela técnica do oligo *microarray* somente na comparação entre nanotextura e nano+submicrotextura.

Observou-se que os genes NOTCH1 (Figura 19) e PHOSPHO1 (Figura 20) apresentaram-se mais expressos no grupo controle, com significância estatística em relação aos outros grupos estudados. O gene NOTCH1 apresenta concordância parcial em relação ao perfil de expressão gerado pelo oligo *microarray*, sendo contrário somente quando comparamos o grupo controle e o grupo nano+submicrotextura. Já o gene PHOSPHO1 apresentou discordância total em relação aos resultados obtidos pela técnica do oligo *microarray*.

No caso do gene COL24A1 (Figura 21), não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais. O gene FGF1 (Figura 22) apresentou maior expressão na superfície com nanotextura, com significância estatística, em relação aos grupos nano+submicrotextura e

microtextura rugosa. Assim como o gene PHOSPHO1, o gene FGF1 apresentou discordância total em relação aos resultados gerados pelo oligo *microarray*.

Figura 18. Gráfico dos valores de expressão relativa do gene SMURF2 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 19. Gráfico dos valores de expressão relativa do gene NOTCH1 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; *** $p < 0,001$).

Figura 20. Gráfico dos valores de expressão relativa do gene PHOSPHO1 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; *** $p < 0,001$).

Figura 21. Gráfico dos valores de expressão relativa do gene COL24A1 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*, *** $p < 0,001$).

Figura 22. Gráfico dos valores de expressão relativa do gene FGF1 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.11 Confirmação dos dados de microRNA por PCR quantitativa em tempo real

Os resultados dos miRNAs obtidos pela técnica de oligo *microarray* foram confirmados por qRT-PCR. Foram analisados seis miRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos entre os grupos: miR-31-3p, miR-134, miR-136-3p, miR-376c-3p, miR-424-5p e miR-494. Dentre estes analisados, há miRNAs associados à apoptose (miR-134 e miR-494), ao tecido ósseo e sua mineralização (miR-31-3p, miR-136-3p, miR-376c-3p e miR-424-5p) e ao crescimento e proliferação celular (miR-134) (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014).

Os resultados obtidos por qRT-PCR foram comparados aos dados encontrados através da técnica de oligo *microarray*.

O miR-31-3p apresentou maior expressão na nanotextura, apresentando significância estatística em relação aos outros grupos experimentais (Figura 23), da mesma forma que o perfil de expressão gerado pela técnica do oligo *microarray*. Observou-se que o miR-134 exibiu diferença estatisticamente significativa somente comparando-se a nanotextura em relação à microtextura rugosa (Figura 24), em contraste com o resultado do oligo *microarray*. Já o miR-136-3p mostrou-se mais expresso no grupo da nanotextura, com significância estatística em relação aos demais grupos estudados (Figura 25). Houve concordância com o resultado do oligo *microarray* somente quando comparamos a microtextura rugosa com os outros grupos experimentais, ou seja, este miRNA apresenta-se menos expresso no grupo da

microtextura rugosa comparado aos demais, tanto no oligo *microarray* como no qRT-PCR.

No caso do miR-376c-3p (Figura 26), a nanotextura apresentou maior expressão que todos os outros grupos. Houve semelhança aos dados obtidos pelo oligo *microarray* somente quando comparamos a nanotextura com o controle e com a microtextura rugosa. O miR-424-5p (Figura 27) revelou maior expressão na nanotextura, com diferença estatisticamente significativa quando comparada aos demais grupos, resultado este diferente do obtido através do oligo *microarray* somente na comparação entre nanotextura e controle. Por fim, o miR-494 (Figura 28) apresentou concordância em relação aos resultados gerados pela técnica do oligo *microarray* somente no caso da nanotextura, que apresentou expressão significativamente menor expressão que as outras superfícies.

Figura 23. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-31-3p nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística *Tukey Multiple Comparasion Test*; *** $p < 0,001$).

Figura 24. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-134 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; * $p < 0,05$).

Figura 25. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-136-3p nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 26. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-376c-3p nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 27. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-424-5p nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Figura 28. Gráfico dos valores de expressão relativa do miR-494 nos grupos controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa (análise estatística pelo *Tukey Multiple Comparison Test*; ** $p < 0,01$).

6. *Discussão*

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliações das Respostas Celulares

A resposta de células osteoblásticas a diferentes superfícies de titânio tem sido investigada nos últimos anos (DE OLIVEIRA *et al*, 2007; KUBIES *et al.*, 2011; LEE *et al*, 2012; SVERZUT *et al*, 2012; SANTIAGO-MEDINA *et al*, 2014). O presente estudo avaliou o efeito de três diferentes superfícies: 1) nanotextura, 2) nano+submicrotextura e 3) microtextura rugosa, obtidas segundo a técnica descrita por Variola *et al.* (2009), na atividade de células derivadas de osso alveolar humano, em comparação à superfície controle (superfície polida). Os ensaios bioquímicos realizados foram: proliferação e viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e quantidade de proteína total, assim como detecção e quantificação de tecido ósseo mineralizado.

Em relação à proliferação celular, observou-se que o grupo nanotexturizado apresentou proliferação significativamente maior aos 7 dias de cultura, quando comparado aos grupos nano+submicrotextura e microtextura rugosa ($p \leq 0,05$). Investigações anteriores realizadas por Variola *et al.* (2008) demonstraram que superfícies de titânio condicionadas promovem o crescimento de osteoblastos, tornando esta técnica promissora para a regulação de atividades celulares em ambientes biológicos. A proteína K-67 é um importante marcador da proliferação celular e, através da contagem de células positivas, observou-se maior quantidade em células da calvária de ratos na superfície do

titânio não tratada (controle) no período inicial, entretanto, com o passar do tempo, a superfície nanotexturizada de titânio apresentou aumento significativo de células K-67 positivas (VETRONE *et al.*, 2009).

A viabilidade celular foi semelhante para todos os grupos em todos os períodos, exceto para o grupo microtextura rugosa, que mostrou viabilidade significativamente maior quando comparado aos demais grupos (controle, nanotextura e nano+submicrotextura) após 7 dias ($p \leq 0,05$). O ensaio de MTT determina a atividade mitocondrial das células, e a partir desta técnica pode-se determinar a viabilidade ou proliferação celular (VAN MEERLOO *et al.*, 2011).

O conteúdo de proteína total demonstrou aumento significativo com o passar dos dias. Comparando os grupos tratados do presente estudo, houve maior quantidade de proteína total na nanotextura aos 10 dias de cultura. No entanto, aos 14 dias, observou-se que o grupo controle foi estatisticamente superior em relação aos demais.

A expressão de fosfatase alcalina é associada à diferenciação celular (LEE *et al.*, 2012), que é essencial para aumentar a osseointegração. A ALP está entre os primeiros genes funcionais expressos no processo de calcificação, portanto é possível que um dos seus papéis no processo de mineralização ocorra em um estágio precoce (SANTIAGO-MEDINA *et al.*, 2014). Apesar disso, a maior produção de fosfatase alcalina foi observada apenas aos 14 dias de cultura em todos os grupos experimentais. Em relação aos grupos tratados, células cultivadas na superfície nanotexturizada foram as que apresentaram maior atividade de ALP, com diferença estatisticamente significativa comparada ao grupo de nano+submicrotextura aos 14 dias ($p \leq 0,05$).

Em um estudo *in vivo* e *in vitro* comparando implantes de titânio com superfície não tratada (grupo controle) e implantes submetidos a ASD-AK, foi observado que a porcentagem de formação óssea ao redor dos dois tipos de titânio foi semelhante quando implantados em mandíbulas de cachorro. No entanto, nos parâmetros celulares como proliferação celular e atividade de ALP, os resultados foram menores nas células em contato com o titânio ASD-AK em relação ao grupo controle (SVERZUT *et al.*, 2012).

Ao comparar três superfícies de titânio, usinado (MS), jateamento rugoso (MT) e rugoso coberto com fosfato tricálcio (TCP), observou-se maior expansão celular no titânio usinado aos três dias de cultura, confirmando que este tipo de superfície promove a proliferação celular. No entanto, com o passar do tempo houve aumento da expansão celular nas superfícies tratadas, demonstrando que a proliferação celular acontece de forma mais tardia nestes tipos de superfície, MT e TCP (COLOMBO *et al.*, 2012).

Por meio de análises bioquímicas semelhantes às realizadas em nosso trabalho, de Oliveira *et al.* (2007) compararam discos de titânio comercialmente puro e discos preparados com lixas de 320 e 600 granas e tratados com ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio, promovendo uma superfície nanotexturizada. A proliferação celular apresentou-se maior na nanotextura somente aos 7 dias de cultura, e sem nenhuma diferença entre os dois grupos quanto à viabilidade celular. A quantidade de proteína total foi maior na nanotextura em todos os períodos (4, 7 e 10 dias), exceto aos 14 dias de cultura. Já a atividade de ALP foi maior na nanotextura aos 10 dias e menor que o controle aos 14 dias de cultura, apesar de a nanotextura apresentar maior mineralização aos 10 e 14 dias.

Outro estudo utilizando um modelo de cultura de células da medula óssea de ratos, em contato com superfícies de titânio obtidas por uma solução de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em uma proporção 7:3, observou maior proliferação celular, maior atividade de ALP e maior mineralização na superfície tratada comparada ao grupo controle, titânio puro (TAN *et al.*, 2014).

A deposição de cálcio por osteoblastos é crucial para que haja uma rápida osseointegração e regeneração de novo osso na superfície do implante (HAN *et al.*, 2011). A análise qualitativa da formação de nódulos mineralizados realizada no 21º dia não indicou diferença na quantidade, na forma ou na distribuição dos nódulos entre os grupos estudados. No entanto, a quantificação do vermelho de alizarina mostrou que houve diferença na quantidade de depósito de cálcio entre os grupos, sendo que o grupo da microtextura rugosa foi o que apresentou maior quantidade de cálcio, tendo sido estatisticamente significativa quando comparado à nanotextura ($p \leq 0,05$).

A maioria dos estudos demonstraram que a rugosidade exerce influências significativas sobre a resposta celular. Em outro estudo, no entanto, análises com um perfilômetro mostraram não haver diferença significativa entre a rugosidade da superfície medida no grupo de titânio comercialmente puro (Ti-cp) e no titânio de superfície bioativa (AHT). Portanto, a resposta celular aumentada nas superfícies tratadas AHT não pôde ser atribuída à rugosidade da superfície (LEE *et al.*, 2012).

Pela análise de síntese de proteínas, atividade de ALP e formação de matriz mineralizada em culturas de células osteoblásticas derivadas de osso

alveolar humano em contato com superfície de titânio revestida com colágeno tipo I e titânio usinado (controle), observou-se que a superfície tratada não produziu efeitos significativos, em relação a estes parâmetros, comparada ao controle (ASSIS *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm sido feitos com o propósito de analisar e comparar a resposta de diversos tipos de células (indiferenciadas, osteoprogenitoras, osteoblastos maduros e outras) em contato com superfícies de titânio modificadas por inúmeras metodologias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; VARIOLA *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2009; VETRONE *et al.*, 2009; SVERZUT *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2014). Diante das evidências apresentadas nestes estudos, podemos observar influências positivas e negativas que as superfícies exerceram sobre as células. No presente estudo observou-se que o tratamento químico da superfície do titânio promove alterações no metabolismo de células osteoblásticas da crista óssea alveolar humana, havendo variabilidade de resultados em função do parâmetro estudado.

6.2 Perfis de expressão gênica e validação por qRT-PCR

Quando o perfil de expressão gênica das células osteoblásticas provenientes da crista óssea alveolar em contato com as diferentes superfícies de titânio foi analisado, 716 genes diferencialmente expressos foram encontrados, com funções associadas ao processo de osteogênese,

principalmente mineralização, adesão celular, apoptose, proliferação e diferenciação celular.

Entre os genes diferencialmente expressos associados com o processo de osteogênese e mineralização, podemos citar o NOTCH1. Verificou-se que o NOTCH é um determinante no destino das células osteoblásticas e na osteoclastogênese, assim como no desenvolvimento do esqueleto e na remodelação óssea (ZANOTTI e CANALIS, 2010). Estudos *in vitro* mostraram que a sinalização pelo NOTCH1 suprime a diferenciação osteoblástica através da inibição de marcadores precoces e tardios de diferenciação, como o colágeno tipo 1, ALP, RUNX2 e osteocalcina (ZANOTTI *et al.*, 2008). Em contraste, também foi visto que a ativação desta sinalização em células MC3T3 estimulou a diferenciação osteoblástica através da indução de nódulos calcificados, sugerindo que as condições de cultura e a linhagem estudada são importantes para este gene exercer seus efeitos (TEKUZA *et al.*, 2002; NOBTA *et al.*, 2005; YAVROPOULOU e YOVOS, 2014). Em outro estudo, foi observado que os efeitos do NOTCH no esqueleto também são dependentes do tipo celular, pois quando expresso em osteoblastos imaturos ocorre o retardo da sua diferenciação, causando a osteopenia, e quando expresso em osteócitos provoca supressão na reabsorção óssea e aumento do volume do osso (CANALLIS *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, o NOTCH1 apresentou-se mais expresso na nano+submicrotextura que nas demais superfícies tratadas ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$) pela técnica do oligo *microarray*. No entanto, ao realizarmos o qRT-PCR para validação, observamos expressão significativamente maior no controle

comparado aos demais grupos. Resultados diferentes foram encontrados em um experimento com qRT-PCR de células do osso alveolar humano em contato com superfícies tratadas por jateamento com pequenas partículas + solução de ácidos clorídrico e sulfúrico (SLA), hidrofílica (modSLA) e polida (controle), em que foi encontrada indução do gene NOTCH1 somente nas superfícies SLA e modSLA (CHAKRAVORTY *et al.*, 2013).

Outro gene associado com o processo de osteogênese é o PHOSPHO1, o qual, em nosso estudo, apresentou maior expressão na microtextura quando comparado ao controle ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$), segundo a técnica de oligo *microarray*. Em contrapartida, o experimento com qRT-PCR demonstrou que as células do grupo controle mostraram expressão significativamente maior que as células cultivadas nas outras superfícies. O PHOSPHO1 está envolvido no controle dos primeiros passos da deposição dos cristais de hidroxiapatita, encontrando-se em eventos iniciais da mineralização da matriz (STEWART *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2007). Os resultados do *microarray* vão ao encontro dos nossos resultados bioquímicos, visto que a microtextura rugosa apresentou maior deposição de cálcio. Investigações recentes mostram claramente que a falta deste gene pode provocar anormalidades esqueléticas que incluem diminuição ou perda de centros de ossificação secundários, diminuição da densidade óssea mineral e osteomalácia (HUESA *et al.*, 2011, MILLÁN, 2013).

O SMURF2 interage com SMADS e induz a sua degradação mediada por ubiquitina, impedindo a sinalização do TGF- β (*transforming growth factor*) e da BMP (proteína morfogenética óssea). Tanto o TGF- β quanto a BMP são proteínas multifuncionais importantes para regulação da proliferação,

diferenciação, migração e apoptose celular (ZHANG *et al.*, 2001; NAKARO *et al.*, 2009). Em um estudo com condrócitos, observou-se que, durante o desenvolvimento embrionário, há alta expressão de SMURF2 em condrócitos imaturos, associada à diferenciação e proliferação destes; contudo, há diminuição de expressão em condrócitos maduros, visto que o efeito inibitório da sinalização de TGF- β em condrócitos maduros é essencial para o desenvolvimento ósseo adequado (SERRA *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2008). Em nosso estudo, segundo o oligo *microarray*, o SMURF2 apresentou-se mais expresso na nano+submicrotextura comparada às demais superfícies. Já no qRT-PCR, a expressão do SMURF2 foi significativamente maior na nanotextura quando comparado às demais superfícies.

Genes como o FGF1, AMICA1, SORBS1, NRXN1 e ERBB3, entre outros, exibiram expressão diferencial quando em contato com as diversas superfícies em nosso presente trabalho. Estes genes estão relacionados com a adesão celular (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014), no entanto, outras funções foram associadas a estes genes. O ERBB3 também está relacionado à regulação da proliferação e diferenciação de osteoblastos, condrócitos e osteoclastos, à formação óssea mediada por hormônio paratireoidiano e metástases nos ossos (SCHNEIDER *et al.*, 2009; JULLIEN *et al.*, 2012; JULLIEN *et al.*, 2013). Em nosso estudo, o ERBB3 apresentou-se mais expresso na microtextura rugosa em relação ao controle e à nano+submicrotextura, e na nanotextura em relação à nano+submicrotextura ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$). O AMICA1 faz parte da família de moléculas de adesão juncional, tendo sido associado a células endoteliais, epiteliais, leucócitos,

plaquetas circulantes e monócitos (BAZZONI, 2003; GUO *et al.*, 2009). Apesar de não ter sido previamente encontrada associação com osteoblastos, observamos maior expressão deste gene no controle em relação à nanotextura e microtextura rugosa ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$).

Outras investigações observaram a importância destes genes na interface célula-substrato. O FGF1 é um gene relacionado tanto à adesão celular como à proliferação celular, e desempenha papel crucial na proliferação e diferenciação de osteoblastos, influenciando a osteogênese (DEBIAIS *et al.*, 1998; MANSUKHANI *et al.*, 2000; AMBROSETTI *et al.*, 2008; NIE, 2006; FEITO *et al.*, 2011). McCracken *et al.* (2001) observaram aumento do contato osso-implante em amostras de tíbias de ratos tratadas com FGF1, e também aumento na quantidade de tecido ósseo adjacente aos implantes. Em nosso estudo, o FGF1 apresentou menor expressão na nanotextura comparada ao controle e à nano+submicrotextura ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$). O resultado do qRT-PCR contradiz o resultado do oligo *microarray*, pois revelou expressão significativamente maior na nanotextura do que nas demais superfícies.

O COL24A1, gene associado à adesão celular (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014), também demonstrou ter certo controle na diferenciação dos osteoblastos e mineralização, através da interação com a integrina $\beta 3$ e com o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) / via de sinalização Smads (WANG *et al.*, 2012). Verificou-se que o gene COL24A1 é ativado aproximadamente ao mesmo tempo que o gene que codifica a osteocalcina, e sua expressão aumenta gradualmente à medida que os osteoblastos começam a depositar matriz mineralizada (MATSUO *et al.*, 2006, 2008). Nossa análise, pelo

oligo *microarray*, evidenciou menor expressão na microtextura rugosa em relação aos demais grupos estudados ($FC \geq 2,0$ e $p \leq 0,05$). Já pelo qRT-PCR não houve diferença estatisticamente significante entre as superfícies.

Genes associados à apoptose, como APL1, LUC7L3, ERBB3, NOTCH1, PSMD3, BTK, PTPRC, ABCB9, KDR, MAPT, GRAMP, RNF7 e CD28 (www.geneontology.org, acesso em 20/02/2014) também sofreram expressão diferencial de acordo com o tipo de superfície em que as células osteoblásticas estavam em contato.

Estudos que analisaram a expressão gênica de células osteoblásticas em contato com diferentes superfícies de titânio observaram aumento na expressão de ALP, BSP e OCN, proteínas da matriz óssea expressas durante a mineralização e marcadores da osteogênese, nas superfícies tratadas em relação ao controle (titânio usinado) (VLACIC-ZISCHKE *et al.*, 2011; HARA *et al.*, 2012). Em nosso estudo, estes genes não se apresentaram diferencialmente expressos entre as quatro superfícies: controle, nanotextura, nano+submicrotextura e microtextura rugosa.

A análise de oligo *microarray* neste estudo permitiu identificar 32 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos experimentais. Entre os miRNAs diferencialmente expressos foram encontrados alguns envolvidos no processo de mineralização, apoptose e regulação da proliferação e crescimento celular. É interessante observar que, no grupo microtextura rugosa, a maioria dos miRNAs foram expressos inversamente quando comparados aos demais grupos experimentais.

Acumulam-se evidências que demonstram o papel dos miRNAs na regulação da massa óssea. O miR-136-3p apresentou-se diferencialmente expresso em nosso estudo, com expressão muito menor na microtextura rugosa em relação às demais superfícies ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$). Pela técnica de qRT-PCR, obtivemos concordância de resultado em relação à menor expressão deste miRNA na microtextura rugosa. Pela transfecção do inibidor do miR-136 e do precursor do miR-136 em células osteoblásticas de camundongo (UAMS-32), observou-se que o inibidor do miR-136 não exerceu efeitos positivos nas células, enquanto que o precursor do miR-136 provocou diminuição significativa na regulação da atividade de ALP nas UAMS-32. Isto indica que o miR-136 promove regulação negativa na diferenciação osteoblástica (AN *et al.*, 2014).

As integrinas são receptores de adesão celular transmembrana e possuem grande importância para a união da célula com a matriz extracelular, além de participar de interações entre células (HYNES, 2002). Em um estudo realizado com células tronco mesenquimais (MSCs), demonstrou-se que o miR-134 promoveu regulação negativa de integrina $\beta 1$, provocando redução de aderência das MSCs à fibronectina (POITZ *et al.*, 2013). Não encontramos nenhum outro estudo relacionando o miR-134 a células osteoblásticas e diferentes substratos, apesar de observarmos maior expressão deste miRNA na microtextura rugosa em relação à nanotextura ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$). No entanto, houve contradição de resultados pela técnica de qRT-PCR, no qual a microtextura rugosa foi a superfície que apresentou menor expressão.

O miR-494 media a apoptose e a necrose em diversos tipos de células (LAN *et al.*, 2012). Recentemente, identificou-se o miR-494 como um

componente do programa genético que conduz à senescência e parada do ciclo celular permanente de fibroblastos diploides humanos (IMR90), desencadeada por diferentes estímulos (COMEGNA *et al.*, 2014). Ao colocar uma linhagem de células osteoblásticas (MG63) em contato com osso bovino inorgânico (Bio-Oss), observou-se a indução de diversos miRNAs, inclusive do miR-494 (SCHNEIDER I *et al.*, 2010). Em nosso estudo, observamos maior expressão deste miR-494 na microtextura rugosa em relação à nanotextura ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$). Houve concordância de resultados pela validação do qRT-PCR, ao se observar expressão significativamente menor deste miRNA na nanotextura em relação aos demais grupos.

Ao investigar o envolvimento dos miRNAs na osteogênese através da realização de um perfil de expressão de células da medula óssea humana (MSCs) diferenciadas em osteoblastos, observou-se o envolvimento de miR-31 na regulação do fator de transcrição osterix. A inibição do miRNA levou a um aumento da expressão endógena de osterix (BAGLIÒ *et al.*, 2013). O osterix é um regulador chave de diferenciação das células ósseas e desempenha um papel essencial para a homeostase dos ossos (GAO *et al.*, 2004). Deng *et al.* (2013) também observaram que a superexpressão do miR-31 reduziu significativamente a expressão dos fatores de transcrição osteogênicos OPN, BSP, OSX e OCN, mas não Runx2. No presente trabalho, observou-se que o miR-31-3p apresentou menor expressão na microtextura rugosa em relação às demais superfícies tratadas ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$). O qRT-PCR foi ao encontro dos resultados do *microarray* quando demonstrou uma expressão significativamente maior na nanotextura.

Em outro estudo, semelhante ao citado anteriormente, foram identificados sete miRNAs que exercem papéis regulatórios na diferenciação de células da medula óssea humana em osteoblastos (GAO *et al.*, 2011). Dentre esses, o miR-31 e o miR-424 foram observados como diferencialmente expressos em nosso estudo. Na diferenciação osteogênica de células mesenquimais derivadas de músculos esqueléticos humanos (PDGFR α +), identificaram-se miRNAs envolvidos na osteogênese. Observou-se uma indução do miR-424 durante a diferenciação osteogênica de PDGFR α + e, ao inibir este miRNA, houve supressão da maturação de osteócitos, demonstrando seu papel positivo na osteogênese de células PDGFR α + (OISHI *et al.*, 2013). A microtextura rugosa foi a superfície que apresentou menor expressão de miR-424-5p em relação às demais (FC $\geq$ 1,5 e p $\leq$ 0,01). Houve concordância com a validação pelo qRT-PCR ao se observar uma expressão significativamente menor na microtextura rugosa.

Duan *et al.* (2011) verificaram que o miR-376c exibiu menor expressão em células de osteossarcoma em comparação com osteoblastos. Também foi observado que a superexpressão do mir-376c provocou a supressão da expressão de TGFA e de sua molécula de sinalização, atenuando a proliferação e invasão de células neoplásicas, demonstrando o envolvimento de miR-376c na proliferação e metástase do osteossarcoma (JIN *et al.*, 2013). O miR-376c-3p apresentou menor expressão na microtextura rugosa quando comparada às demais superfícies tratadas (FC $\geq$ 1,5 e p $\leq$ 0,01). Similarmente aos resultados do oligo *microarray*, o qRT-PCR demonstrou expressão significativamente menor na microtextura rugosa em relação aos outros grupos.

Durante a formação do osso, ZHAO *et al.* (2014) observaram a função de diversos miRNAs tanto em fase precoce como tardia de diferenciação dos osteoblastos e osteoclastos na regulação de vias *in vivo*. Outros miRNAs, que exercem influência no tecido ósseo, foram diferencialmente expressos em nosso estudo, como miR-19b, miR-21, miR-218 e miR-29b.

OKAMOTO *et al.* (2012) demonstraram seis miRNAs (miR-10a, miR-10b, miR-19b, miR-9-3p, miR-124a and miR-181a) que foram reprimidos durante a diferenciação dos osteoblastos, e ao realizar a transfecção do anti-miRNA destes seis miRNAs houve aumento significativo em vários marcadores da diferenciação osteoblástica, tais como Runx2, Msx2 e osteopontina, indicando o papel que estes miRNAs desempenham na diferenciação osteoblástica. Entre estes miRNAs encontra-se o miR-19b, que em nosso estudo apresentou-se menos expresso na microtextura rugosa em relação às demais superfícies ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$). O miR-21 está relacionado à osteoclastogênese, promovendo a reabsorção óssea (ZHOU *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014) e apresentou-se menos expresso na microtextura rugosa em relação aos outros grupos ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$).

Os ligantes do WNT ativam numerosas vias, de modo a induzir a proliferação e diferenciação durante a formação óssea. O *Dickkopf-related protein 1* (DKK1) é um inibidor da sinalização de WNT e, consequentemente, da diferenciação osteogênica. O miR-218 demonstrou-se capaz de aumentar a via WNT pela inibição da expressão de DKK1, demonstrando potentes propriedades osteogênicas (HASSAN *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2014). Em nosso estudo, o

miR-218-5p apresentou-se menos expresso na microtextura rugosa quando comparada às demais superfícies ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$).

A família do miRNA-29 tem como alvo muitas proteínas colágenas e extracelulares da matriz que podem influenciar a formação óssea. O miR-29b é um importante regulador do desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, pois aumenta a atividade de COL1A1, COL5A3 e COL4A2, regula o acúmulo de proteínas colágenas durante a mineralização e promove a osteogênese pela regulação negativa direta de inibidores da diferenciação dos osteoblastos (LI *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2014). Em nosso estudo, dentre as superfícies tratadas, o miR-29b-3p exibiu menor expressão na microtextura rugosa ($FC \geq 1,5$ e $p \leq 0,01$).

Chakravorty *et al.* (2012) comparou o perfil de expressão de miRNAs associados ao desenvolvimento e diferenciação de células osteoblásticas cultivadas sobre três superfícies de titânio: suavemente polido (SMO), jateada com pequenas partículas + solução de ácidos clorídrico e sulfúrico (SLA) e hidrofílica (modSLA). Ao observar os miRNAs expressos neste estudo, foi constatado que o miR-15a, o miR-106b, o miR-134, o miR-21, o miR-218, o miR-301a e o miR-424 também se apresentaram diferencialmente expressos no nosso estudo.

A validação dos dados do oligo *microarray* pode ser feita por qRT-PCR ou Northern. O qRT-PCR é mais utilizado por ser uma técnica rápida, relativamente barata e por requerer um modelo de partida mínimo (CHUAQUI *et al.*, 2002). Um estudo foi realizado em busca de verificar a correlação entre os níveis de expressão de genes avaliados por oligo *microarray* e qRT-PCR, e os resultados destacaram baixas correlações, visto que houve concordância para

apenas 13 a 16% dos genes (DALLAS *et al.*, 2005). Pesquisadores realizaram a validação, por meio de qRT-PCR, da expressão gênica de ceratinócitos pela técnica de oligo *microarray* e observaram que o qRT-PCR confirmou mudança na expressão de 17 de 24 de genes (71%) (RAJEEVAN *et al.*, 2001). Em nosso estudo observamos que nem todos os resultados obtidos pelo oligo *microarray* de mRNA e miRNA apresentaram resultados semelhantes ao qRT-PCR. Sugere-se que esta diferença de resultados tenha ocorrido pelo fato de o oligo *microarray* ter sua normalização pela expressão gênica global, enquanto que, no qRT-PCR, os dados foram normalizados pelo constitutivo endógeno.

Modificações topográficas e químicas em implantes de titânio são reconhecidas por aumentar as propriedades osteogênicas (MAEDA *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2007; VETRONE *et al.*, 2009; BONFANTE *et al.*, 2011; KUBIES *et al.*, 2011; CHAKRAVORTY *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012). Em nosso estudo, observamos a expressão de genes e miRNAs que exercem influências positivas e negativas na adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos, na mineralização e na apoptose, ou seja, em importantes funções relacionadas à formação óssea, quando a superfície do titânio foi submetida a diferentes tratamentos químicos.

7. *Conclusões*

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, foi observado que:

- os tratamentos de superfície utilizados neste trabalho influenciaram o metabolismo de células osteoblásticas provenientes da crista óssea alveolar humana em relação à proliferação e viabilidade celular, síntese de proteínas, atividade de ALP e formação de matriz mineralizada.

- houve expressão diferenciada de mRNAs e miRNAs entre os grupos celulares cultivados sobre as diferentes superfícies. As diferenças nos perfis transcricionais encontradas envolvem a expressão de genes (mRNAs) e miRNAs relacionados à osteogênese, apoptose, adesão, crescimento e diferenciação celular.

Como conclusão, sugere-se que o contato de superfícies de titânio modificadas quimicamente com células osteoblásticas originárias do osso alveolar humano influencia o metabolismo destas células, assim como a modulação de genes que codificam proteínas importantes no processo de osteogênese.

Referências

REFERÊNCIAS

AMBROSETTI D, HOLMES G, MANSUKHANI A, BASILICO C. Fibroblast growth factor signaling uses multiple mechanisms to inhibit Wnt-induced transcription in osteoblasts. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(15):4759-4771.

AN JH, OHN JH, SONG JA, YANG JY, PARK H, CHOI HJ, KIM SW, KIM SY, PARK WY, SHIN CS. Changes of microRNA profile and microRNA-mRNA regulatory network in bones of ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2014; 29(3):644-656.

ASSIS AF, BELOTI MM, CRIPPA GE, DE OLIVEIRA PT, MORRA M, ROSA AL. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20:240–246.

BAGLIO SR, DEVESCOVI V, GRANCHI D, BALDINI N. MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene.* 2013; 527:321–331.

BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2):281-97. BAZZONI, G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Cell Biol.* 2003; 15:525–530.

BHOLA R, SU F, KRULL CE. Functionalization of titanium based metallic biomaterials for implant applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22:1147-1159.

BOMBONATO-PRADO KF, BELLESINI LS, JUNTA CM, MARQUES MM, PASSOS GA, ROSA AL. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 88(2):401-408.

BONFANTE EA, GRANATO R, MARIN C, SUZUKI M, OLIVEIRA SR, GIRO G, COELHO PG. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and as-machined implants with healing chambers: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011; 26(1):75-82. BOYAN BD, BATZER R, KIESSWETTER K, LIU Y, COCHRAN DL, SZMUCKLER-MONCLER S, DEAN DD, SCHWARTZ Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α , 25-(OH)₂D₃. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39:77-85.

BOZZINI B, CARLINO P, D'URZO L, PEPE V, MELE C, VENTURO F. Anelectrochemical impedance investigation of the behaviour of anodically

oxidised titanium in human plasma and cognate fluids, relevant to dental applications. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19:3443–3453.

BRANEMARK, PI. Bone marrow microvascular structure and function. *Adv Microbiol*. 1968; 1:1-65.

BRANEMARK PI, BREINE U, ADEL R, HANSON BO, LINDSTROM, J, OHLSSON, A. Intraosseous anchorage of dental prosthesis. Part I: experimental studies. *Scand J Plast Reconst Surg*. 1969; 3:81-100.

BUENO MJ, PÉREZ DE CASTRO I, MALUMBRES M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*. 2008; (20):3143-3148.

CANALIS E, PARKER K, FENG JQ, ZANOTTI S. Osteoblast lineage-specific effects of Notch activation in the skeleton. *Endocrinology*. 2013; 154(2):623-34.

CHAKRAVORTY N, IVANOVSKI S, PRASADAM I, CRAWFORD R, OLOYEDE A, XIAO Y. The microRNA expression signature on modified titanium implant surfaces influences genetic mechanisms leading to osteogenic differentiation. *Acta Biomater*. 2012; 8:3516–3523.

CHAKRAVORTY N, HAMLET S, JAIPRAKASH A, CRAWFORD R, OLOYEDE A, ALFARSI M, XIAO Y, IVANOVSKI S. Pro-osteogenic topographical cues promote early activation of osteoprogenitor differentiation via enhanced TGF β , Wnt, and Notch signaling. *Clin Oral Impl Res*. 2013; 00:1-12.

CHEN Q, LIU W, SINHA KM, YASUDA H, DE CROMBRUGGHE B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58104.

CHUAQUI RF, BONNER RF, BEST CJ, GILLESPIE JW, FLAIG MJ, HEWITT SM, PHILLIPS JL, KRIZMAN DB, TANGREA MA, AHRAM M, LINEHAN WM, KNEZEVIC V, EMMERT-BUCK MR. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet*. 2002; 32 Suppl:509-514.

COLOMBO JS, CARLEY A, FLEMING GJ, CREAN SJ, SLOAN AJ, WADDINGTON RJ. Osteogenic potential of bone marrow stromal cells on smooth, roughened, and tricalcium phosphate-modified titanium alloy surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012; 27(5):1029-1042.

COMEGNA M, SUCCOIO M, NAPOLITANO M, VITALE M, D'AMBROSIO C, SCALONI A, PASSARO F, ZAMBRANO N, CIMINO F, FARAONIO R. Identification of miR-494 direct targets involved in senescence of human diploid fibroblasts. *FASEB J*. 2014; 28:3720–3733.

DALLAS PB, GOTTARDO NG, FIRTH MJ, BEESLEY AH, HOFFMANN K, TERRY PA, FREITAS JR, BOAG JM, CUMMINGS AJ, KEES UR. *Gene*

expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC Genomics*. 2005;6:59.

DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, BELOTI MM, ROSA AL, NANCI A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res*. 2007; 80A: 554–564.

DE OLIVEIRA PT, OLIVA MA, MAXIMIANO WMA, SEBASTIÃO KEV, CRIPPA GE, CIANCAGLINI P, BELOTI MM, NANCI A, ROSA AL. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56:629–638.

DEBIAIS F, HOTT M, GRAULET AM, MARIE PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res*. 1998; 13(4):645-654.

DENG Y, WU S, BI X, WANG Y, HU Y, GU P, FAN X. Effects of a miR-31, Runx2, and Satb2 regulatory loop on the osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013; 22(16):2278-2286.

DOWNEY PA, SIEGEL MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *PHYS THER*. 2006; 86:77-91.

DUAN Z, CHOY E, HARMON D, LIU X, SUSAN M, MANKIN H, HORNICEK F. MicroRNA-199a-3p is down regulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10(8): 1337–1345.

ELIAS CN, ROESTEL J, ZUCARELI MA, CAMPANERI C, RESENDE CRS. Implantes de titânio comercialmente puro com alta resistência mecânica para aplicações em Odontologia. *ImplantNews* 2013; 10(6):74-81.

ESPOSITO M, HIRSCH JM, LEKHOLM U, THOMSEN P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. II. Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci*. 1998; 106:721–764.

FEITO MJ, LOZANO RM, ALCAIDE M, RAMIREZ-SANTILLÁN C, ARCOS D, VALLET-REGÍ M, PORTOLÉS MT. Immobilization and bioactivity evaluation of FGF-1 and FGF-2 on powdered silicon-doped hydroxyapatite and their scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med*. 2011; 22:405–416.

FELIX JM, DRUMMOND RD, ROSA JUNIOR VE, JORGE RA, ARRUDA P, MENOSSI M. Genoma Funcional, Uso de arranjos de DNA em náilon para a análise da expressão gênica em larga escala. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2002; 24: 60-67.

FERGUSON JS, LANGHOFF JD, VOELTER K, VON RECHENBERG B, SHARNWEBER D, BIERBAUM S, SCHNABELRAUCH M, KAUTZ AR, FRAUCHIGER VM, MUELLER TL, VAN LENTHE GH, SCHLOTTIG F.

Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008; 23(6):1037-1046.

FUJIMOTO T, IMAI K, TAKAHASHI M, HATANO T, TAMAI M, NAKANO T, SAKAMOTO H, OHATA K. Retrospective assessment of the dismasking flap procedure as a craniofacial approach. *J Neurosurg Pediatrics*. 2011; 7(4):345-350.

GAO Y, JHEON A, NOURKEYHANI H, KOBAYASHI H, GANSS B. Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene*. 2004; 341:101–110.

GAO J, YANG T, HAN J, YAN K, QIU X, ZHOU Y, FAN Q, MA B. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem*. 2011; 112:1844–1856.

GONG SH, LEE H, PAE A, NOH K, SHIN YM, LEE JH, WOO YH. Gene expression of MC3T3-E1 osteoblastic cells on titanium and zirconia surface. *J Adv Prosthodont*. 2013; 5:416-422.

GOTO T, YOSHINARI M, KOBAYASHI S, TANAKA T. The initial attachment and subsequent behavior of osteoblastic cells and oral epithelial cells on titanium. *Biomed Mater Eng*. 2014; 14:537–544.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004; 329:77-84.

GRIFFITHS AJF, WESSLER SR, LEWONTIN RC, GELBART WM, SUZUKI DT, MILLER JH. *Introdução à Genética*. 9ª ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan, 2009, 764p.

GUIL S, ESTELLER M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(1):87-95.

GUINDALINI C, TUFIK S. Use of microarrays in the search of gene expression patterns: application to the study of complex phenotypes. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007; 29(4):370-374.

GUO YL, BAI R, CHEN CXJ, LIU DQ, LIU Y, ZHANG CY, ZEN K. Role of junctional adhesion molecule-like protein in mediating monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:75-83.

HAN P, JI WP, ZHAO CL, ZHANG XN, JIANG Y. Improved osteoblast proliferation, differentiation and mineralization on nanophase Ti6Al4V. *Chin Med J (Engl)*. 2011; 124(2):273-279.

HARA T, MATSUOKA K, MATSUZAKA K, YOSHINARI M, INOUE T. Effect of surface roughness of titanium dental implant placed under periosteum on gene expression of bone morphogenic markers in rat. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2012; 53(2):45–50.

HASSAN MQ, MAEDA Y, TAIPALEENMAKI H, ZHANG W, JAFFERJI M, GORDON JAR, LI Z, CROCE CM, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J Biol Chem.* 2012; 287(50):42084–42092.

HAUSSER J, ZAVOLAN M. Identification and consequences of miRNA–target interactions — beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014; 15(9):599–612.

HUESA C, YADAV MC, FINNILÄ MAJ, GOODYEAR SR, ROBINS SP, TANNER KE, ASPDEN RM, MILLÁN JL, FARQUHARSON C. PHOSPHO1 is essential for mechanically competent mineralization and the avoidance of spontaneous fractures. *Bone.* 2011; 48(5):1066–1074.

HYNES, RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110:673–687.

JIN YPENG D, SHEN Y, XU M, LIANG Y, XIAO B, LU J. MicroRNA-376c inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by targeting to transforming growth factor- α . *DNA Cell Biol.* 2013; 32(6):302–309.

JOHNSEN SP, SORENSEN HT, LUCHT U, SOBALLE K, OVERGAARD S, PEDERSEN AB. Patient-related predictors of implant failure after primary total hip replacement in the initial, short and long-terms. A nationwide Danish follow-up study including 36,984 patients. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88:1303–1308.

JULLIEN N, MAUDINET A, LELOUTRE B, RINGE J, HÄUPL T, MARIE PJ. Downregulation of ErbB3 by Wnt3a contributes to Wnt-induced osteoblast differentiation in mesenchymal cells. *J Cell Biochem.* 2012; 113:2047–2056.

JULLIEN N, DIEUDONNÉ FX, HABEL N, MARTY C, MODROWSKI D, PATINO A, LECANDA F, SÉVÈRE N, MARIE PJ. ErbB3 silencing reduces osteosarcoma cell proliferation and tumor growth in vivo. *Gene.* 2013; 521:55–61.

JUNQUEIRA LCU, CARNEIRO J. *Histologia básica: texto e atlas.* 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 540p

KIM CS, SOHN SH, JEON SK, KIM KN, RYU JJ, KIM MK. Effect of various implant coatings on biological responses in MG63 using oligo array. *J Oral Rehabil.* 2006; 33(5):368–379.

KIM VN, NAM JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet.* 2006; 22(3):165-173.

KIM S. A study of microRNAs in silico and in vivo. *FEBS J.* 2009; 276(8):2139.

KLOEN P, DI PAOLA M, BORENS O, RICHMOND J, PERINO G, HELFET DL, GOUMANS MJ. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. *Bone.* 2003; 33:362–371.

KOIKE M, HUMMEL SK, BALL JD, OKABE T. Fabrication of titanium removable dental prosthesis frameworks with a 2-step investment coating method. *J Prosthet Dent.* 2012; 107(6):393-399.

KOSURI S, CHURCH GM. Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nat Methods.* 2014; 11(5):499-507.

KRIPARAMANAN R, ASWATH P, ZHOU A, TANG L, NGUYEN KT. Nanotopography: cellular responses to nanostructured materials. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6(7):1905-1919.

KUBIES D, HIMMLOVÁ L, RIEDEL T, CHÁNOVÁ E, BALÍK K, DOUDĚROVÁ M, BÁRTOVÁ J, PEŠÁKOVÁ V. The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. *Physiol Res.* 2011; 60(1):95-111.

KUBO K, TSUKIMURA N, IWASA F, UENO T, SARUWATARI L, AITA H, CHIOU WA, OGAWA T. Cellular behavior on TiO₂ nanonodular structures in a micro-to-nanoscale hierarchy model. *Biomaterials.* 2009; 30(29):5319-5329.

KUNG WM, LIN FH, HSIAO SH, CHIU WT, CHYAU CC, LU SH, HWANG B, LEE JH, LIN MS. New reconstructive technologies after decompressive craniectomy in traumatic brain injury: the role of three-dimensional titanium mesh. *J Neurotrauma.* 2012; 29:2030–2037.

LAN YF, CHEN HH, LAI PF, CHENG CF, HUANG YT, LEE YC, CHEN TW, LIN H. MicroRNA-494 reduces ATF3 expression and promotes AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(12):2012-2023.

LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75(5):843-854.

LEE BA, KANG CH, VANG MS, JUNG YS, PIAO XH, KIM OS, CHUNG HJ, KIM YJ. Surface characteristics and osteoblastic cell response of alkali-and heat-treated titanium-8tantalum-3niobium alloy. *J Periodontal Implant Sci.* 2012; 42:248-255.

LEUNG YF, CAVALIERI D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet.* 2003; 19(11):649-659.

LI Z, HASSAN MQ, JAFFERJI M, AQEILAN RI, GARZON R, CROCE CM, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, STEIN GS, LIAN JB. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009; 284(23):15676–15684.

LIAN JB, STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, HASSAN MQ, GAUR T, ZHANG Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8(4):212-227.

LIM LP, LAU NC, GARRETT-ENGELE P, GRIMSON A, SCHELTER JM, CASTLE J, BARTEL DP, LINSLEY PS, JOHNSON JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433(7027):769-773.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.

LYNAM-LENNON N, MAHER SG, REYNOLDS JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2009; 84(1):55-71.

MAEDA M, HIROSE M, OHGUSHI H, KIRITA T. In vitro mineralization by mesenchymal stem cells cultured on titanium scaffolds. *Biochem.* 2007; 141(5):729-36, 2007.

MAILHOT JM, BORKE JL. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clin Oral Implants Res.* 1998; 9(1):43-50.

MALUF PSZ, MAROTTI J, KOMATSU C, ARCANGELLI P. Vantagens do tratamento de superfície a laser em implantes dentais osseointegráveis. *Revista ImplantNews.* 2007; 4(6):643-646.

MANIATOPOULOS 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):317-330.

MANSUKHANI A, BELLOSTA P, SAHNI M, BASILICO C. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)–activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol.* 2000; 149(6):1297–1308.

MATSUO N, TANAKA S, GORDON MK, KOCH M, YOSHIOKA H, RAMIREZ F. CREB-AP1 protein complexes regulate transcription of the collagen xxiv gene (Col24a1) in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2006; 281(9):5445–5452.

MATSUO N, TANAKA S, YOSHIOKA H, KOCH M, GORDON M, RAMIREZ F. Collagen XXIV (Col24a1) gene expression is a specific marker of osteoblast differentiation and bone formation. *Connect Tissue Res*. 2008; 49:68–75.

MCCRACKEN M, LEMONS JE, ZINN K. Analysis of Ti-6Al-4V implants placed with fibroblast growth factor 1 in rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001; 16(4):495-502.

MILLÁN JL. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2013; 93:299–306.

MOORTHY A, VIMALRAJ S, AVANI C, HE Z, PARTRIDGE NC, SELVAMURUGAN N. Expression of microRNA-30c and its target genes in human osteoblastic cells by nano-bioglass ceramic-treatment. *Int J Biol Macromol*. 2013; 56:181-185.

NAKARO A, KOINUMA D, MIYAZAWA K, UCHIDA T, SAITOH M, KAWABATA M, HANAI J, AKIYAMA H, ABE M, MIYAZONO K, MATSUMOTO T, IMAMURA T. Pin1 down-regulates transforming growth factor- β (TGF- β) signaling by inducing degradation of smad proteins. *J Biol Chem*. 2009; 284(10):6109–6115.

NIE X. Developmentally regulated expression of Msx1, Msx2 and Fgfs in the developing mouse cranial base. *Angle Orthodontist*. 2006; 76(6):990-995.

NIINOMI M, NAKAI M. Titanium-Based Biomaterials for Preventing Stress shielding between Implant Devices and Bone. *Int J Biomater*. 2011; 2011:836587.

NISHIO K, NEO M, AKIYAMA H, NISHIGUSHI S, KIM KM, KOKUBO T, NAKAMURA T. The effect of alkali- and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52:652-661.

NOBTA M, TSUKAZAKI T, SHIBATA Y, XIN C, MORIISHI T, SAKANO S, SHINDO H, YAMAGUCHI A. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280:15842-15848.

OISHI T, UEZUMI A, KANAJI A, YAMAMOTO N, YAMAGUCHI A, YAMADA H, TSUCHIDA K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. *PLoS ONE*. 2013; 8(2):e56641.

OKAMOTO H, MATSUMI Y, HOSHIKAWA Y, TAKUBO K, RYOKE K, SHIOTA G. Involvement of micrnas in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells. PLoS ONE. 2012; 7(8):e43800.

PÄÄKKÖNEN V, TJÄDERHANE, L. High-throughput gene and protein expression analysis in pulp biologic research: review. JOE. 2010; 36(2):179-189.

PALAIIOLOGOU A, STOUTE D, FAN Y, LALLIER T. Altered cell motility and attachment with titanium surface modifications. J Periodontol. 2012; 83(1):90-100.

PALMIERI A, PEZZETI F, BRUNELLI G, MARTINELLI M, MUZIO LL, SCARANO A, SCAPOLI L, ARLOTTI M, GUERZONI L, CARINCI F. Anorganic bovine bone (Bio-Oss) regulates miRNA of osteoblast-like cells. Int J Periodontics Restorative Dent. 2010; 30:83-87.

PALMIERI A, PEZZETTI F, AVANTAGGIATO A, LO MUZIO L, SCARANO A, RUBINI C, GUERZONI L, ARLOTTI M, VENTORRE D, CARINCI F. Titanium acts on osteoblast translational process. J Oral Implantol. 2008; 34(4):190-195.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 2001, 29(9):e45.

POITZ DM, STÖLZEL F, ARABANIAN L, FRIEDRICHS J, DOCHEVA D, SCHIEKER M, FIERRO FA, PLATZBECKER U, ORDEMANN R, WERNER C, BORNHÄUSER M, STRASSER RH, EHNINGER G, ILLMER T. MiR-134-mediated β 1 integrin expression and function in mesenchymal stem cells. Biochimica et Biophysica Acta. 2013; 1833:3396–3404.

POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEZ M, RAMIREZ-VICK JE. Scaffold design for bone regeneration. J Nanosci Nanotechnol. 2014; 14(1):15–56.

POPA MV, VASILESCU E, DROB P, VASILESCU C, DEMETRESCU I, IONITA D. Long-term assessment of the implant titanium material—artificial saliva interface. J Mater Sci Mater Med. 2008; 19:1–9.

QU Z, RAUSCH-FAN X, WIELAND M, MATEJKA M, SCHEDLE A. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. J Biomed. Mater. Res. 2007; 82(3):658-668.

RAJEEVAN MS, VERNON SD, TAYSAVANG N, UNGER ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. J Mol Diagn. 2001; 3(1):26-31.

RAUSCH-FAN X, QU Z, WIELAND M, MATEJKA M, SCHEDLE A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-

like cells (MG63) in response to titanium surfaces. *Dental Materials*. 2008; 24:102-110.

ROBERTS S, NARISAWA S, HARMEY D, MILLAÍN JL, FARQUHARSON C. Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res*. 2007; 22:617–627.

RODRIGUES RCS, FARIA ACL, ORSI IA, MATTOS MGC, MACEDO AP, RIBEIRO RF. Comparative study of two commercially pure titanium casting methods. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(5):487-492.

SANTIAGO-MEDINA P, SUNDARAM PA, DIFFOOT-CARLO N. The effects of micro arc oxidation of gamma titanium aluminide surfaces on osteoblast adhesion and differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 2014; 25(6):1577-1587.

SCHLIEPHAKE H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 31:469–484.

SCHNEIDER MR, SIBILIA M, ERBEN RG. The EGFR network in bone biology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20(10):517-524.

SCHWARTZ Z, BOYAN BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem*. 1994; 56:340-347.

SERRA R, KARAPLIS A, SOHN P. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor β (TGF β) on Endochondral Bone Formation. *J Cell Biol*. 1999; 145:783-794.

STEWART AJ, ROBERTS SJ, SEAWRIGHT E, DAVEY MG, FLEMING RH, FARQUHARSON C. The presence of PHOSPHO1 in matrix vesicles and its developmental expression prior to skeletal mineralization. *Bone*. 2006; 39:1000–1007.

SVERZUT AT, DE ALBUQUERQUE GC, CRIPPA GE, CHIESA R, VALLE CD, DE OLIVEIRA PT, BELOTI MM, ROSA AL. Bone tissue, cellular, and molecular responses to titanium implants treated by anodic spark deposition. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012; 100A:3092-3098.

TAKAHASHI N, SATO N, TAKAHASHI S, TOJO A. Gene-expression profiles of peripheral blood mononuclear cell subpopulations in acute graft-vs-host disease following cord blood transplantation. *Exp Hematol*. 2008; 36:1760–1770.

TAN G, TAN Y, NI G, LAN G, ZHOU L, YU P, LIAO J, ZHANG Y, YIN Z, WANG H, NING C. Controlled oxidative nanopatterning of microrough titanium surfaces for improving osteogenic activity. *J Mater Sci: Mater Med*. 2014; 25:1875-1884.

TEKUZA K, YASUDA M, WATANABE N, MORIMURA N, KURODA K, MIYATANI S, HOZUMI N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res.* 2002; 17:231-239.

THE GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000; 25(1):25-29.

THE GENE ONTOLOGY website. <http://www.geneontology.org>. Acesso em 20/02/2014.

TOLSTUNOV, L. Implant zones of the jaws: implant location and related success rate. *J Oral Implantol.* 2007; 33: 211-220.

TORRES EM, CARREIRO AFP, LIRA CMN, RIBEIRO RF. Utilização do titânio na confecção de estruturas metálicas em prótese parcial removível. *RGO.* 2007; 55(2):181-189.

VAN MEERLOO J, KASPERS GJ, CLOOS J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011; 731:237-245.

VAN STEENBERGHE D, JACOBS R, DESNYDER M, MAFFEI G, QUIRYNEN M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Implant Res.* 2002; 13:617–622.

VAN WIJNEN AJ, VAN DE PEPPEL J, VAN LEEUWEN JP, LIAN JB, STEIN GS, WESTENDORF JJ, OURSLER MJ, IM HJ, TAIPALEENMÄKI H, HESSE E, RIESTER S, KAKAR S. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2013; 11(2):72-82.

VANDAMME K, HOLY X, BENSIDHOUM M, LOGEART-AVRAMOGLU D, NAERT IE, DUYCK JA, PETITE H. In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. *Biomaterials.* 2011; 32(14):3547-3554.

VARIOLA F, YI JH, RICHERT L, WUEST JD, ROSEI F, NANCI A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials.* 2008; 29(10):1285-1298.

VARIOLA F, LAURIA A, NANCI A, ROSEI F. Influence of treatment conditions on the chemical oxidative activity of H₂SO₄/H₂O₂ mixtures for modulating the topography of titanium. *Adv Eng Mater.* 2009; 11(12):B227-B234.

VETRONE F, VARIOLA F, DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, YI JI, SAM J, BOMBONATO-PRADO KF, SARKISSIAN A, PEREPICHKA DF, WUEST JD, ROSEI F, NANCI A. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett.* 2009; 9(2):659-665.

VLACIC-ZISCHKE J, HAMLET SM, FRIIS T, TONETTI MS, IVANOVSKI S. The influence of surface microroughness and hydrophilicity of titanium on the up-regulation of TGF β /BMP signalling in osteoblasts. *Biomaterials*. 2011; 32(3):665-671.

WANG W, OLSON D, LIANG G, FRANCESCHI RT, LI C, WANG B, WANG SS, YANG S. Collagen XXIV (Col24 α 1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF- β /Smads signaling pathway. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8(10):1310-1322.

WENNERBERG A, ALBREKTSSON T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin. Oral Impl. Res.* 2009; 20(4):172-184.

WU Q, WANG M, ZUSCIK MJ, CHEN D, O'KEEFE RJ, ROSIER RN. Regulation of embryonic endochondral ossification by Smurf2. *J Orthop Res.* 2008; 26(5):704–712.

XIAO J, ZHOU H, ZHAO L, SUN Y, GUAN S, LIU B, KONG L. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *Osteoporos Int.* 2011, 22:1907-1913.

YAMAMICHI N, PUGDEE K, CHANG WJ, LEE SY, YOSHINARI M, HAYAKAWA T, ABIKO Y. Gene expression monitoring in osteoblasts on titanium coated with fibronectin-derived peptide. *Dent Mater J.* 2008; 27(5):744-750.

YAVROPOULOU MP, YOVOS JG. The role of notch signaling in bone development and disease. *Hormones*. 2014; 13(1):24-37.

YILDIZ A, ESEN E, KÜRKÇÜ M, DAMLAR I, DAĞLIOĞLU K, AKOVA T. Effect of zoledronic acid on osseointegration of titanium implants: an experimental study in an ovariectomized rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(3):515-523.

ZANOTTI S, SMERDEL-RAMOYA A, STADMEYER L, DURANT D, RADTKE F, CANALIS E. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology*. 2008; 149: 3890-3899.

ZANOTTI S, CANALIS E. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(4):886-896.

ZHANG Y, CHANG C, GEHLING DJ, HEMMATI-BRIVANLOU A, DERYNCK R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *PNAS*. 2001; 98(3):974-979.

ZHAO X, XU D, LI Y, ZHANG J, LIU T, JI Y, WANG J, ZHOU G, XIE X. MicroRNAs regulate bone metabolism. *J Bone Miner Metab.* 2014; 32:221–231.

ZHOU YINGCHUAN, LIU YI, CHENG LI. miR-21 expression is related to particle-induced osteolysis pathogenesis. *J Orthop Res*. 2012; 30:1837–1842.

ZHOU M, MA J, CHEN S, CHEN X, YU X. MicroRNA-17-92 cluster regulates osteoblast proliferation and differentiation. *Endocrine*. 2014; 42(2):302-310.

Anexos

ANEXOS

ANEXO A - Lista dos genes encontrados como diferencialmente expressos

(continua)

Símbolos	Nomes
AADACL3	arylacetamide deacetylase-like 3
AATK	apoptosis-associated tyrosine kinase
ABCA13	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13
ABCB9	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9
ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2
ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
ABHD3	abhydrolase domain containing 3
ACSBG1	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1
ACTL9	actin-like 9
ACTRT1	actin-related protein T1
ADAM11	ADAM metallopeptidase domain 11
ADAMTS6	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 6
ADH7	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
AGSK1	golgin subfamily A member 2-like
AHCTF1	AT hook containing transcription factor 1
AHR	aryl hydrocarbon receptor
AHSA2	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)
AIPL1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1
AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
AKD1	adenylate kinase domain containing 1
ALMS1P	Alstrom syndrome 1 pseudogene
AMICA1	adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1
AMN1	antagonist of mitotic exit network 1 homolog (S. cerevisiae)
AMY1C	amylase, alpha 1C (salivary)
ANKRD17	ankyrin repeat domain 17
ANKRD26	ankyrin repeat domain 26
ANTXR2	anthrax toxin receptor 2
ANXA3	annexin A3
AOC4	AOC3 pseudogene
APBB3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 3
AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)
ARAP1	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9
ARID4A	AT rich interactive domain 4A (RBP1-like)
ARL13B	ADP-ribosylation factor-like 13B
ARL15	ADP-ribosylation factor-like 15
ARL6	ADP-ribosylation factor-like 6
ARMCX4	armadillo repeat containing, X-linked 4
ASB9	ankyrin repeat and SOCS box containing 9

(continuação)

Símbolos	Nomes
ASTN2	astrotactin 2
ATG10	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)
ATOH1	atonal homolog 1 (Drosophila)
ATP13A4	ATPase type 13A4
ATP6V0A4	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a4
ATXN10	ataxin 10
B3GNT4	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4
BAI3	brain-specific angiogenesis inhibitor 3
BAZ1B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B
BCL11A	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB
BMS1P1	BMS1 pseudogene 1
BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
BTBD11	BTB (POZ) domain containing 11
BTB	biotinidase
BTK	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
C10orf118	chromosome 10 open reading frame 118
C10orf27	chromosome 10 open reading frame 27
C10orf71	chromosome 10 open reading frame 71
C11orf86	chromosome 11 open reading frame 86
C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1
C14orf86	chromosome 14 open reading frame 86
C15orf33	chromosome 15 open reading frame 33
C15orf42	chromosome 15 open reading frame 42
C19orf21	chromosome 19 open reading frame 21
C19orf59	chromosome 19 open reading frame 59
C1orf170	chromosome 1 open reading frame 170
C1orf51	chromosome 1 open reading frame 51
C1orf96	chromosome 1 open reading frame 96
C1orf98	chromosome 1 open reading frame 98
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain
C20orf107	chromosome 20 open reading frame 107
C21orf7	chromosome 21 open reading frame 7
C21orf71	chromosome 21 open reading frame 71
C21orf88	chromosome 21 open reading frame 88
C22orf32	chromosome 22 open reading frame 32
C2CD4A	C2 calcium-dependent domain containing 4A
C2orf51	chromosome 2 open reading frame 51
C2orf73	chromosome 2 open reading frame 73
C2orf73	chromosome 2 open reading frame 73
C3orf55	chromosome 3 open reading frame 55

(continuação)

Símbolos	Nomes
C5orf43	chromosome 5 open reading frame 43
C6orf170	chromosome 6 open reading frame 170
C6orf228	chromosome 6 open reading frame 228
C8orf86	chromosome 8 open reading frame 86
C9orf117	chromosome 9 open reading frame 117
C9orf171	chromosome 9 open reading frame 171
C9orf47	chromosome 9 open reading frame 47
CACNG4	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4
CARD9	caspase recruitment domain family, member 9
CCDC112	coiled-coil domain containing 112
CCDC138	coiled-coil domain containing 138
CCDC152	coiled-coil domain containing 152
CCDC48	coiled-coil domain containing 48
CCDC54	coiled-coil domain containing 54
CCDC60	coiled-coil domain containing 60
CCDC66	coiled-coil domain containing 66
CCDC85A	coiled-coil domain containing 85A
CCL14	chemokine (C-C motif) ligand 14
CD163	CD163 molecule
CD28	CD28 molecule
CD300LB	CD300 molecule-like family member b
CD69	CD69 molecule
CDC14A	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
CDC14C	CDC14 cell division cycle 14 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)
CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1
CDRT1	CMT1A duplicated region transcript 1
CDX1	caudal type homeobox 1
CEACAM22P	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 2, pseudogene
CELF4	CUGBP, Elav-like family member 4
CENPF	centromere protein F, 350/400kDa (mitosin)
CENPI	centromere protein I
CEP152	centrosomal protein 152kDa
CETP	cholesteryl ester transfer protein, plasma
CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2
CHRNA4	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4
CHST6	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6
CKMT1A	creatine kinase, mitochondrial 1A
CLEC1A	C-type lectin domain family 1, member A
CLEC1B	C-type lectin domain family 1, member B
CLK4	CDC-like kinase 4
CLMN	calmin (calponin-like, transmembrane)
CLTC	clathrin, heavy chain (Hc)

(continuação)

Símbolos	Nomes
CMAHP	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene
CMAHP	cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, pseudogene
CNNM1	cyclin M1
CNTFR	ciliary neurotrophic factor receptor
CNTNAP3B	contactin associated protein-like 3B
CNTRL	centriolin
COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus)
COL24A1	collagen, type XXIV, alpha 1
COL4A6	collagen, type IV, alpha 6
CTRB1	chymotrypsinogen B1
CXorf66	chromosome X open reading frame 66
CYP24A1	cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
DAB1	disabled homolog 1 (Drosophila)
DBF4B	DBF4 homolog B (S. cerevisiae)
DCAF4L2	DDB1 and CUL4 associated factor 4-like 2
DDX26B	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26B
DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
DEFB107A	defensin, beta 107A
DIS3L2	DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae)-like 2
DISP2	dispatched homolog 2 (Drosophila)
DKFZP434A062	uncharacterized LOC26102
DKFZP547J0410	DKFZP547J0410 protein
DKFZP586B0319	DKFZP586B0319 protein
DKK2	dickkopf 2 homolog (Xenopus laevis)
DLGAP1	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1
DMTF1	cyclin D binding myb-like transcription factor 1
DNAL4	dynein, axonemal, light chain 4
DNER	delta/notch-like EGF repeat containing
DPY19L2P3	dpy-19-like 2 pseudogene 3 (C. elegans)
DTX4	deltex homolog 4 (Drosophila)
DUSP19	dual specificity phosphatase 19
E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding
ECT2L	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene-like
EDDM3B	epididymal protein 3B
EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
EML1	echinoderm microtubule associated protein like 1
ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)
EPB41L5	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5
EPM2AIP1	EPM2A (laforin) interacting protein 1
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
ERMN	ermin, ERM-like protein

(continuação)

Símbolos	Nomes
ERO1LB	ERO1-like beta (<i>S. cerevisiae</i>)
ERVFRD-1	endogenous retrovirus group FRD, member 1
EYA4	eyes absent homolog 4 (<i>Drosophila</i>)
F13B	coagulation factor XIII, B polypeptide
FAM124B	family with sequence similarity 124B
FAM197Y2P	family with sequence similarity 197, Y-linked, member 2, pseudogene
FAM25C	family with sequence similarity 25, member C
FAM55B	family with sequence similarity 55, member B
FAM70A	family with sequence similarity 70, member A
FAM72A	family with sequence similarity 72, member A
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FAT3	FAT tumor suppressor homolog 3 (<i>Drosophila</i>)
FBLL1	fibrillar-like 1
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)
FHL1	four and a half LIM domains 1
FKTN	fukutin
FLJ11710	uncharacterized protein FLJ11710
FLJ26850	FLJ26850 protein
FLJ30403	uncharacterized LOC729975
FLJ33534	uncharacterized LOC285150
FLJ33996	uncharacterized protein FLJ33996
FLJ35390	uncharacterized LOC255031
FLJ38109	uncharacterized LOC386627
FLJ41327	FLJ41327 protein
FLJ42969	uncharacterized LOC441374
FMO5	flavin containing monooxygenase 5
FONG	uncharacterized LOC348751
FRMD5	FERM domain containing 5
FSD1	fibronectin type III and SPRY domain containing 1
FUT5	fucosyltransferase 5 (alpha (1,3) fucosyltransferase)
G2E3	G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase
GAL3ST3	galactose-3-O-sulfotransferase 3
GALNT13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GalNAc-T13)
GAS7	growth arrest-specific 7
GATA4	GATA binding protein 4
GBP4	guanylate binding protein 4
GCH1	GTP cyclohydrolase 1
GDF7	growth differentiation factor 7
GHITM	growth hormone inducible transmembrane protein
GIMAP6	GTPase, IMAP family member 6

(continuação)

Símbolos	Nomes
GJB1	gap junction protein, beta 1, 32kDa
GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
GPR182	G protein-coupled receptor 182
GPR65	G protein-coupled receptor 65
GREB1L	growth regulation by estrogen in breast cancer-like
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
GRIN2A	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
GTF2IRD2B	GTF2I repeat domain containing 2B
GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa
GUCY2E	guanylate cyclase 2E
GULP1	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
GZF1	GDNF-inducible zinc finger protein 1
HAS2-AS1	HAS2 antisense RNA 1 (non-protein coding)
HAUS5	HAUS augmin-like complex, subunit 5
HESX1	HESX homeobox 1
HIPK1	homeodomain interacting protein kinase 1
HMG20B	high mobility group 20B
HOMER2	homer homolog 2 (Drosophila)
HOXB5	homeobox B5
HR	hairless homolog (mouse)
HSF4	heat shock transcription factor 4
HTATSF1P2	HIV-1 Tat specific factor 1 pseudogene 2
HULC	highly up-regulated in liver cancer (non-protein coding)
HYDIN	hydrocephalus inducing homolog (mouse)
IFNA21	interferon, alpha 21
IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2
IL17A	interleukin 17A
IL23R	interleukin 23 receptor
IL26	interleukin 26
INTS4	integrator complex subunit 4
ISPD	isoprenoid synthase domain containing
JSRP1	junctional sarcoplasmic reticulum protein 1
KANK3	KN motif and ankyrin repeat domains 3
KANK3	KN motif and ankyrin repeat domains 3
KCND1	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 1
KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3
KCNG2	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2
KCNH3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
KCNT2	potassium channel, subfamily T, member 2
KDM6B	lysine (K)-specific demethylase 6B

(continuação)

Símbolos	Nomes
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KIAA0485	uncharacterized LOC57235
KIAA0664	KIAA0664
KIAA0754	KIAA0754
KIAA1109	KIAA1109
KIAA1147	KIAA1147
KIAA1324	KIAA1324
KIAA1751	KIAA1751
KIF13A	kinesin family member 13A
KIRREL2	kin of IRRE like 2 (Drosophila)
KLB	klotho beta
KLHDC8A	kelch domain containing 8A
KLHL15	kelch-like 15 (Drosophila)
KLHL34	kelch-like 34 (Drosophila)
KLKP1	kallikrein pseudogene 1
KLRAP1	killer cell lectin-like receptor subfamily A pseudogene 1
KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
KPNA7	karyopherin alpha 7 (importin alpha 8)
KRT40	keratin 40
KRT8	keratin 8
KRTAP10-12	keratin associated protein 10-12
KRTAP13-1	keratin associated protein 13-1
KRTAP2-2	keratin associated protein 2-2
KRTAP7-1	keratin associated protein 7-1 (gene/pseudogene)
KSR1	kinase suppressor of ras 1
LAMC3	laminin, gamma 3
LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)
LARP7	La ribonucleoprotein domain family, member 7
LARP7	La ribonucleoprotein domain family, member 7
LCE2C	late cornified envelope 2C
LCORL	ligand dependent nuclear receptor corepressor-like
LGALS14	lectin, galactoside-binding, soluble, 14
LGI1	leucine-rich, glioma inactivated 1
LGR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LILRA3	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3
LILRB4	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
LIM2	lens intrinsic membrane protein 2, 19kDa
LIMCH1	LIM and calponin homology domains 1
LINC00113	long intergenic non-protein coding RNA 113
LINC00207	long intergenic non-protein coding RNA 207
LINC00355	long intergenic non-protein coding RNA 355

(continuação)

Símbolos	Nomes
LINC00466	long intergenic non-protein coding RNA 466
LMOD1	leiomodín 1 (smooth muscle)
LOC100128226	hypothetic protein
LOC100128281	uncharacterized LOC100128281
LOC100128682	uncharacterized LOC100128682
LOC100128792	uncharacterized LOC100128792
LOC100129186	uncharacterized LOC100129186
LOC100129413	uncharacterized LOC100129413
LOC100130557	uncharacterized LOC100130557
LOC100130811	ig heavy chain V-I region V35-like
LOC100131048	uncharacterized LOC100131048
LOC100131138	uncharacterized LOC100131138
LOC100131581	uncharacterized LOC100131581
LOC100131756	uncharacterized LOC100131756
LOC100132249	uncharacterized LOC100132249
LOC100133131	uncharacterized LOC100133131
LOC100133299	GALI1870
LOC100287326	uncharacterized LOC100287326
LOC100505890	uncharacterized LOC100505890
LOC100506247	uncharacterized LOC100506247
LOC100507236	uncharacterized protein LOC100507236
LOC116437	uncharacterized LOC116437
LOC127841	uncharacterized LOC127841
LOC143286	uncharacterized LOC143286
LOC154761	uncharacterized LOC154761
LOC158572	uncharacterized LOC158572
LOC201617	uncharacterized LOC201617
LOC219731	uncharacterized LOC219731
LOC221946	uncharacterized LOC221946
LOC283404	uncharacterized LOC283404
LOC283761	uncharacterized LOC283761
LOC286272	uncharacterized LOC286272
LOC286359	uncharacterized LOC286359
LOC387646	leucine rich repeat containing 37, member A family pseudogene
LOC389602	uncharacterized LOC389602
LOC401052	uncharacterized LOC401052
LOC440173	uncharacterized LOC440173
LOC440600	uncharacterized LOC440600
LOC441025	uncharacterized LOC441025
LOC441461	uncharacterized LOC441461
LOC442497	uncharacterized LOC442497
LOC57399	uncharacterized gastric protein ZA52P

(continuação)

Símbolos	Nomes
LOC643486	bromodomain, testis-specific pseudogene
LOC644050	uncharacterized LOC644050
LOC644366	uncharacterized LOC644366
LOC646851	putative uncharacterized protein LOC388900
LOC678655	uncharacterized LOC678655
LOC728147	uncharacterized LOC728147
LOC729156	GTF2I repeat domain containing 1-like
LOC729852	uncharacterized LOC729852
LOC90834	uncharacterized protein BC001742
LONRF1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1
LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2
LRCH4	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 4
LRIF1	ligand dependent nuclear receptor interacting factor 1
LRIG2	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2
LRRC16A	leucine rich repeat containing 16A
LRRC55	leucine rich repeat containing 55
LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1
LRRN2	leucine rich repeat neuronal 2
LUC7L3	LUC7-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)
LUZP2	leucine zipper protein 2
LUZP4	leucine zipper protein 4
MAB21L2	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)
MAGEB17	melanoma antigen family B, 17
MAGEC1	melanoma antigen family C, 1
MAGEC2	melanoma antigen family C, 2
MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
MANEA	mannosidase, endo-alpha
MAOB	monoamine oxidase B
MAP3K9	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1
MAPT	microtubule-associated protein tau
MECOM	MDS1 and EVI1 complex locus
MEGF11	multiple EGF-like-domains 11
METTL20	methyltransferase like 20
METTL21D	methyltransferase like 21D
MIA2	melanoma inhibitory activity 2
MIAT	myocardial infarction associated transcript (non-protein coding)
MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 10
MLLT4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 4
MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)

(continuação)

Símbolos	Nomes
MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
MOS	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog
MPHOSPH8	M-phase phosphoprotein 8
MPPED2	metallophosphoesterase domain containing 2
MREG	melanoregulin
MRO	maestro
MRV11-AS1	MRV11 antisense RNA 1 (non-protein coding)
MSR1	macrophage scavenger receptor 1
MUC1	mucin 1, cell surface associated
MUC20	mucin 20, cell surface associated
MUCL1	mucin-like 1
MXD1	MAX dimerization protein 1
MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1
MYO5C	myosin VC
N4BP2L1	NEDD4 binding protein 2-like 1
NAALAD2	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2
NANOG	Nanog homeobox
NAP1L2	nucleosome assembly protein 1-like 2
NAV3	neuron navigator 3
NBLA00301	Nbla00301
NCKAP1L	NCK-associated protein 1-like
NDP	Norrie disease (pseudoglioma)
NDUFA10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa
NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)
NEK11	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 11
NEMF	nuclear export mediator factor
NKAIN2	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase interacting 2
NME7	non-metastatic cells 7, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)
NMNAT3	nicotinamide nucleotide adenyltransferase 3
NOP14	NOP14 nucleolar protein homolog (yeast)
NOTCH1	notch 1
NPAT	nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus
NPL	N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
NRXN1	neurexin 1
NRXN1	neurexin 1
NUDT10	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10
NUMBL	numb homolog (Drosophila)-like
OBP2A	odorant binding protein 2A
OLFM1	olfactomedin 1
OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein
OR10G9	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 9

(continuação)

Símbolos	Nomes
OR1A1	olfactory receptor, family 1, subfamily A, member 1
OR1Q1	olfactory receptor, family 1, subfamily Q, member 1
OR2AK2	olfactory receptor, family 2, subfamily AK, member 2
OR2L3	olfactory receptor, family 2, subfamily L, member 3
OR52B4	olfactory receptor, family 52, subfamily B, member 4
OR52E6	olfactory receptor, family 52, subfamily E, member 6
OR5H2	olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 2
OR5M3	olfactory receptor, family 5, subfamily M, member 3
OR6A2	olfactory receptor, family 6, subfamily A, member 2
OR6C68	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 68
OR8S1	olfactory receptor, family 8, subfamily S, member 1
ORM1	orosomucoid 1
ORMDL1	ORM1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
P2RY10	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 10
PABPC5	poly(A) binding protein, cytoplasmic 5
PAEP	progesterone-associated endometrial protein
PAGE2	P antigen family, member 2 (prostate associated)
PAK3	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3
PARP11	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11
PAX7	paired box 7
PCDHA11	protocadherin alpha 11
PCDHB10	protocadherin beta 10
PCLO	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)
PDCD1LG2	programmed cell death 1 ligand 2
PDE3A	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited
PDX1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PER3	period homolog 3 (<i>Drosophila</i>)
PFKFB2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
PHC1	polyhomeotic homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
PHC1	polyhomeotic homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
PHOSPHO1	phosphatase, orphan 1
PHOSPHO2-KLHL23	PHOSPHO2-KLHL23 readthrough
PIKFYVE	phosphoinositide kinase, FYVE finger containing
PIRT	phosphoinositide-interacting regulator of transient receptor potential channels
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)
PLEKHG2	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 2
PLGLB1	plasminogen-like B1
PNMAL2	PNMA-like 2
POM121L9P	POM121 membrane glycoprotein-like 9, pseudogene
POU1F1	POU class 1 homeobox 1

(continuação)

Símbolos	Nomes
PIIP5K1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1
PPM1K	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K
PPM1L	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1L
PPM1N	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1N (putative)
PPP1R2P9	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2 pseudogene 9
PPP4R4	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4
PRO2214	uncharacterized protein PRO2214
PRR5	proline rich 5 (renal)
PRSS42	protease, serine, 42
PRUNE	prune homolog (Drosophila)
PSD2	pleckstrin and Sec7 domain containing 2
PSG8	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 8
PSMA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1
PSMD3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3
PTCD2	pentatricopeptide repeat domain 2
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
PTPRK	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K
PTPRO	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O
PTPRZ1	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1
PUS7L	pseudouridylate synthase 7 homolog (S. cerevisiae)-like
RAB3A	RAB3A, member RAS oncogene family
RAB3C	RAB3C, member RAS oncogene family
RABIF	RAB interacting factor
RAP1GAP	RAP1 GTPase activating protein
RASGRF1	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1
RBM20	RNA binding motif protein 20
RBM44	RNA binding motif protein 44
RELN	reelin
REREP3	arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats pseudogene 3
RGS21	regulator of G-protein signaling 21
RHCG	Rh family, C glycoprotein
RLTPR	RGD motif, leucine rich repeats, tropomodulin domain and proline-rich containing
RNF17	ring finger protein 17
RNF7	ring finger protein 7
RPL7	ribosomal protein L7
RPS15AP10	ribosomal protein S15a pseudogene 10
RPS21	ribosomal protein S21
RRAD	Ras-related associated with diabetes
SBDSP1	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome pseudogene 1
SCARNA1	small Cajal body-specific RNA 1
SCGB1A1	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)
SCML4	sex comb on midleg-like 4 (Drosophila)

(continuação)

Símbolos	Nomes
SCN9A	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
SDK2	sidekick homolog 2 (chicken)
SEC14L3	SEC14-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)
SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A
SENP6	SUMO1/sentrin specific peptidase 6
SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
SETD3	SET domain containing 3
SGOL2	shugoshin-like 2 (<i>S. pombe</i>)
SGPP2	sphingosine-1-phosphate phosphatase 2
SHPRH	SNF2 histone linker PHD RING helicase
SIRT5	sirtuin 5
SLC10A4	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4
SLC12A7	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 7
SLC24A2	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2
SLC35F1	solute carrier family 35, member F1
SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14
SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
SLC4A1	solute carrier family 4, anion exchanger, member 1 (erythrocyte membrane protein band 3, Diego blood group)
SLC4A8	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 8
SLITRK2	SLIT and NTRK-like family, member 2
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2
SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
SNAPC3	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3, 50kDa
SNORA58	small nucleolar RNA, H/ACA box 58
SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1
SOX13	SRY (sex determining region Y)-box 13
SOX21	SRY (sex determining region Y)-box 21
SPATA21	spermatogenesis associated 21
SPATA8	spermatogenesis associated 8
SPDYE3	speedy homolog E3 (<i>Xenopus laevis</i>)
SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5
SPOCK2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2
SPRR1A	small proline-rich protein 1A
SSX2	synovial sarcoma, X breakpoint 2
STOX1	storkhead box 1
STXBP6	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
SYN2	synapsin II
SYT2	synaptotagmin II
SYTL1	synaptotagmin-like 1
TACR2	tachykinin receptor 2
TAS2R19	taste receptor, type 2, member 19

(continuação)

Símbolos	Nomes
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCEANC	transcription elongation factor A (SII) N-terminal and central domain containing
TEAD2	TEA domain family member 2
TEKT5	tektin 5
TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3
THAP5	THAP domain containing 5
THAP5	THAP domain containing 5
THEM4	thioesterase superfamily member 4
THRB	thyroid hormone receptor, beta
THSD1	thrombospondin, type I, domain containing 1
TIFAB	TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain, family member B
TINAG	tubulointerstitial nephritis antigen
TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)
TM4SF18	transmembrane 4 L six family member 18
TMED8	transmembrane emp24 protein transport domain containing 8
TMEM106A	transmembrane protein 106A
TMEM56	transmembrane protein 56
TMEM8C	transmembrane protein 8C
TMOD3	tropomodulin 3 (ubiquitous)
TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase
TRIM71	tripartite motif containing 71
TTC30A	tetratricopeptide repeat domain 30A
TTC35	tetratricopeptide repeat domain 35
TTC7A	tetratricopeptide repeat domain 7A
TTY20	testis-specific transcript, Y-linked 20 (non-protein coding)
TTY3	testis-specific transcript, Y-linked 3 (non-protein coding)
UBQLNL	ubiquilin-like
UBXN10	UBX domain protein 10
UCKL1-AS1	UCKL1 antisense RNA 1 (non-protein coding)
UCP1	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
UCP2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)
UNC119B	unc-119 homolog B (C. elegans)
UNC13A	unc-13 homolog A (C. elegans)
UNQ6975	putative uncharacterized protein UNQ6975/PRO21958
USH2A	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
USP16	ubiquitin specific peptidase 16
USP2	ubiquitin specific peptidase 2
USP27X	ubiquitin specific peptidase 27, X-linked
UTRN	utrophin
VAT1L	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)-like

(continuação)

Símbolos	Nomes
VN1R1	vomeronasal 1 receptor 1
VPS13B	vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)
VPS54	vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae)
VSTM4	V-set and transmembrane domain containing 4
WDR67	WD repeat domain 67
WHAMMP3	WAS protein homolog associated with actin, golgi membranes and microtubules pseudogene 3
WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3
WSCD1	WSC domain containing 1
WWC2	WW and C2 domain containing 2
ZDHHC17	zinc finger, DHHC-type containing 17
ZFAND4	zinc finger, AN1-type domain 4
ZFAT	zinc finger and AT hook domain containing
ZFP36L1	zinc finger protein 36, C3H type-like 1
ZFP37	zinc finger protein 37 homolog (mouse)
ZKSCAN4	zinc finger with KRAB and SCAN domains 4
ZMAT4	zinc finger, matrin-type 4
ZMYM6	zinc finger, MYM-type 6
ZNF121	zinc finger protein 121
ZNF134	zinc finger protein 134
ZNF138	zinc finger protein 138
ZNF204P	zinc finger protein 204, pseudogene
ZNF248	zinc finger protein 248
ZNF253	zinc finger protein 253
ZNF280D	zinc finger protein 280D
ZNF30	zinc finger protein 30
ZNF300	zinc finger protein 300
ZNF300P1	zinc finger protein 300 pseudogene 1
ZNF383	zinc finger protein 383
ZNF432	zinc finger protein 432
ZNF485	zinc finger protein 485
ZNF498	zinc finger protein 498
ZNF540	zinc finger protein 540
ZNF556	zinc finger protein 556
ZNF569	zinc finger protein 569
ZNF596	zinc finger protein 596
ZNF638	zinc finger protein 638
ZNF684	zinc finger protein 684
ZNF695	zinc finger protein 695
ZNF700	zinc finger protein 700
ZNF701	zinc finger protein 701
ZNF705A	zinc finger protein 705A

(conclusão)

Símbolos	Nomes
ZNF846	zinc finger protein 846
ZNF878	zinc finger protein 878
ZNRF3	zinc and ring finger 3
ZUFSP	zinc finger with UFM1-specific peptidase domain
ZZZ3	zinc finger, ZZ-type containing 3
ZZZ3	zinc finger, ZZ-type containing 3

ANEXO B - Lista dos microRNAs encontrados como diferencialmente expressos

(continua)

Nome	Número de acesso no mirbase
hsa-miR-101-3p	MIMAT0000099
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680
hsa-miR-1246	MIMAT0005898
hsa-miR-1290	MIMAT0005880
hsa-miR-134	MIMAT0000447
hsa-miR-136-3p	MIMAT0004606
hsa-miR-136-5p	MIMAT0000448
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068
hsa-miR-1826_v15.0	MIMAT0006766
hsa-miR-1914-3p	MIMAT0007890
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084
hsa-miR-29b-3p	MIMAT0000100
hsa-miR-301a-3p	MIMAT0000688
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504
hsa-miR-374a-5p	MIMAT0000727
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729
hsa-miR-376b-3p	MIMAT0002172
hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720
hsa-miR-377-3p	MIMAT0000730
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341
hsa-miR-450a-5p	MIMAT0001545
hsa-miR-494	MIMAT0002816
hur_5	
miRNABrightCorner30	

Nome	Número de acesso no mirbase	(conclusão)
mr_1		

ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa

Of.ATAc.CEP/41711/FORP-USP/26.10.2011

Ref. processo n.º **2011.1.1015.58.6**

CAAE n.º 0051.0.138.000-11

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 124.^a Sessão, realizada em 20 de outubro de 2011, **aprovou** o desenvolvimento do projeto de pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado "*Identificação de genes diferencialmente expressos em células humanas de osso alveolar cultivadas sobre diferentes superfícies de titânio*".

Na oportunidade, lembramos da necessidade de serem entregues, na secretaria do CEP, os **Relatórios Parciais em 20 de outubro de 2012 e 20 de outubro de 2013** e o **Relatório Final em 20 de outubro de 2014**, com os respectivos formulários preenchidos pelo pesquisador responsável.

Lembramos ainda que, quando da submissão do relatório a este Comitê, quaisquer inclusões ou modificações no projeto original deverão ser comunicadas e justificadas ao CEP, através do formulário supracitado.

GISELE ELLENE DE ANDRADE DA DALTI

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilmo(a). Sr(a).

Prof(a). Dr(a). KARINA FITTIPALDI BOMBONATO PRADO

Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia

desta Faculdade