



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ROGÉRIO BENTES KATO

**PARTICIPAÇÃO DE INTEGRINAS E MICRORNAS NO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA**

Ribeirão Preto

2014

ROGÉRIO BENTES KATO

**PARTICIPAÇÃO DE INTEGRINAS E MICRORNAS NO POTENCIAL
OSTEOGÊNICO DE SUPERFÍCIE DE TITÂNIO COM NANOTOPOGRAFIA**

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

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

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto

2014

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Kato, Rogério Bentes

Participação de Integrinas e MicroRNAs no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia. Ribeirão Preto, 2014.

69 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

1. Nanotopografia. 2. Titânio. 3. MicroRNA. 4. Integrina.
5. Célula-tronco mesenquimal. 6. Osteoblasto.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rogério Bentes Kato

Participação de Integrinas e MicroRNAs no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto – USP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP)**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Otávio e Marly Kato, por todo amor e sacrifício que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos Ricardo, Rodrigo e Rayla Kato pela amizade, conselhos e tudo que representam na nossa família.

À minha esposa, Fabíola Kato por fazer parte de todos os momentos da minha vida, sempre compreensiva e maravilhosa, tornando esta caminhada mais fácil e prazerosa. Amo você!

À minha filha, Ana Karina que nasceu junto com esse doutorado e transformou para sempre minha vida. Amor incondicional!

AGRADECIMENTOS

À DEUS e à NOSSA SENHORA DE NAZARÉ, por me dar uma esposa, filha e família maravilhosas, pela saúde, pela proteção, pelo conforto nos momentos difíceis e por sempre colocar pessoas iluminadas na minha vida.

Aos grandes amigos MARCELO E RENAN pelo convívio, companheirismo e momentos vividos durante o mestrado e doutorado. Que nossa amizade não se apague com a distância.

Aos grandes amigos JULIANO, ROBERTA, PEPATO, LÚCIA, JACI E LUIZ CLÁUDIO, pela amizade e companheirismo nos momentos de lazer.

Ao meu orientador, Prof. Dr. MÁRCIO MATEUS BELOTI, a quem aprendi a admirar e respeitar. Pela orientação, pela confiança, pela paciência, pela amizade e pela grande oportunidade de aprendizado que me proporcionou. O senhor é um exemplo de inteligência, responsabilidade e honestidade.

Aos docentes ADALBERTO LUIZ ROSA, ALEXANDRE ELIAS TRIVELLATO, CÁSSIO EDVARD SVERZUT, LUIZ ANTÔNIO SALATA, SAMUEL PORFÍRIO XAVIER, PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA E VALDEMAR MALLET DA ROCHA BARROS, pelos conselhos e pela transmissão de seus conhecimentos de inestimável valor.

Aos amigos de laboratório, em especial THIAGO DOS SANTOS, RODRIGO ABUNA, LARISSA SVERZUT, LARISSA SPÍNOLA, LUCAS NOVAES, HELENA E GILLIADE, pela amizade, excelente convivência, experiências trocadas e ajuda durante a realização desse trabalho.

Aos técnicos de laboratório FABÍOLA SINGARETI, ROGER FERNANDES, GUSTAVO, PAULINHO E MILA SPRONE pela grande ajuda e transmissão de conhecimentos, além da amizade e dos agradáveis momentos de descontração.

Ao professor MOHAMMAD QUAMARUL HASSAN e seu orientado ROY, pela inestimável ajuda profissional para realização desse trabalho.

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP-USP, APARECIDA DULCE NEGRETTI e TATIANA FERNANDES, meus sinceros agradecimentos, pela disposição, atenção e amizade.

Ao meu amigo ALADIM GOMES LAMEIRA, pelo incentivo durante todos os anos da minha formação profissional e pela amizade incondicional. Seu caráter e personalidade na vida profissional e na pessoal são qualidades que sempre procuro espelhar. Você foi e sempre será o meu grande mestre!

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO, pelo auxílio financeiro à minha pesquisa (#2010/18395-3), e pela bolsa de doutorado concedida (#2010/19280-5).

EPÍGRAFE

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar nos sonhos que se tem, ou que os seus planos nunca vão dar certo, ou que nunca vais ser alguém...”

Renato Russo

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Kato R B. Participação de Integrinas e MicroRNAs no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2014. 69p.

O objetivo desse estudo foi investigar a participação de integrina $\alpha 1\beta 1$ e microRNAs (miRs) no potencial osteogênico de superfícies de titânio (Ti) com nanotopografia. Discos de Ti previamente polidos foram tratados quimicamente com H_2SO_4/H_2O_2 para obtenção de nanotopografia, que foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Para o estudo da participação da integrina $\alpha 1\beta 1$, células-tronco mesenquimais (CTMs) de ratos foram cultivadas em condições osteogênicas e não osteogênicas sobre superfícies de Ti com nanotopografia e sem tratamento químico (controle). O resultados mostraram que a nanotopografia de Ti aumentou a proliferação celular, a atividade de fosfatase alcalina (Alp) e regulou positivamente a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica em CTMs cultivadas tanto em condições osteogênicas quanto em condições não osteogênicas. Além disso, uma maior expressão gênica para as integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ foi observada em culturas crescidas sobre nanotopografia em condições não osteogênicas em relação ao Ti controle. O uso de obtustatina, um inibidor de integrina $\alpha 1\beta 1$, reduziu os efeitos da nanotopografia sobre os marcadores osteoblásticos, indicando a participação da via de sinalização dessa integrina nos efeitos da nanotopografia sobre CTMs. Para investigar a participação de miRs no efeito osseindutor da nanotopografia de Ti, foram utilizadas CTMs humanas e células pré-osteoblásticas de camundongos da linhagem MC3T3-E1. A análise em larga escala da expressão de miRs revelou que 60 miRs foram regulados positivamente (no mínimo, 2x maior), enquanto 58 miRs foram regulados negativamente (no mínimo, 2x menor) em CTMs crescidas sobre a nanotopografia. Três desses miRs, miR-4448, -4708 e -4773, cuja expressão foi significativamente reduzida pela nanotopografia de Ti (no mínimo, 5x menor), afetaram a diferenciação osteoblástica de CTMs. Esses miRs atuam diretamente sobre SMAD1 e SMAD4, proteínas transdutoras da sinalização da proteína óssea morfogenética 2 (Bmp-2), conhecida por sua capacidade osseindutora. Além disso, verificou-se que a sobreexpressão de miR-4448, -4708 e -4773 em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD1 e SMAD4 e, conseqüentemente, a expressão gênica de marcadores ósseos. Esses dados sugerem a influência do circuito miR-SMAD-Bmp-2 sobre o efeito osseindutor da nanotopografia. Conjuntamente, os achados do presente estudo mostraram que o efeito da nanotopografia de Ti sobre a diferenciação osteoblástica resulta de um mecanismo regulatório complexo, do qual fazem parte as vias de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da Bmp-2, com a participação de miRs. Esses resultados podem representar um avanço para o desenvolvimento de novas modificações de superfície, com o objetivo de acelerar e/ou melhorar o processo de osseointegração.

Palavras-chave: Nanotopografia; Titânio; MicroRNA; Integrina; Célula-tronco mesenquimal; Osteoblasto.

ABSTRACT

Kato R B. Participation of Integrins and MicroRNAs on the Osteogenic Potential of Titanium with Nanotopography [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2014. 69p.

The aim of this study was to investigate the role of the $\alpha 1\beta 1$ integrin and microRNAs (miRs) on the osteogenic potential of titanium (Ti) with nanotopography. Polished Ti discs were chemically treated with H_2SO_4/H_2O_2 to generate nanotopography, which was observed under scanning electron microscopy. For the study related to the $\alpha 1\beta 1$ integrin, rat mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured under osteogenic and non-osteogenic conditions on Ti with nanotopography and non-treated Ti discs (control). Nanotopography increased cell proliferation and alkaline phosphatase (Alp) activity and upregulated the gene expression of bone markers in cells cultured under osteogenic and non-osteogenic conditions. Furthermore, the gene expression of $\alpha 1$ and $\beta 1$ integrins was higher in cells cultured on nanotopography under non-osteogenic conditions compared with control. Obtustatin, an inhibitor of $\alpha 1\beta 1$ integrin, reduced the higher gene expression of the bone markers induced by nanotopography. These results indicate that $\alpha 1\beta 1$ integrin signaling pathway determines the osteoinductive effect of nanotopography on MSCs. The role of miRs in the osteogenic potential of Ti with nanotopography was evaluated using human MSCs and MC3T3-E1 mouse pre-osteoblastic cells. The miR sequencing analysis revealed that 60 miRs were upregulated (> 2 fold), while 58 miRs were downregulated (< 2 fold) in MSCs grown on nanotopography. Three miRs, miR-4448, -4708 and -4773, which were significantly downregulated (< 5 fold) by nanotopography, affected the osteoblast differentiation of MSCs. These miRs directly target SMAD1 and SMAD4, both key transducers of the bone morphogenetic protein 2 (Bmp-2) osteogenic signal, which were upregulated by nanotopography. Overexpression of miR-4448 - 4708 and 4773 in MC3T3-E1 cells noticeably inhibited gene and protein expression of SMAD1 and SMAD4 and by targeting them, these miRs repressed gene expression of key bone markers. These results suggest that a miR-SMAD-Bmp-2 circuit acts in the Ti nanotopography-mediated osteoblast differentiation. Taken together, our data showed that the osteoblast differentiation induced by Ti with nanotopography is governed by a complex regulatory network involving a crosstalk between $\alpha 1\beta 1$ integrin and Bmp-2 signaling pathways with participation of miRs.

Keywords: Nanotopography; Titanium; MicroRNA; Integrin; Mesenchymal stem cell; Osteoblast.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia	21
3.1.1 Obtenção de nanotopografia em amostras de Ti	21
3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs derivadas de medula óssea de ratos	21
3.1.3 Proliferação e viabilidade celulares	22
3.1.4 Atividade de fosfatase alcalina (Alp)	23
3.1.5 Formação de matriz mineralizada	24
3.1.6 Expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica (PCR em tempo real)	24
3.1.7 Efeito da superfície de Ti com nanotopografia sobre a diferenciação osteoblástica de CTMs	25
3.1.8 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito osseoadutor da superfície de Ti com nanotopografia	26
3.1.9 Epifluorescência	26
3.1.10 Análise estatística	27
3.2 Participação de miRs no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia	28
3.2.1 Obtenção e cultura de CTMs humanas	28
3.2.2 Proliferação e viabilidade celulares	28
3.2.3 Formação de matriz mineralizada	28
3.2.4 Expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteoblástica (PCR em tempo real)	28
3.2.5 Western blot para detecção da proteína Alp	29
3.2.6 Sequenciamento de miRs na plataforma Illumina	31
3.2.7 Transfecção de miRs	32
3.2.7 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Tratamento da superfície de Ti	34
4.2 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia	35
4.3 Participação de miRs no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia	40

5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	57
7 REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE	68
ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

A realização de procedimentos utilizando implantes dentários aumentou exponencialmente nos últimos anos e, na área da implantodontia, o titânio (Ti) é o biomaterial mais frequentemente usado para a fabricação de implantes, por apresentar excelentes propriedades mecânicas e biológicas (Puleo & Nanci, 1999). Sabe-se que a proporção de contato direto entre osso e Ti é influenciada tanto por parâmetros clínicos, como condições do leito hospedeiro, técnica cirúrgica e utilização de carga, quanto por características do implante, como a topografia e a química de superfície (Schwarz et al., 2009; Mendonça et al., 2008; Shalabi et al., 2006; Sykaras et al., 2000; Masuda et al., 1998; Albrektsson & Johansson, 1991).

Nesse cenário, a nanotecnologia surge como uma importante ferramenta, capaz de regular o fenômeno da osseointegração por meio da modulação da atividade osteoblástica sobre superfícies de implantes de Ti (Zuo et al., 2013; Waze et al., 2013; Ballo et al., 2011; Bueno et al., 2011). Muitos estudos têm mostrado que nanotopografias produzidas por diferentes tipos de tratamento e com padrões topográficos diversos podem modular a resposta osteoblástica desde a adesão celular até a mineralização da matriz extracelular (Hori et al., 2011; Oh et al., 2009; Vetrone et al., 2009; de Oliveira et al., 2007).

O tratamento químico por oxidação/desoxidação, utilizando uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, cria uma nanotopografia bem caracterizada em termos de estrutura física e química sobre a superfície de Ti (Variola et al., 2008; Yi et al., 2006). Comparada com a superfície de Ti não tratada, essa nanotopografia exibe uma rugosidade de superfície três vezes maior, nanopicos de 22 nm, um aumento na espessura da camada de óxido de Ti (TiO_2) de 5 nm para 40 nm e baixos índices de contaminação com nitrogênio (N) e silício (Si) (Yi et al., 2006). Essas características físico-químicas da nanotopografia têm por objetivo instituir

uma relação biomimética entre a superfície do implante e o tecido ósseo e assim mimetizar o microambiente celular (Annunziata et al., 2012; Ramis et al., 2012).

Nosso grupo tem pesquisado os vários aspectos da interação entre células osteogênicas primárias de calvária de ratos recém-nascidos e superfície de Ti com nanotopografia (Bueno et al., 2011; de Oliveira et al., 2007; de Oliveira & Nanci, 2004). Foi demonstrado que a expressão das proteínas matricelulares sialoproteína óssea (Bsp) e osteopontina (Opn) é regulada positivamente pela nanotopografia nos estágios precoces da cultura celular (de Oliveira & Nanci, 2004). Corroborando o estudo acima, foi observado um aumento significativo de nódulos mineralizados na superfície tratada em relação ao Ti controle nos períodos de 10 e 14 dias (de Oliveira et al., 2007). Além disso, notou-se que o desenho da nanotopografia varia em função do tempo de tratamento químico e que a deposição de Opn na matriz extracelular é maior em superfícies de Ti tratadas por 4 horas comparadas às tratadas por 30 minutos (Bueno et al., 2011). Em mandíbulas de cães, foi demonstrado que esse tipo de tratamento de superfície aumenta a osteogênese de contato com implantes de Ti (Tavares et al., 2007). Os resultados promissores obtidos com a nanotopografia quanto ao potencial osteogênico justificam a investigação dos mecanismos celulares envolvidos nesse fenômeno, os quais ainda não foram completamente explorados e esclarecidos.

Nos últimos anos, várias vias regulatórias envolvidas na diferenciação osteoblástica foram descobertas por estudos moleculares e genéticos (Chen et al., 2013; He et al., 2013; Komori, 2010; Rosen, 2009; Canalis, 2009). Fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras e modificadores de estrutura de cromatina exercem papel fundamental nos mecanismos regulatórios da osteogênese (Stein et al., 2009; Jensen et al., 2007; Lian et al., 2006). As integrinas e os microRNAs (miRs) fazem parte dessas moléculas capazes de modular a diferenciação osteoblástica (Eguchi et al., 2013; Wei et al., 2012; Schneider et al., 2011; Itoh

et al., 2009; Li et al., 2008; Ekholm et al., 2002; Gronthos et al., 2001; Zimmerman et al., 2000; Xiao et al., 1998).

As integrinas constituem uma família de receptores de membrana que tem como função primária a adesão de células às proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina, e alguns de seus membros estão envolvidos no processo de diferenciação osteoblástica (Schneider et al., 2011; Mizuno et al., 2000; Jikko et al., 1999; Hynes, 1987). As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas constituídas por duas subunidades, α e β , identificadas e descritas primeiramente por Hynes (1987). Atualmente, são conhecidas dezoito subunidades α e oito subunidades β , as quais se associam por ligação não-covalente para formar vinte e quatro combinações distintas entre as subunidades α e β , cada uma com características específicas em relação aos ligantes aos quais se associam (Shekaran & García, 2011). O comprimento da subunidade α é de 1008-1152 aminoácidos, com uma região citoplasmática de 22-32 aminoácidos e uma porção transmembrana de 20-29 aminoácidos (Siebers et al., 2005). A subunidade β possui aproximadamente 700 aminoácidos, com uma região citoplasmática de 20-50 aminoácidos e uma porção transmembrana de 26-29 aminoácidos (Siebers et al., 2005). A sinalização por integrinas ocorre em ambas as direções da membrana celular, sendo que a ligação de integrinas a componentes da matriz extracelular pode desencadear uma cascata de sinalização intracelular, enquanto que sinais intracelulares podem modular a ativação de integrinas e conseqüentemente sua afinidade pelo ligante, presente na matriz extracelular (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

As integrinas ativam várias proteínas tirosina quinases e duas vias de sinalização que envolvem as FAK (focal adhesion kinases) ou as quinases da família Src (Yan et al., 2012; Schneider et al., 2011; Shekaran & García, 2011; Giancotti & Ruoslahti, 1999). A associação coordenada entre ligantes da matriz extracelular, integrinas e componentes do citoesqueleto forma agregados macromoleculares conhecidos como adesões focais. As FAK são recrutadas

para sítios de adesão focal e interagem diretamente, ou por meio das proteínas do citoesqueleto talina e paxilina, com a porção intracelular da subunidade β da integrina. Após a ativação, as FAK sofrem autofosforilação, criando um sítio de ligação para o domínio SH2 presente na quinase Src. A quinase Src fosforila então diversos componentes do sítio de adesão focal que participam da sinalização via FAK. Além de ativar as FAK, algumas integrinas ativam a tirosina quinase Fyn e por meio dela, a proteína adaptadora Shc, com a participação da proteína caveolina-1, acoplando a subunidade α da integrina à Fyn. É possível que ambas as quinases, FAK e Shc, ativem a cascata Ras-ERK (extracellular regulated kinase), responsável pelos efeitos intracelulares mediados pelas integrinas, e que a contribuição de cada uma dependa do tipo celular avaliado (Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Os efeitos das integrinas nas células osteoblásticas são amplamente abordados na literatura. Foi mostrado que o bloqueio da subunidade $\beta 1$ da integrina, inibe a mineralização da matriz extracelular em culturas de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de medula óssea humana (Gronthos et al., 2001). Camundongos transgênicos que exibem uma forma truncada da subunidade $\beta 1$ da integrina em osteoblastos e osteócitos apresentam massa óssea reduzida e aumento da porosidade óssea (Zimmerman et al., 2000). A adesão de células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 ao colágeno do tipo I, mediada pela integrina $\alpha 2\beta 1$, ativa o fator de transcrição Runx2 (runt-related transcription fator 2), essencial para a diferenciação osteoblástica (Xiao et al., 1998). A expressão de Runx2 é também modulada pelas FAK em osteoblastos da linhagem UMR-106, derivada de ratos (Schneider et al., 2011). Em camundongos, demonstrou-se que a deficiência da integrina $\alpha 1\beta 1$ resulta na redução do calo ósseo durante o processo de reparo de fraturas (Ekholm et al., 2002).

Diversos estudos têm mostrado a participação de integrinas na resposta de células osteoblásticas a biomateriais com diferentes topografias de superfície (Chiu et al., 2014; Wang et al., 2013; Lu et al., 2010; Olivares-Navarrete et al., 2008). Foi demonstrado que a

associação de micro e nanotopografia em superfícies de Ti favorece a diferenciação de osteoblastos humanos da linhagem MG63, por aumentar a expressão de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ (Wang et al., 2013). Arcabouços de fosfato de cálcio e superfícies de Ti com microtopografia promovem a diferenciação de osteoblastos primários e da linhagem MG63 de humanos por um processo envolvendo a integrina $\alpha 2\beta 1$ (Lu et al., 2010 Olivares-Navarrete et al., 2008). Com base nesses resultados, o desenvolvimento de biomateriais que possam modular a interação entre integrinas e matriz extracelular representa uma importante estratégia para terapias relacionadas ao tecido ósseo nas áreas odontológica e médica.

Os miRs têm sido considerados com um dos mais importantes mecanismos pós-transcricionais envolvido na modulação da osteogênese (Eguchi et al., 2013; Lian et al., 2012; Hassan et al., 2010). Eles constituem uma classe de pequenos RNAs não codificadores que regulam o processo de tradução proteica em organismos superiores, silenciando ou degradando moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm) após sua transcrição (Vimalraj & Selvamurugan, 2013; Bakhshandeh et al., 2012; Dong et al., 2012; Hassan et al., 2012; Hassan et al., 2010; Liston et al., 2010; Itoh et al., 2009; Goff et al., 2008; Duchaine et al., 2006; Bartel, 2004). Os miRs foram descobertos no início da década de 90 durante um estudo sobre o gene *lin-14*, de desenvolvimento de nematodos. Os autores observaram que a expressão deste gene podia ser modulada por um curto produto de RNA, denominado *lin-4*, que continha sequências parcialmente complementares a várias sequências do RNAm do gene *lin-14* e com complementaridade suficiente para inibir sua tradução (Lee et al., 1993). Até o presente momento, 1424 miRs foram identificados em humanos, sendo estes, responsáveis por mais de 50% da regulação da codificação proteica (Bakhshandeh et al., 2012; Dong et al., 2012; Laine et al., 2012; Taipaleenmaki et al., 2012; Tome et al., 2011; Hu et al., 2010; Liston et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009; Itoh et al., 2009; Schoolmeesters et al., 2009; Goff et al., 2008; Li et al., 2008).

Os miRs são transcritos como parte de longos precursores (transcrito primário; pri-miR) e processados no núcleo por uma RNase III (Drosha) em produtos intermediários menores (pré-miRs). Os pré-miRs são transportados para o citoplasma pela exportina 5, onde são processados por uma segunda enzima da família RNase III (Dicer), gerando miRs com 20-25 nucleotídeos. Depois de completamente processados, os miRs são incorporados ao complexo silenciador induzido por RNA (RISC) por se ligarem a proteínas argonautas. Esse complexo é capaz de mediar a interação do miR com seu RNAm alvo, a qual normalmente se dá entre os nucleotídeos 2-8 da porção terminal 5' do miR e a região 3' não-traduzida (3' UTR) do RNAm, alterando a estabilidade do RNAm, inibindo o processo de tradução e, conseqüentemente, a expressão proteica (Liston et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009).

A descoberta de miRs que regulam a diferenciação osteoblástica *in vitro* e a formação óssea *in vivo* indica o papel relevante de miRs neste tecido (Gaur et al., 2010; Huang et al., 2010; Itoh et al., 2009; Li et al., 2009; 2008; Luzi et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado que miRs medeiam mecanismos de modulação tanto da expressão gênica em osteoblastos, quanto da esqueletogênese (Eguchi et al., 2013; Wei et al., 2012; Itoh et al., 2009; Li et al., 2008; Deng et al., 2014; Kureel et al., 2014). Foi observado que o cluster de miRs 23~27~24-2 inibe a diferenciação osteoblástica, enquanto miR-30d e -218 a estimulam (Egushi et al., 2013; Hassan et al., 2010). Além disso, foram identificados diversos miRs que modulam a formação óssea, como miR-140, que contribui para a ossificação endocondral, miR-206, cuja expressão em osteoblastos de camundongos transgênicos promove perda de massa óssea (Nakamura et al., 2011; Inose et al., 2009), miR-27, que favorece a diferenciação da linhagem hFOB1.19 de células osteoblásticas derivadas de fetos humanos pela modulação da via de sinalização Wnt (Wang & Xu, 2010), miR-29b, que promove osteogênese em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 por reduzir a expressão de proteínas inibidoras da diferenciação osteoblástica, HDAC4, TGF β 3, ACVR2A, CTNBP1

e DUSP2 (Li et al., 2009) e miR-196a, cuja sobreexpressão em CTMs derivadas de tecido adiposo humano reduz a proliferação celular e aumenta a diferenciação osteoblástica (Kim et al., 2009). Além disso, pesquisas apontam que a proteína óssea morfogenética 2 (Bmp-2), sabidamente osseointutora, reduz a expressão de um grupo de miRs que inibe a formação óssea (Li et al., 2008; Oskowitz et al., 2008). Uma análise inicial mostrou a sobreexpressão de aproximadamente 60 miRs durante o processo de diferenciação de células osteoprogenitoras até o estágio final de mineralização da matriz extracelular em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 (Li et al., 2009).

Na literatura, são escassos os estudos que de fato avaliaram a expressão de miRs em osteoblastos crescidos sobre superfícies modificadas de Ti (Chakravorty et al., 2012; Palmieri et al., 2008a; Palmieri et al., 2008b; Palmieri et al., 2007). Além disso, ainda não foram completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais a nanotopografia de Ti favorece a diferenciação osteoblástica e a mineralização da matriz extracelular de CTMs. Assim, considerando o papel de integrinas e de miRs na modulação da diferenciação osteoblástica e da formação óssea, é plausível a elaboração da hipótese de que integrinas e miRs estão envolvidos no potencial osteogênico de superfícies de Ti com nanotopografia.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar a participação da integrina $\alpha1\beta1$ e dos miRs no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia

3.1.1 Obtenção de nanotopografia em amostras de Ti

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil), usinados, foram polidos com lixas de carbetto de silício de grana 320 e 600, lavados em ultrassom, tolueno e submetidos à condicionamento em solução de H_2SO_4 10 N e H_2O_2 30% por 4 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante (Variola et al., 2008; de Oliveira et al., 2007). Os discos foram, em seguida, lavados em água destilada, autoclavados e secos ao ar. Discos controle foram preparados de forma semelhante, à exceção da etapa do condicionamento com solução de H_2SO_4 10 N e H_2O_2 30%, não realizada. Foram preparados 110 discos com nanotopografia e 110 discos controle. Previamente à utilização nos experimentos com culturas de células, superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Inspect S50, FEI, Hillsboro, OR, EUA) operando em 5 kV.

3.1.2 Obtenção e cultura de CTMs derivadas de medula óssea de ratos

CTMs foram obtidas de medula óssea de fêmures de ratos Wistar com 4 semanas de vida e massa corporal variando entre 100 e 150 g, seguindo os protocolos aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (Processo nº 11.1.890.53.0). Os ratos foram eutanasiados por sobredose dos anestésicos Ketamina (Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina (Dopaser Calier, Juatuba, MG, Brasil). Os fêmures foram isolados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM, Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 50

$\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e $3 \mu\text{g/mL}$ de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea, extraída por meio de irrigação com meio de cultura não osteogênico, contendo α -MEM (Gibco-Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), $50 \mu\text{g/mL}$ de vancomicina (Acros Organics, Geel, Bélgica), $50 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e $0,3 \mu\text{g/mL}$ de fungisona (Gibco-Life Technologies).

As células em cultura primária foram mantidas em frascos de 75 cm^2 (Corning, Incorporated, Costar, Tewksbury, MA, EUA), selecionadas por aderência ao poliestireno e expandidas em meio de cultura não osteogênico. Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e foi adicionada solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), $1,3 \text{ mg/mL}$ de colagenase do tipo II (Gibco-Life Technologies) e EDTA 1 mM (Gibco-Life Technologies) para obtenção de suspensão de células. As células da primeira passagem foram cultivadas em placas de 24 poços, sobre as diferentes superfícies de Ti, na densidade de 2×10^4 células/poço em meio de cultura osteogênico, composto por meio não osteogênico suplementado com $5 \mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), β -glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

3.1.3 Proliferação e viabilidade celulares

A proliferação e a viabilidade celulares foram avaliadas pela contagem do número de células viáveis e não viáveis. Aos 4, 10 e 17 dias, células crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti foram isoladas por tratamento com solução contendo EDTA 1 mM , $1,3 \text{ mg/mL}$ de colagenase e tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies). Uma alíquota de $10 \mu\text{L}$ da

suspensão de células foi misturada à igual volume de azul de Trypan 0,4% (Invitrogen-Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) para determinação do número de células viáveis (não marcadas pelo azul de Trypan) e células não viáveis (marcadas pelo azul de Trypan), com o auxílio de um contador de células (Countness cell counter, Invitrogen-Life Technologies).

3.1.4 Atividade de fosfatase alcalina (Alp)

Aos 4, 10 e 17 dias, a atividade de Alp de culturas crescidas sobre diferentes superfícies de Ti foi determinada por meio da liberação de timolftaleína a partir da hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, usando um kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi removido e os poços, lavados três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) aquecido a 37°C. Em seguida, os poços foram preenchidos com 2 mL de água deionizada e as placas, submetidas à 5 ciclos de choque térmico, que consistiram na exposição da placa a ambiente a -20°C por 20 minutos, seguidos de 15 minutos a 37°C. Isso resultou na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água deionizada. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes, sendo um tubo teste por poço. Em todos os tubos, foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão dietanolamina 0,3 mmol/mL, pH 10,1. Apenas no tubo padrão, foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 50 µL dos lisados celulares a cada tubo teste e estes foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 2 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 µmol/mL e NaOH 0,25 µmol/mL) em todos os tubos. Em seguida, a absorbância foi avaliada em espectrofotômetro (CE 3021, Cecil, Cambridge, Inglaterra) utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de Alp foi expressa como µmol de timolftaleína normalizada por hora e pelo número total de células presentes no respectivo período experimental.

3.1.5 Formação de matriz mineralizada

Aos 21 dias, as culturas crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti foram fixadas com 2 mL de formalina 10% por 2 dias, desidratadas em álcool etílico na sequência de 30%, 50%, 70% e 100%, sendo 1 hora para cada concentração. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4,2, por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas com PBS e água bidestilada. As amostras foram observadas por epifluorescência (Axio Imager M2, Carl Zeiss, Berlin, Alemanha) em microscópio equipado com uma câmera digital AxioCam MRm (Carl Zeiss). As imagens adquiridas foram processadas pelo sistema de análise e processamento de imagens Axiovision 4.8.2. A quantificação da formação de matriz mineralizada foi determinada a partir da extração do vermelho de Alizarina (Gregory et al., 2004). Para isso, foram acrescentados 280 µL de ácido acético 10% em cada poço, e as placas, deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi raspada, e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL e mantida sob agitação em vortex por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 minutos e transferidos para o gelo por 5 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 13000 r.p.m. por 20 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada tudo foram transferidos para uma placa de 96 poços (Corning) contendo 40 µL de hidróxido de amônia 10%. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA), utilizando comprimento de onda de 405 nm.

3.1.6 Expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica (PCR em tempo real)

Aos 10 dias, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen-Life Technologies) à temperatura ambiente e mantido por 5 minutos, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada com o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. O RNA total obtido foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e

320 nm) no aparelho NanoVue (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA). A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total, por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems (Invitrogen-Life Technologies) e o termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)

Para as reações de PCR em tempo real, foram utilizados o reagente SYBR Green (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA) e o aparelho CFX96 (Bio-Rad). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 13 µL por reação, contendo 12,5 ng de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cycle threshold), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atingiu um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permitiu a análise quantitativa da expressão dos genes Runx2, Colágeno tipo I Alfa 1 (ColIA1), Alp, Osteocalcina (Oc), Bsp e Bmp-4. Como controle endógeno foi avaliada a expressão gênica do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), usada para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. As sequências de primers são apresentadas na Tabela 1 do Apêndice. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados. O método comparativo de 2^{-ddCt} (Livak & Schmittgen, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das células crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti.

3.1.7 Efeito da superfície de Ti com nanotopografia sobre a diferenciação osteoblástica de CTMs

Com o objetivo de investigar o quanto a nanotopografia pode afetar a expressão gênica de marcadores ósseos, CTMs foram expandidas em meio não osteogênico até a

subconfluência, plaqueadas sobre superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle e cultivadas em meio não osteogênico, ou seja, na ausência de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) e dexametasona (Sigma-Aldrich), fatores que induzem a osteogênese. Ao final de 10 dias, a expressão dos genes Runx2, ColIA1, Alp, Oc, Bsp e Bmp-4 foi avaliada por PCR em tempo real, conforme descrito no subitem 3.1.6.

3.1.8 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito osseoindutor da superfície de Ti com nanotopografia

Para este experimento, CTMs foram expandidas em meio não osteogênico até a subconfluência, plaqueadas sobre superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle e cultivadas em meio não osteogênico. Aos 10 dias, a expressão gênica das integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ foi avaliada por PCR em tempo real, conforme descrito no subitem 3.1.6. Ainda, CTMs crescidas sobre superfícies de Ti com nanotopografia foram cultivadas em meio não osteogênico, por períodos de até 10 dias, na presença de obtustatina 10 nM, um potente inibidor seletivo da integrina $\alpha 1\beta 1$ (Marcinkiewicz et al., 2003), ou na presença de veículo (água destilada). Foram avaliadas, adesão e espraiamento celulares e a imunolocalização de Opn por epifluorescência em 24 horas, a atividade de Alp aos 10 dias (conforme descrito no subitem 3.1.4) e a expressão gênica dos mesmos marcadores ósseos mencionados no subitem 3.1.7, por PCR em tempo real (conforme subitem 3.1.6) aos 10 dias.

3.1.9 Epifluorescência

A adesão e espraiamento celulares e a presença de Opn em culturas crescidas sobre as superfícies de Ti com nanotopografia em meio não osteogênico, expostas ou não à obtustatina 10 nM por 24 horas, foi avaliada qualitativamente por epifluorescência. Para isso, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, durante 10

minutos à temperatura ambiente. A permeabilização celular foi realizada com 1 mL/poço de solução de Triton X-100 0,5% (Acros Organics) em PB, durante 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado 5% em PB, durante 30 minutos. Um anticorpo primário monoclonal anti- Opn (MPIIB10, 1:800; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, EUA) foi utilizado, seguido por incubação com anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), adicionado à mesma solução de faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para a detecção do citoesqueleto de actina (60 minutos cada anticorpo). Núcleos de células foram marcados com 4', 6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato (DAPI, Molecular Probes) 300 nM durante 5 minutos e uma lamínula de vidro foi montada com um kit antifade (Prolong, Molecular Probes) sobre a superfície de Ti contendo células. As amostras foram examinadas por epifluorescência, como descrito no subitem 3.1.5 e as imagens digitais adquiridas, processadas com o software Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

3.1.10 Análise estatística

Os dados apresentados nesse estudo são representativos de três experimentos independentes, com a utilização de CTMs provenientes de três diferentes pools de medula óssea de fêmures de ratos. Para cada um desses experimentos, os ensaios de proliferação, viabilidade celular, atividade de Alp e formação de matriz mineralizada foram realizados em quadruplicata (n=4) e a expressão gênica, em triplicata (n=3). As comparações entre superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle e entre obtustatina e veículo foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney, com nível de significância estabelecido em 5%.

3.2 Participação de miRs no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia

3.2.1 Obtenção e cultura de CTMs humanas

As CTMs humanas foram obtidas a partir da medula óssea localizada na crista do osso ilíaco de 4 doadores distintos (2 mulheres: 56 e 62 anos e 2 homens: 54 e 60 anos de idade), seguindo os protocolos aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de São Paulo (Processo nº 0095.0138.000-10). O tecido foi triturado com auxílio de tesoura e pinça e as células isoladas, cultivadas e plaqueadas conforme descrito no subitem 3.1.2. As culturas foram mantidas em meio osteogênico sobre as diferentes superfícies de Ti por períodos de até 21 dias.

3.2.2 Proliferação e viabilidade celulares

A proliferação e a viabilidade celulares foram avaliadas pela contagem do número de células viáveis e não viáveis aos 4, 10 e 17 dias, conforme descrito no subitem 3.1.3.

3.2.3 Formação de matriz mineralizada

O método empregado na quantificação de formação de matriz mineralizada, aos 21 dias, foi idêntico ao detalhado no subitem 3.1.5.

3.2.4 Expressão gênica dos marcadores da diferenciação osteoblástica (PCR em tempo real)

Ao final de 4, 10 e 17 dias, a análise da expressão gênica dos marcadores Runx2, ColIA1, Alp, Oc, Opn e Bmp-2, assim como sua normalização e comparação, foi realizada como descrito no subitem 3.1.6. As sequências de primers são apresentadas na Tabela 1 do Apêndice.

3.2.5 Western blot para detecção da proteína Alp

Aos 10 e 17 dias, células crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti foram destacadas por tratamento com solução de 1mM EDTA, 1,3 mg/mL de colagenase e tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies). As amostras foram homogeneizadas, transferidas para tubos falcon e centrifugadas por 5 minutos a 2000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado e as células, lavadas 3 vezes com 5-10 mL de PBS aquecido. Após a última centrifugação, todo o PBS foi removido, e foi adicionado o tampão RIPA (NaCl 150 mM, Sigma-Aldrich; NP40 10%, Sigma-Aldrich; C₂₄H₃₉O₄Na 0,5%, Sigma-Aldrich; SDS 0,1%, Sigma-Aldrich; e Tris base 50 mM, pH 8, Roche, Madison, WI, EUA). A extração da proteína total foi realizada por lise celular, utilizando-se aparelho de ultrassom (Misonix, Farmingdale, NY, EUA) com 5 pulsos de 10 segundos e intervalos de 10 segundos entre os pulsos. Primeiramente, determinou-se a concentração de proteínas das amostras, µg/mL, pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit comercial Protein Assay (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (CE 3021, Cecil), com comprimento de onda de 750 nm. Foram preparados géis de poliacrilamida 8,5% para separação das proteínas, contendo, para um volume final de 10 mL: 2,84 mL de acrilamida, 2,60 mL de tampão Tris 1,5%, pH 6,8 e SDS 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 µL de Temed e 75 µL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics, Charlotte, NC, EUA). Após a polimerização do gel de separação, foi confeccionado o gel de empilhamento 5%, contendo, para um volume final de 5 mL: 0,83 mL de acrilamida, 0,13 mL de tampão Tris HCl, pH 6,8 e SDS 10%, 3,44 mL de água destilada, 12 µL de Temed e 20 µL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics). Após sua polimerização, os géis foram montados em aparato próprio e foi adicionado o tampão de corrida, composto por 3,01 g de Tris base (Roche); 14,4 g de glicina (USB Corporation) e 1 g de SDS (Sigma-Aldrich), para um volume final de 1 L de água destilada. Para o ensaio, 50 µg de proteína de cada grupo, contidos em

um volume final de 20 μ L, foram misturadas com 5 μ L de tampão de amostra, contendo 7 mL de Tris base pH 6,8 (Roche), 3 mL de glicerol (Sigma-Aldrich), 1 g de SDS (Sigma-Aldrich), 0,93 g de DTT (Sigma-Aldrich), 1,2 mg de bromofenol (Sigma-Aldrich) e 10 mL de água destilada e β -mercaptoetanol. Após aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, as amostras foram aplicadas nos géis, e a separação das proteínas, realizada por eletroforese com aplicação de 100 V/hora. Como referência para identificação do peso molecular das proteínas separadas, foi utilizado um marcador que identifica bandas entre 10 e 250 kDa (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Hybond C-Extra, GE Healthcare) com o aparelho Trans-Blot[®] SD (Bio-Rad), operado com 12 V por 45 minutos. As membranas foram submetidas a três incubações à temperatura ambiente, sendo: 1) bloqueio dos sítios inespecíficos por 3 horas, com leite desnatado 5% diluído em Tampão Salino de Tris com Tween 20 (TBS-T), composto por 2.43 g de Tris, (Roche), 8 g de NaCl, (Sigma-Aldrich), 1 mL de Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 7,6, 2) incubação, por 3 horas, com o anticorpo primário anti- Alp (1:2000, policlonal de coelho; Santa Cruz Biotechnology, Princeton, NJ, EUA) diluído em solução de leite desnatado a 2,5% em TBS-T e 3) incubação, por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000, cabra anti-coelho IgG HRP; Santa Cruz Biotechnology) diluído em solução de leite desnatado a 2,5% em TBS-T. Ao final de cada incubação, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T. Por fim, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) por 1 minuto e transferidas para o aparelho G:BOX (SynGene, Los Altos, CA, EUA). Para a captação de imagens da banda relativa à proteína Alp (66 kDa) foi utilizado o programa GeneSnap (SynGene). Como proteína constitutiva, foi utilizada a α -tubulina. Para isso, as membranas foram submetidas a tratamento com solução Re-blot plus mild (Millipore, Billerica, MA, EUA) por 20 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção dos anticorpos, e então incubadas de acordo com os

procedimentos previamente descritos, utilizando-se anticorpo primário anti-tubulina (1:8000, monoclonal de camundongo IgG1, Sigma-Aldrich) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000, monoclonal de cabra anti-camundongo IgG1, Santa Cruz Biotechnology).

3.2.6 Sequenciamento de miRs na plataforma Illumina

Células crescidas sobre as diferentes superfícies de Ti por períodos de 4, 10 e 17 dias foram submetidas ao sequenciamento de miRs, realizado na Illumina HiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA), com as versões mais recentes dos reagentes de sequenciamento e superfícies de clonagem, fornecendo até 300 GB em informações de sequenciamento por superfície de clonagem. A qualidade do RNA total foi avaliada utilizando-se o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Lexington, MA, EUA), seguido pela conversão do RNA em fitas de cDNA. Para a geração das bibliotecas, foram utilizados kits TruSeq (Illumina) seguindo as instruções do fabricante. A construção da biblioteca consiste na fragmentação aleatória dos miRs, seguida pela produção de cDNA com primers aleatórios. As extremidades do cDNA foram reparadas e foram adicionados a cauda poli A e os adaptadores para indexação (até 12 diferentes códigos de barras diferentes por faixa) durante os ciclos de sequenciamento. Previamente à geração dos clusters os cDNAs foram quantificados por meio de qPCR, realizada em termociclador Roche LightCycler 480 (Roche), utilizando-se o kit Kapa Biosystems (Kapa Biosystems, Cambridge, MA, EUA). Os clusters foram gerados para render aproximadamente 725K-825K clusters/mm². Sua densidade e qualidade foram determinadas durante a corrida, após a avaliação dos parâmetros de adição de primeira base. Executaram-se corridas de sequenciamento de emparelhamento final 2X50 bp para alinhar as sequências de cDNA para o genoma de referência. Previamente ao alinhamento, os dados foram convertidos para o formato FASTQ Sanger pelo programa FASTQ Groomer. O programa TopHat foi utilizado para alinhar leituras RNA-Seq com o genoma de referência,

utilizando o programa Bowtie para alinhamento de sequências curtas, e para analisar os resultados do mapeamento, pela identificação de junções de splicing entre os exons. As leituras alinhadas pelo TopSeq foram utilizadas pelo Cufflinks para a montagem de transcritos, estimativa de abundância e testes de expressão e regulação diferenciais. A ferramenta Cuffcompare, que é parte do Cufflinks, comparou os transcritos montados com a anotação de referência e rastreou transcrições Cufflinks ao longo de vários experimentos. Por fim, o Cuffdiff indicou alterações significantes na expressão de transcritos de miRs. O arquivo BAM gerado pelo TopHat foi filtrado e a leitura foi pareada e mapeada. Foi criado um acúmulo do arquivo filtrado de acordo com o modelo MAQ. Este acúmulo foi filtrado para relatar variantes e para converter as coordenadas em intervalos, cobertos por um número determinado de leituras, com bases acima de um limiar de qualidade estabelecido. Para confirmar os resultados da análise de sequenciamento de miRs, as expressões de miR-4448, -4708 e -4773 foram avaliadas usando o kit QuantimiR-RT (Systems Biosciences-SBI, Mountain View, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As expressões relativas foram calculadas pelo método Δ CT e normalizadas pela expressão de U6, para mostrar os valores absolutos de miRs, e foram representados com relação ao miR não silenciador (NS). Além disso, seus alvos potenciais, SMAD1 e SMAD4, foram avaliados por PCR em tempo real, como descrito no subitem 3.1.6. As sequências de primers (Invitrogen-Life Technologies) são apresentadas na Tabela 1 do Apêndice.

3.2.7 Transfecção de miRs

Células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1, cultivadas em meio não osteogênico (descrito no subitem 3.1.2) até 30% a 50 % de confluência, foram transfectadas com 100 nM de miR- 4448 , -4708 e -4773, ou NS miR (Sigma-Aldrich), utilizando RNAiMax (Invitrogen-Life Technologies) e de acordo com as instruções do

fabricante. Foi coletado, após 48 horas, material para análise de expressão gênica e de proteínas. Para avaliar a expressão gênica dos miRs, foi utilizado o kit QuantimiR-RT (Systems Biosciences-SBI) seguindo as instruções do fabricante. As expressões relativas foram calculadas pelo método Δ CT e normalizada pela expressão de U6 para mostrar os valores absolutos de miRs, em relação ao NS miR. Além disso, a expressão gênica dos marcadores ósseos Bmp-2, Runx2 e Oc foram avaliadas de acordo com o subitem 3.1.6. As sequências de primers são apresentadas na Tabela 1 do Apêndice. Western blot foi realizado de acordo com o descrito no subitem 3.2.5, utilizando anticorpos para detectar as proteínas SMAD1 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) e SMAD4 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology).

3.2.7 Análise estatística

Os dados apresentados nesse estudo são representativos de quatro experimentos independentes, com a utilização de CTMs humanas provenientes de quatro doadores distintos. Para cada um desses experimentos, os ensaios de proliferação, viabilidade celular e a formação de matriz mineralizada foram realizados em quintuplicata (n=5) e a expressão gênica, em triplicata (n=3). Dados obtidos em diferentes períodos da cultura (proliferação, viabilidade celular e expressão gênica) foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Fisher para as comparações entre superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle. Dados de ensaios realizados em um único período (formação da matriz mineralizada e a expressão gênica) foram analisados pelo teste Mann-Whitney tanto para comparar superfícies de Ti com nanotopografia e Ti controle, quanto para comparar cada miR com o NS miR transfectados em células da linhagem MC3T3-E1. Para todos os experimentos, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Tratamento da superfície de Ti

Na microescala, as superfícies de Ti apresentaram uma topografia bastante similar, com ranhuras em várias direções (Figuras 1A e 1B). Em um maior aumento, ou seja, na nanoescala, o Ti controle apresentou uma superfície lisa e regular (Figura 1C), enquanto o Ti com nanotopografia apresentou uma rede de nanoporos (Figura 1D).

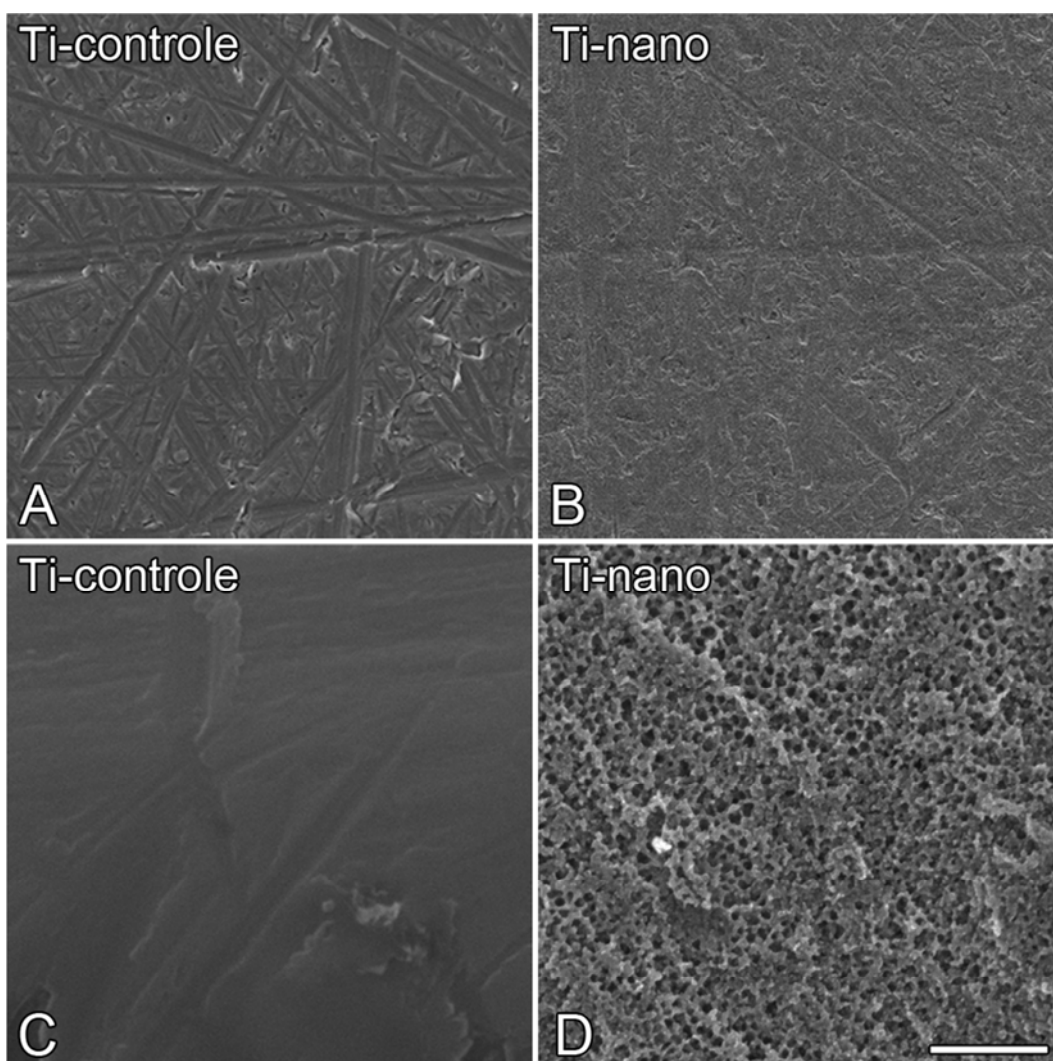


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura em alta resolução para as superfícies de Ti controle (A, C) e Ti com nanotopografia (B, D). Em menor aumento, as superfícies apresentaram topografia semelhante, com ranhuras multidirecionais (A, B). Em maior aumento, o Ti controle apresentou uma superfície lisa, enquanto o Ti com nanotopografia exibiu uma rede de nanoporos (C, D). Barra de escala: A, B = 50 μm e C, D = 1 μm .

4.2 Participação da integrina $\alpha 1\beta 1$ no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia

Um aumento progressivo no número de células foi observado sobre o Ti com nanotopografia do dia 0 ao dia 17, enquanto sobre o Ti controle, o crescimento da cultura atingiu o platô no dia 10 (Figura 2A). Além disso, o número de células foi maior no Ti com nanotopografia do que no Ti controle nos dias 10 ($p \leq 0,05$) e 17 ($p \leq 0,05$), sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) para os valores obtidos no dia 4 (Figura 2A). Tanto no Ti com nanotopografia quanto no Ti controle, a atividade de Alp atingiu o pico no dia 10 (Figura 2B). O Ti com nanotopografia exibiu maiores valores de atividade de Alp nos dias 4 ($p \leq 0,01$) e 10 ($p \leq 0,05$), e semelhantes aos do Ti controle ($p > 0,05$) no dia 17 (Figura 2B). Após 21 dias em cultura, detectou-se a presença de matriz mineralizada em ambas as superfícies, sem diferença estatisticamente significativa entre as superfícies ($p > 0,05$) para a quantidade de cálcio (Figura 2C).

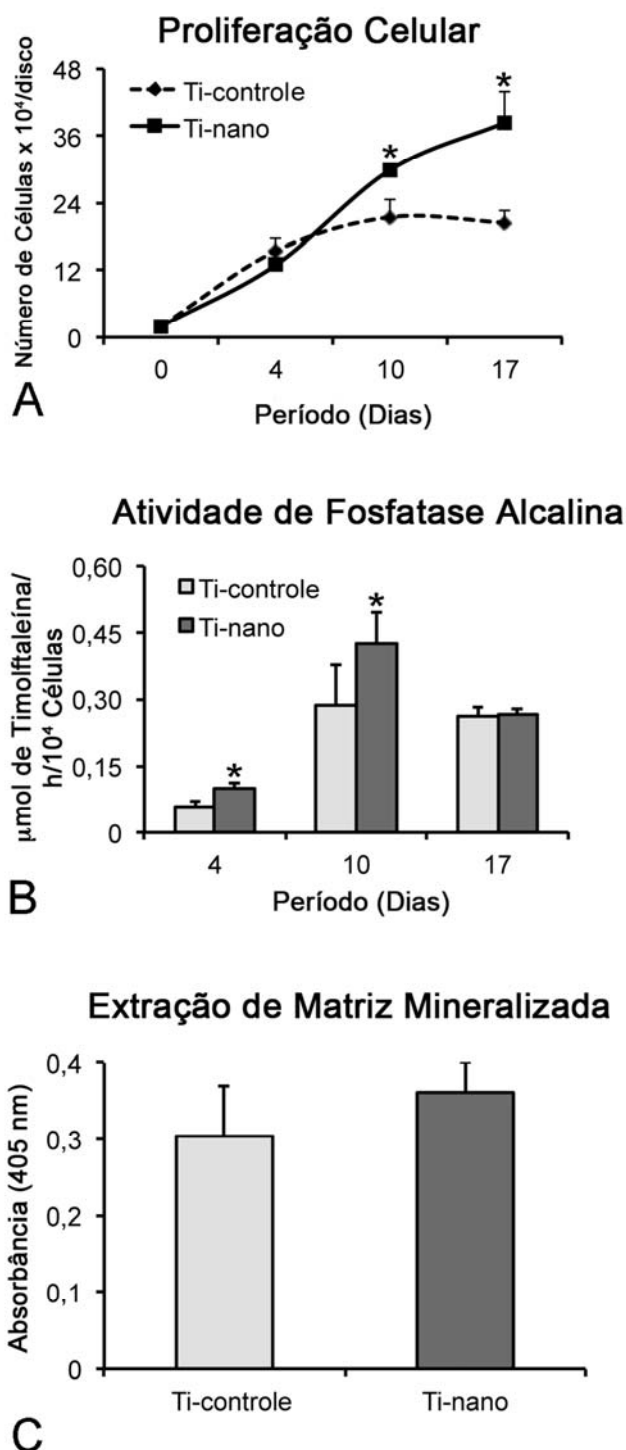


Figura 2. Proliferação (A), atividade da Alp (B), e mineralização da matriz extracelular (C) de CTMs de ratos diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia. O número de células foi maior sobre o Ti com nanotopografia nos dias 10 ($p \leq 0,05$) e 17 ($p \leq 0,05$) (A). Células crescidas sobre o Ti com nanotopografia exibiram maior atividade de Alp nos dias 4 ($p \leq 0,01$) e 10 ($p \leq 0,05$) (B). A quantidade de cálcio na matriz mineralizada (detalhe) foi semelhante entre as superfícies de Ti ($p > 0,05$) (C). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$). * Indica diferença estatisticamente significativa.

No dia 10, observou-se uma maior expressão de todos os genes avaliados, Runx2 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$), ColIA1 ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$), Alp ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$), Oc ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$), Bsp ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$) e Bmp-4 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$), em células crescidas sobre o Ti com nanotopografia em relação ao Ti controle, tanto sob condições osteogênicas quanto não osteogênicas (Figuras 3A e B; respectivamente).

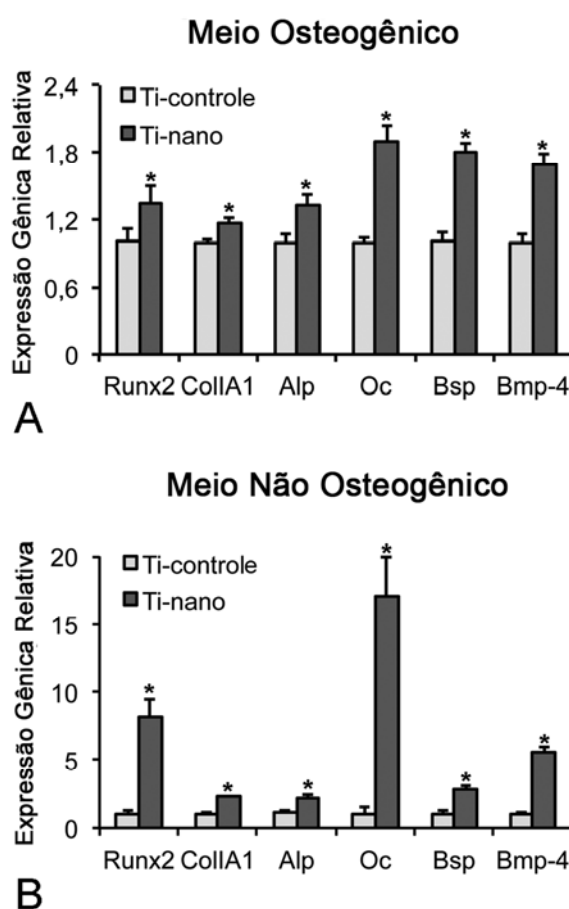


Figura 3. Expressão gênica de marcadores osteoblásticos em CTMs de ratos cultivadas sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia, em meio osteogênico (A) e não osteogênico (B) no dia 10. As expressões de Runx2 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$), ColIA1 ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$), Alp ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,01$), Oc ($p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$), Bsp ($p \leq 0,05$; $p \leq 0,001$) e Bmp-4 ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) foram maiores em células crescidas sobre o Ti com nanotopografia, tanto em condições osteogênicas (A), como não osteogênicas (B). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). * Indica diferença estatisticamente significativa.

Qualitativamente, adesão, morfologia celular e expressão da Opn não foram afetadas pela obtustatina em 24 horas (Figura 4). A superfície de Ti com nanotopografia favoreceu a adesão e o espriamento celulares, com predominância de células com morfologia estrelária, poligonal, tanto em culturas crescidas na presença do veículo, quanto da obtustatina (Figura 4A e B).

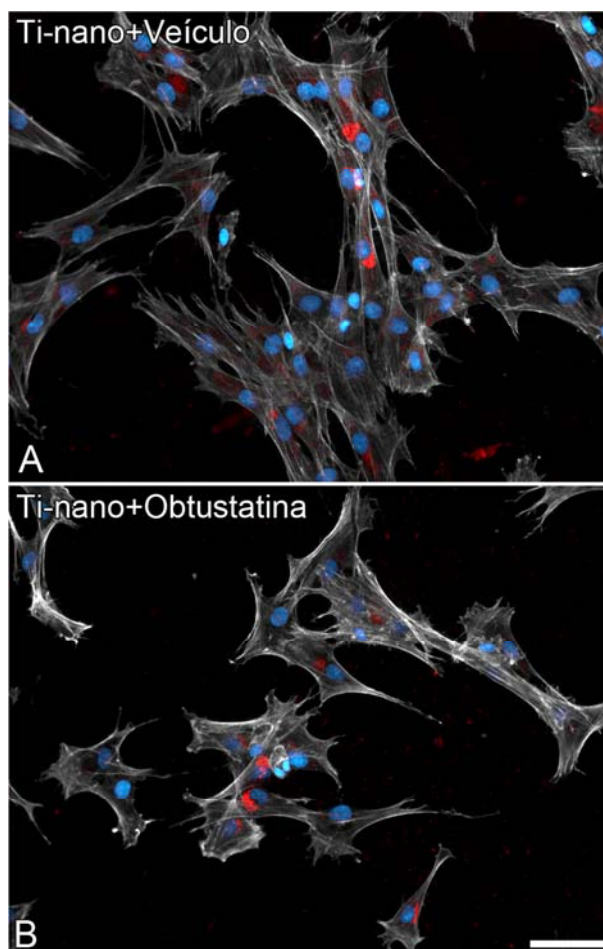


Figura 4. Epifluorescência de CTMs de ratos cultivadas em meio não osteogênico sobre superfície de Ti com nanotopografia, tanto na presença do veículo (A) quanto de obtustatina (B), em 24 horas. Fluorescência verde, aqui representada em branco pálido, revela o citoesqueleto da actina; fluorescência azul, os núcleos celulares e, em vermelho, imonulocalização de Opn. Note-se aspectos semelhantes entre os grupos, em termos de adesão, morfologia celular e expressão de Opn. Barra de escala = 100 μm .

Entre as culturas crescidas em meio não osteogênico, observou-se maior expressão gênica de integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ no Ti com nanotopografia do que no Ti controle ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$) respectivamente; (Figura 5A). No dia 10, o uso de obtustatina regulou negativamente a expressão gênica de ColIA1 ($p \leq 0,05$), Alp ($p \leq 0,01$), Oc ($p \leq 0,05$), Bsp ($p \leq 0,001$), e Bmp-4 ($p \leq 0,01$), sem afetar Runx2 ($p > 0,05$) (Figura 5B). Além disso, a obtustatina reduziu a atividade de Alp ($p \leq 0,01$) em culturas crescidas sobre Ti com nanotopografia em meio não osteogênico (Figura 5C).

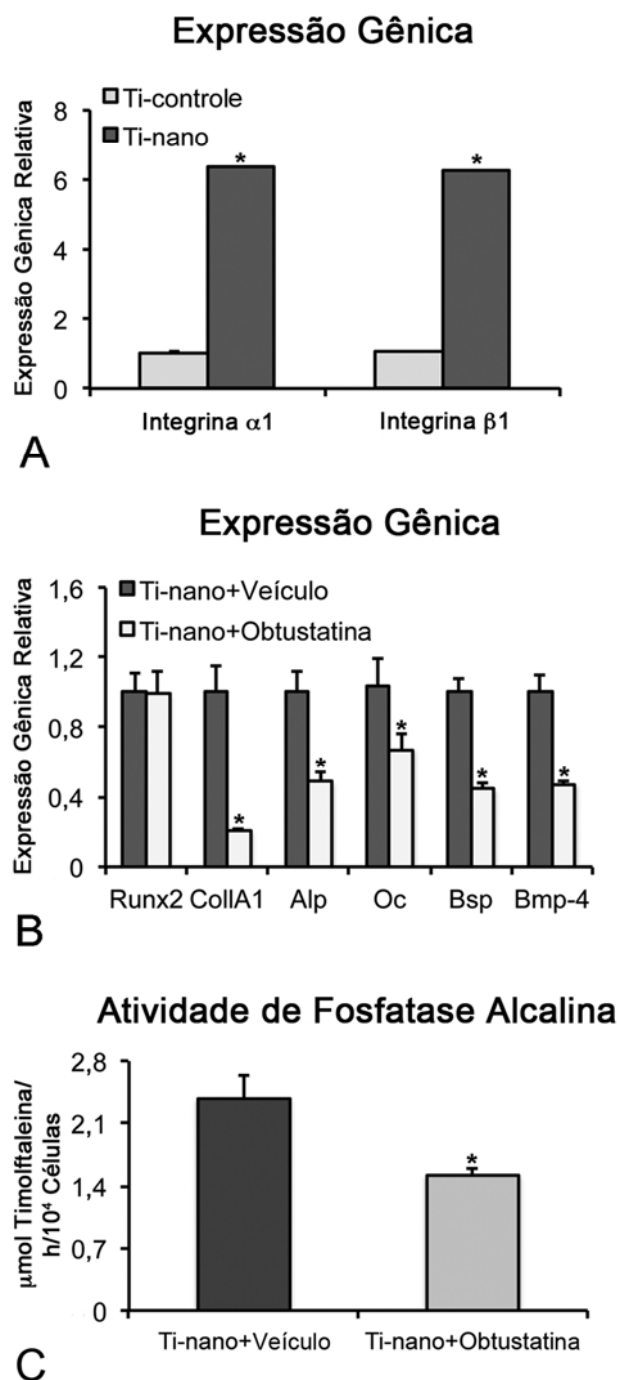


Figura 5. Expressão gênica das integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ de CTMs de ratos cultivadas sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia no dia 10 (A). Uma maior expressão das integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ ($p \leq 0,001$) foi observada nas células crescidas sobre o Ti com nanotopografia. Efeito da obtustatina na expressão gênica de marcadores ósseos (B) e na atividade de Alp (C) de CTMs de ratos cultivadas sobre Ti com nanotopografia no dia 10. A obtustatina regulou negativamente as expressões gênicas de Col1A1 ($p \leq 0,05$), Alp ($p \leq 0,01$), Oc ($p \leq 0,05$), Bsp ($p \leq 0,001$) e Bmp-4 ($p \leq 0,01$), além de reduzir a atividade de Alp ($p \leq 0,01$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$ para expressão gênica e $n=4$ para atividade de Alp). * Indica diferença estatisticamente significativa.

4.3 Participação de miRs no potencial osteogênico de superfície de Ti com nanotopografia

Um aumento progressivo do número de células foi observado do dia 0 ao dia 17, sem diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies de Ti ($p>0,05$) (Figura 6A). Além disso, a viabilidade celular, próxima de 80%, também não foi afetada ($p>0,05$) pelo tratamento de superfície do Ti (Figura 6B).

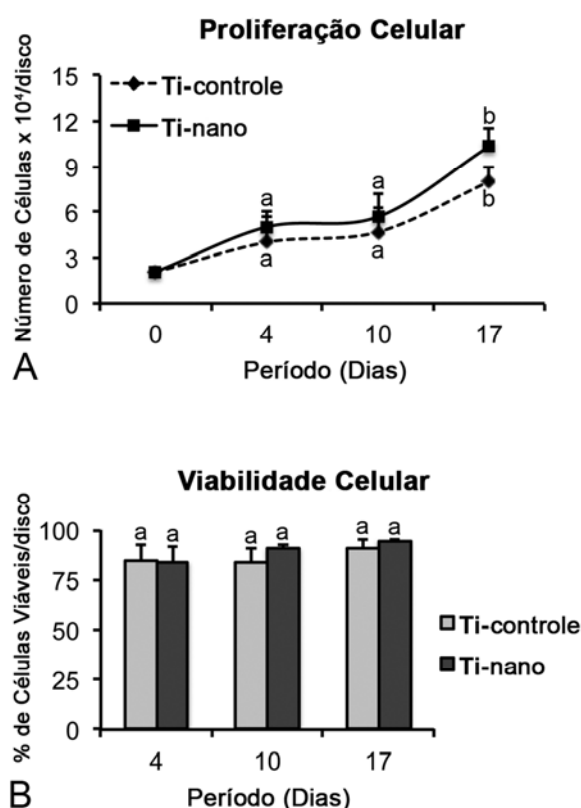


Figura 6. Proliferação (A) e viabilidade celulares (B) de CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as superfícies de Ti tanto na proliferação celular ($p>0,05$), quanto na viabilidade ($p>0,05$). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=5$). Marcadores (A) e barras (B) com letras iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

A expressão gênica de Runx2 foi maior ($p<0,001$) no Ti com nanotopografia do que no Ti controle no dia 4; no entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) foi observada nos dias 10 e 17 (Figura 7A). O Ti com nanotopografia não afetou a expressão gênica de ColIA1 ($p>0,05$) em nenhum dos períodos avaliados (Figura 7B). A expressão gênica de Alp foi maior em Ti com nanotopografia comparado ao Ti controle no dia 10 ($p\leq 0,05$), e semelhante entre

as superfícies nos dias 4 e 17 ($p>0,05$) (Figura 7C). A expressão de Oc foi maior ($p\leq 0,001$) em Ti com nanotopografia em relação ao Ti controle no dia 4, e não afetada pelo tratamento da superfície nos dias 10 e 17 ($p>0,05$) (Figura 7D). A expressão gênica de Opn foi maior no Ti com nanotopografia em relação ao Ti controle nos dias 4 ($p\leq 0,001$) e 17 ($p\leq 0,05$); entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as superfícies no dia 10 ($p>0,05$) (Figura 7E). A expressão gênica de Bmp-2 foi maior no Ti com nanotopografia em relação ao Ti controle em todos os períodos avaliados ($p\leq 0,001$) (Figura 7F).

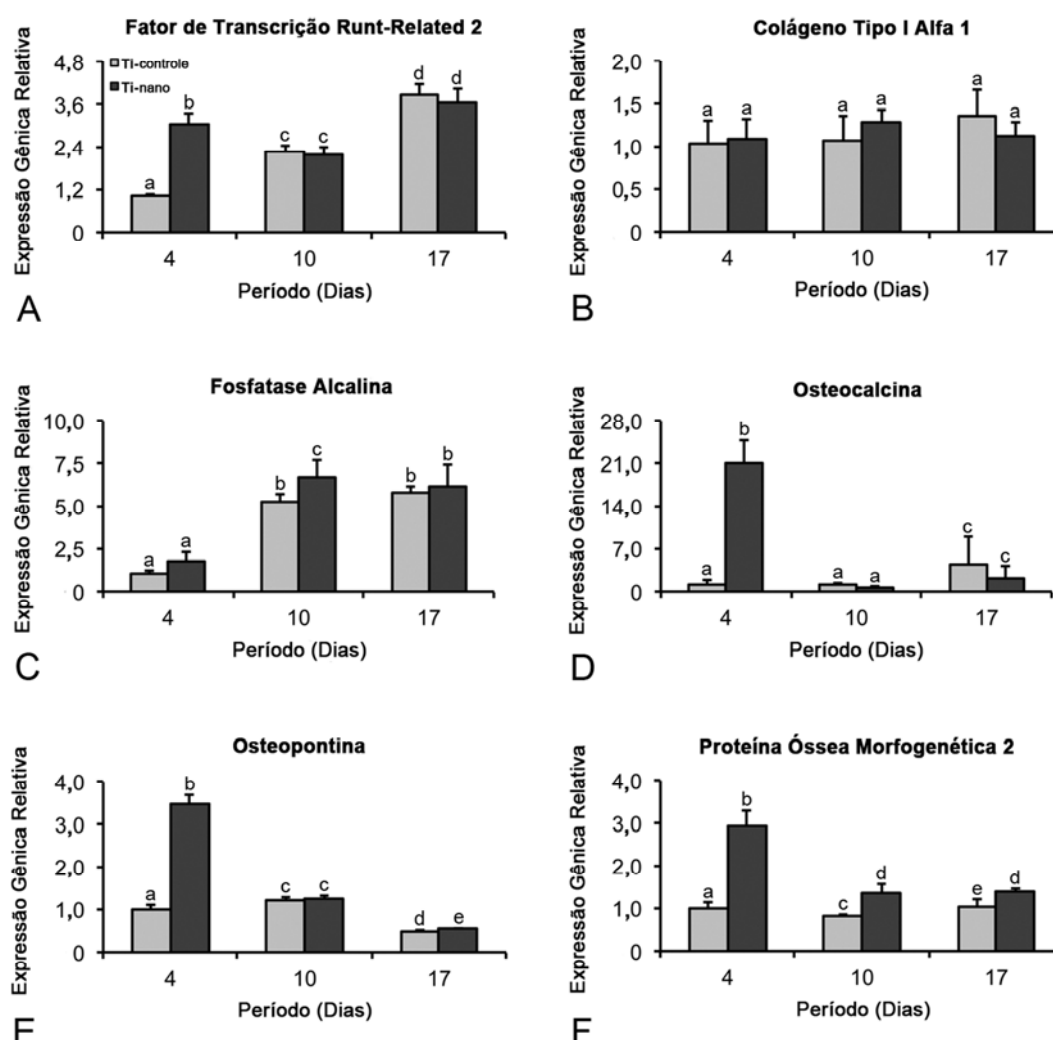


Figura 7. Expressão gênica de marcadores osteoblásticos em CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia. As expressões de Runx2 (A) ($p<0,001$), Oc (D) ($p<0,001$), Opn (E) ($p<0,001$) e Bmp-2 (F) ($p<0,001$) foram maiores em células crescidas sobre o Ti com nanotopografia do que no Ti controle no dia 4. Também as expressões de Opn (E), no dia 17 ($p\leq 0,05$), e de Bmp-2 (F), nos dias 10 e 17 ($p\leq 0,001$), foram maiores em células crescidas sobre o Ti com nanotopografia do que no Ti controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). Barras com letras distintas indicam diferença estatisticamente significativa.

A análise dos resultados obtidos por Western blot revelou reduzida quantidade da proteína Alp no dia 10 em ambas as superfícies de Ti. No dia 17, culturas crescidas sobre Ti com nanotopografia apresentaram mais Alp do que o Ti controle (Figura 8A). No dia 21, detectou-se mineralização da matriz extracelular tanto em culturas crescidas sobre Ti com nanotopografia quanto no Ti controle, com quantidade de cálcio semelhante entre as superfícies ($p>0,05$) (Figura 8B).

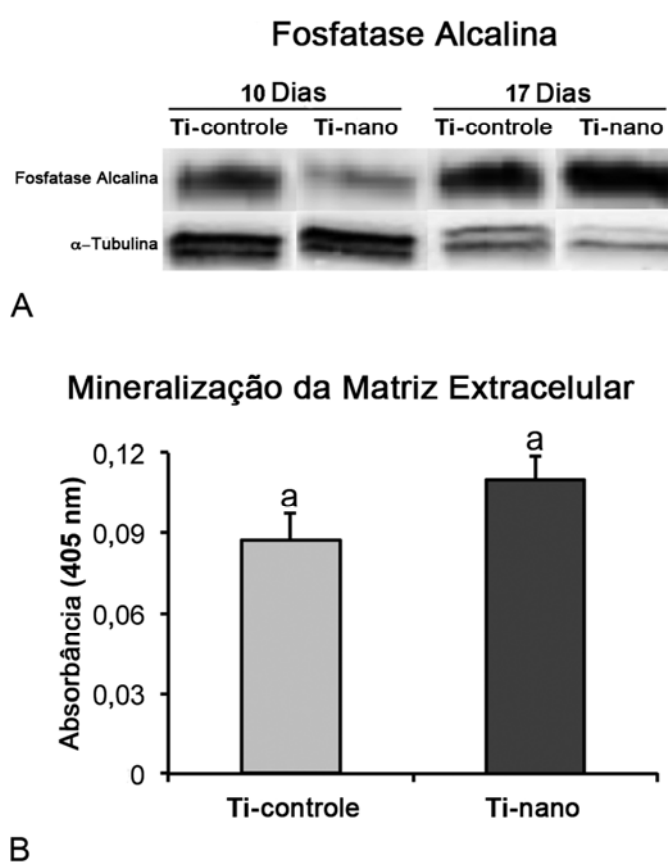


Figura 8. Expressão da proteína Alp (A) e mineralização da matriz extracelular (B) de CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia. Células crescidas sobre o Ti com nanotopografia exibiram maior expressão proteica de Alp no dia 17 (A). A quantidade de cálcio na matriz mineralizada foi semelhante entre as superfícies de Ti ($p>0,05$) (B). Os dados de mineralização da matriz extracelular são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=5$). Barras (B) com a mesma letra indicam ausência de diferença estatisticamente significativa.

Como o efeito da superfície de Ti com nanotopografia sobre os marcadores da diferenciação osteoblástica foi mais evidente no dia 4, a análise de miRs teve como foco esse período. Em dois experimentos distintos, sob as mesmas condições, 118 miRs mostraram

alterações significativas em resposta ao Ti com nanotopografia em relação ao Ti controle. Sessenta miRs foram regulados positivamente (no mínimo 2x maior), enquanto 58 miRs foram regulados negativamente (no mínimo 2x menor) pelo Ti com nanotopografia em comparação ao Ti controle (Tabelas 1-3).

Tabela 1. Expressão dos miRs de CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico, regulados positivamente (> 2 vezes) ou negativamente (< 2 vezes) pela superfície de Ti com nanotopografia em comparação ao Ti controle, no dia 4.

miRs regulados positivamente	Aumento	miRs regulados negativamente	Redução
miR-4423-3p	7,28	miR-4271	9,08
miR-520g-s	5,11	miR-4708*	8,36
miR-629-s	4,31	miR-4448*	8,09
miR-211	4,05	miR-30e	6,23
miR-3211	3,52	miR-548q	6,21
miR-1208	3,08	miR-4773*	5,81
miR-620-x	3,03	miR-4753	5,11
miR-3613-5p	3,01	miR-4730	4,79
miR-3128	2,96	miR-628-5p	4,65
miR-3148	2,76	miR-422a	3,92
miR-4512	2,75	miR-1299	3,85
miR-2116	2,71	miR-4444	3,62
miR-4713-5p	2,70	miR-154-s	3,56
miR-4761	2,59	miR-200b-s	3,56
miR-371b-5p	2,45	miR-4490	3,55
miR-766	2,42	miR-4720-5p	3,54
miR-3179	2,37	miR-18b	3,47
miR-520-h	2,36	miR-206	3,40
miR-620	2,36	miR-455-5p	3,33
miR-4679-1	2,34	miR-146b-5p	3,32

*Estudo focado nos três miRs em destaque.

Tabela 2. Expressão dos miRs de CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico, regulados positivamente (> 2 vezes) ou negativamente (< 2 vezes) pela superfície de Ti com nanotopografia em comparação ao Ti controle, no dia 10.

miRs regulados positivamente	Aumento	miRs regulados negativamente	Redução
miR-3613-5p	6,07	miR-185-s	3,08
miR-154-s	3,50	miR-1266-x	2,86
miR-3122	3,34	miR-3157-3p	2,79
miR-187	2,57	miR-4451	2,62
miR-30e	2,56	miR-4758-3p	2,55
miR-3940-3p	2,56	miR-4290	2,37
miR-628	2,54	miR-483-3p	2,26
miR-29c	2,48	miR-378c	2,24
miR-3909	2,47	let-7a-1	2,23
miR-1246	2,41	miR-3942	2,22
miR-452	2,29	miR-1323	2,16
miR-1278	2,28	miR-4664-5p	2,09
miR-148b	2,26	miR-2682	2,04
miR-3605-3p	2,22	miR-3910	2,04
miR-1193	2,18	miR-4511	2,04
miR-29b	2,17	miR-4657	2,03
miR-196b-s	2,17	miR-4720-5p	2,02
miR-455-5p	2,17	miR-1296	2,01
miR-19a	2,16		
miR-376a	2,15		

Tabela 3. Expressão dos miRs de CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico, regulados positivamente (> 2 vezes) ou negativamente (< 2 vezes) pela superfície de Ti com nanotopografia em comparação ao Ti controle, no dia 17.

miRs regulados positivamente	Aumento	miRs regulados negativamente	Redução
miR-421	22,39	miR-1247	5,26
miR-4324	18,50	miR-181c	4,99
miR-411	17,76	miR-150	4,03
miR-181a-s	14,95	miR-4767	3,78
miR-27a-s	14,74	miR-519b-x	3,61
miR-497	14,61	miR-4655-3p	3,57
miR-140-5p	13,66	miR-1914-s	3,52
miR-129-5p	12,71	miR-4737-x	3,50
miR-487a	12,55	miR-4785	3,46
miR-21	11,47	miR-4748	3,28
miR-4672	11,44	miR-92a-1-s	3,27
miR-4304	11,01	miR-135b-s	3,20
miR-148a	10,86	miR-129-1	3,17
miR-221-s	10,82	miR-137	3,03
miR-19b	10,62	miR-361-3p	3,00
miR-299-5p	10,34	miR-197	2,92
miR-15a	9,68	miR-20b-s	2,88
miR-4448	9,33	miR-3676	2,85
miR-130a	9,26	miR-499a	2,81
miR-376c	9,16	miR-4528	2,81

Três miRs, miR-4448, -4708 e -4773, que tiveram sua expressão significativamente reduzida pelo Ti com nanotopografia (5 vezes < Ti controle), afetaram a diferenciação osteoblástica de CTMs humanas. Esses dados foram confirmados pela análise de PCR em tempo real ($p \leq 0,001$ para miR-4448, -4708 e -4773) (Figura 9A). A diferença em termos de valores absolutos entre os dois métodos empregados, podem ser atribuídas ao fato de que a análise de sequenciamento de miRs quantifica miRs primários, pré-miRs e miRs maduros, enquanto no PCR em tempo real, apenas miRs maduros são quantificados. A partir dos resultados obtidos, genes alvos que induzem a diferenciação osteoblástica, listados no banco de dados Diana microT, TargetScan ou MIRANDA, foram selecionados por bioinformática e os alvos potenciais incluíram SMAD1 (miR-4448 e -4708) e SMAD4 (miR-4708 e -4773) (Figura 1 do Apêndice). Corroborando os dados de bioinformática, observou-se que o Ti com

nanotopografia regula positivamente a expressão gênica de SMAD1 e SMAD4 ($p \leq 0,001$ para ambos) (Figura 9B).

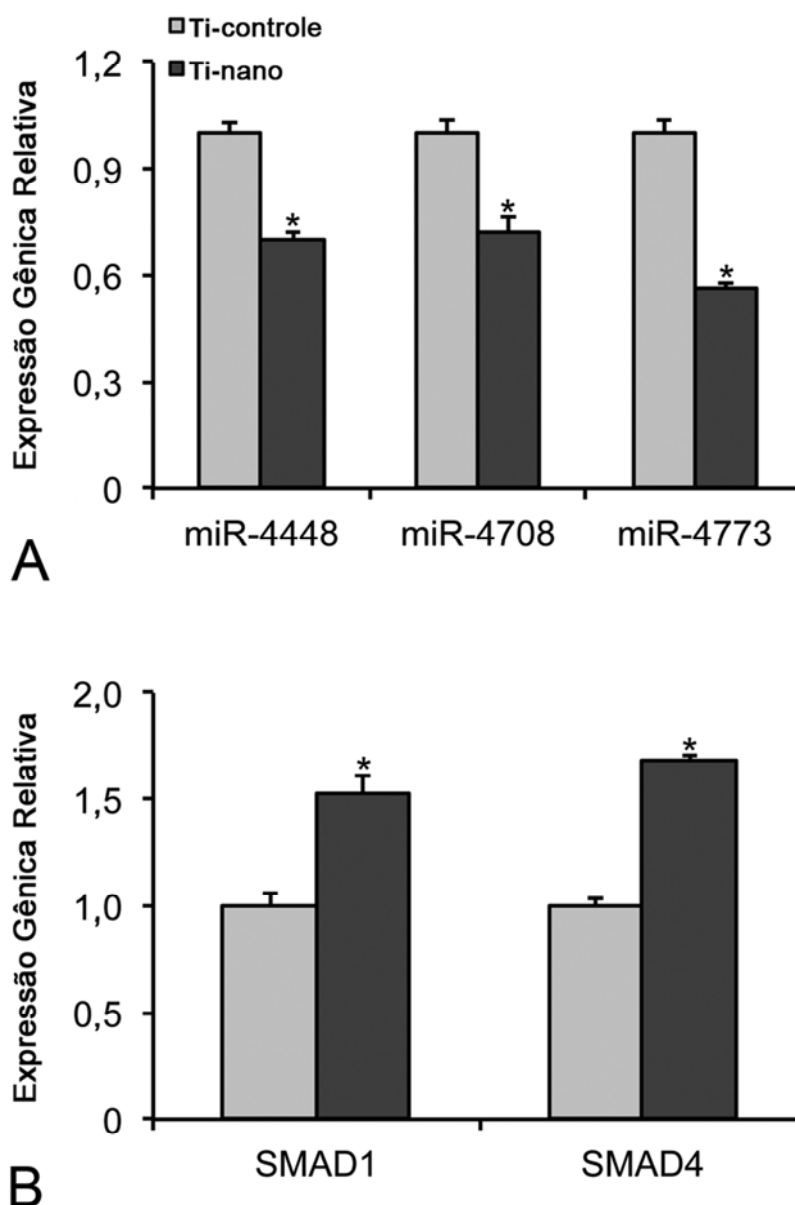


Figura 9. Expressão gênica de miR-4448, -4708 e -4773 (A), e SMAD1 e SMAD4 (B) em CTMs humanas, diferenciadas em osteoblastos, cultivadas em meio osteogênico sobre superfícies de Ti controle e Ti com nanotopografia no dia 4. As expressões de de miR-4448, -4708 e -4773 (A) foram menores ($p \leq 0,001$) e as expressões de SAMAD1 e SMAD4 (B) foram maiores ($p \leq 0,001$) nas células crescidas sobre o Ti com nanotopografia do que no Ti controle. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). * Indica diferença estatisticamente significativa.

SMAD1 mRNA 3' UTR

5'...ACGATTGAGAACTGACAAAGGAGCC...3'

••••••••

miR-4448 3' AUGGGGAUCUGGUUUCUCGG 5'

5'...CUGGAAAACUAUUGAGCCUUGCA...3'

••••••••

miR-4708 3' UAGUCUCUCUACGGCGGAACGA 5'**SMAD4 mRNA 3' UTR**

5'...AACACAGCUUCUACUGCCUUGCU...3'

••••••••

miR-4708 3' UAGUCUCUCUACGGCGGCGGAACGA 5'

5'...CUACCUA AUGUCUCACUGUUCUG...3'

••••••••

miR-4773 3' CGGAAAGAUACGAGGACAAGAC 5'

Figura 10. Ilustração esquemática das sequências 3'UTR de SMAD1 e SMAD4 com sequências-alvo de miR-4448, -4708 e -4773. Os potenciais sítios-alvo de SMAD1 (miR-4448 e -4708) e de SMAD4 (miR-4708 e -4773) foram detectados nos programas Diana microT, TargetScan ou MIRANDA.

A sobreexpressão dos miR-4448 e -4708 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD1 ($p \leq 0,001$ para ambos) (Figuras 11A e B) e a sobreexpressão de miR-4708 e -4773 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD4 ($p \leq 0,001$ para ambos) (Figuras 11C e D) em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1. Por ter como alvos SMAD1 e SMAD4, miR-4448, -4708 e -4773 regularam negativamente as expressões gênicas dos marcadores ósseos Bmp-2, Runx2 e Oc ($p \leq 0,05$ para todos os genes) (Figura 12).

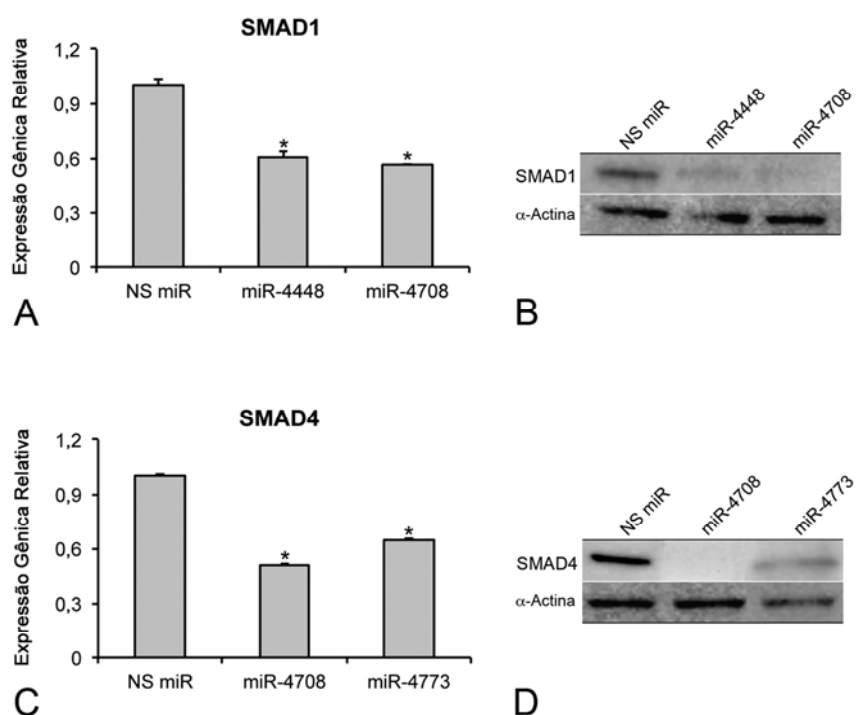


Figura 11. Expressão gênica e proteica de SMAD1 (A, B) e SMAD4 (C, D) em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1, transfectadas com miR-4448, -4708 ou NS miR (A, B) e com miR-4708, -4773 ou NS miR (C, D), 48 horas após a transfecção. A sobreexpressão de miR-4448 e -4708 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD1 ($p \leq 0,001$) (A,B). A sobreexpressão de miR-4708 e -4773 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD4 ($p \leq 0,001$) (C,D). Os dados da expressão gênica são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). * Indica diferença estatisticamente significativa. NS miR: miR não silenciador.

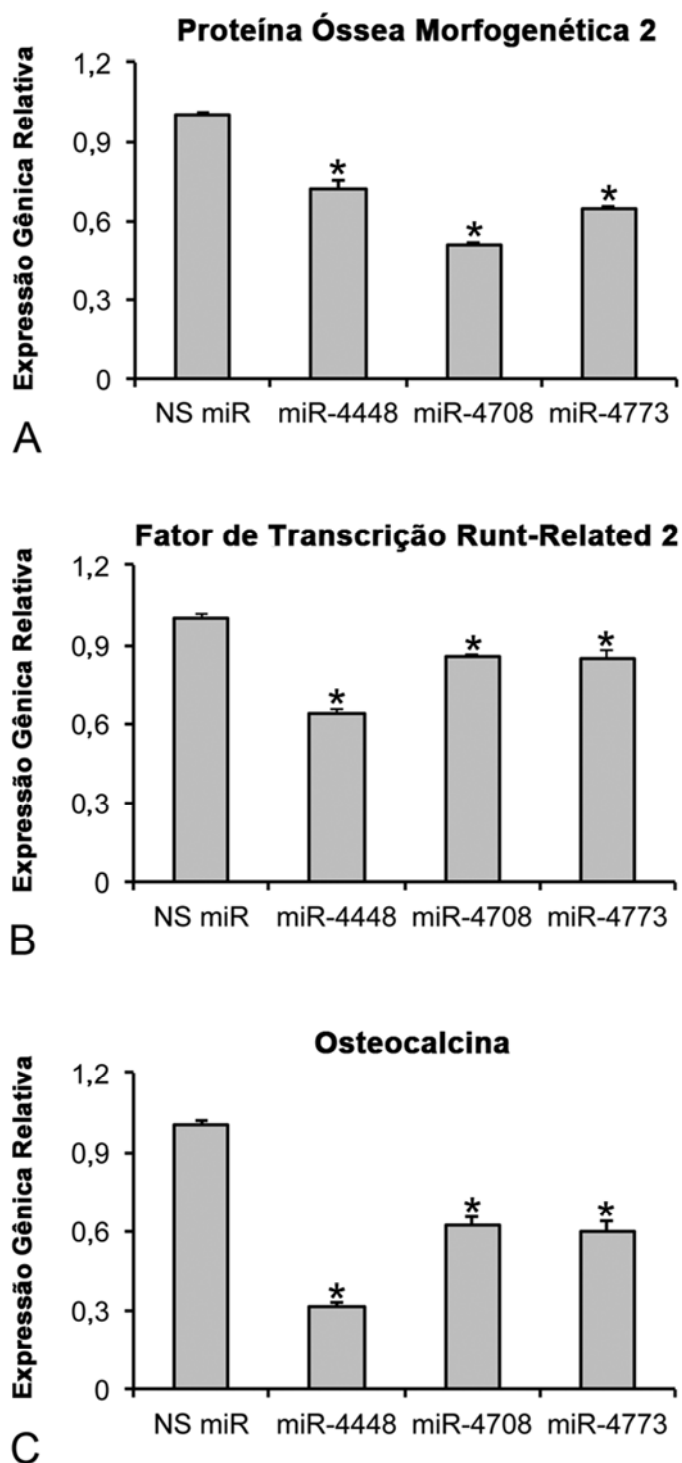


Figura 12. Expressão gênica de Bmp-2, Runx2 e Oc em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 transfetadas com miR-4448, -4708, -4773 ou NS miR, 48 horas após a transfecção. As expressões dos três genes avaliados foram menores na presença de miR-4448, -4708 e -4773 ($p \leq 0,05$) em relação ao NS miR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$). * Indica diferença estatisticamente significativa. NS miR: miR não silenciador.

5 DISCUSSÃO

Os aspectos topográficos na nanoescala, observados por microscopia eletrônica de varredura na superfície de Ti tratada, indicam que o método de modificação de superfície empregado neste estudo obteve êxito, ou seja, o condicionamento de discos de Ti com uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ por 4 horas gerou nanotopografia, como descrito previamente (Variola et al., 2008).

Os resultados obtidos na primeira parte deste estudo, acerca da participação da integrina $\alpha 1\beta 1$, mostraram que, em condições osteogênicas, a superfície de Ti com nanotopografia favorece a proliferação celular e estimula a diferenciação de CTMs de ratos em osteoblastos, como evidenciado pelos maiores valores de atividade de Alp e de expressão gênica dos marcadores osteoblásticos. Ainda, foi observado o desenvolvimento de um microambiente que favorece a diferenciação osteoblástica, quando CTMs foram cultivadas sobre Ti com nanotopografia na ausência de fatores osseoindutores. Com o uso da obtustatina, demonstrou-se que a via de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$ determina, pelo menos em parte, o efeito osseoindutor da nanotopografia de Ti em CTMs.

Após a adesão celular, as células começam a proliferar, com o objetivo de colonizar a superfície do implante, e os estudos têm reportado uma maior taxa de proliferação em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 e em células derivadas de calvária de ratos recém-nascidos crescidas sobre Ti com nanotopografia (Vetrone et al., 2009; de Oliveira et al., 2007). Corroborando esses achados, no presente estudo, observou-se um maior número de células sobre a superfície de Ti com nanotopografia, em relação ao Ti controle, nos dias 10 e 17. Para avaliar a progressão da diferenciação osteoblástica, foi avaliada a atividade de Alp, uma enzima que tem papel fundamental no fenômeno da mineralização (Beck et al., 1998). Uma curva típica da atividade de Alp e com pico no dia 10, como descrito

por outros autores (de Oliveira et al., 2007), foi observada para ambas as superfícies de Ti, sendo que a superfície de Ti com nanotopografia permitiu uma maior atividade dessa enzima nos dias 4 e 10. É importante mencionar que a alta atividade de Alp não resultou em maior mineralização da matriz extracelular na superfície de Ti com nanotopografia, ao contrário do observado em células derivadas de calvária de ratos recém-nascidos crescidas sobre esse mesmo substrato (de Oliveira et al., 2007). As diferenças entre a sensibilidade dos métodos empregados e o uso de CTMs, um modelo de cultura de células menos diferenciadas em relação ao de células derivadas de calvária, podem explicar as diferenças entre os estudos, em relação à mineralização da matriz extacelular.

Na tentativa de se investigar características osteoblásticas de CTMs, examinou-se a expressão dos genes Runx2, ColIA1, Alp, Oc, Bsp e Bmp-4, marcadores importantes que são expressos em diferentes estágios da diferenciação osteoblástica. O Runx2 é o regulador mais importante da formação óssea e o ColIA1, a principal proteína da matriz extracelular do tecido ósseo (Canty & Kadler, 2005; Komori et al., 1997). A Bsp e a Oc são proteínas não colágenas da matriz envolvidas, respectivamente, na enucleação de cristais hidroxiapatita e na modulação da mineralização (Gams et al., 1999; Owen et al., 1990). A Bmp-4, uma proteína osteogênica, é capaz de induzir a formação óssea ectópica (Reddi & Cunningham, 1993). Os resultados deste estudo mostraram que todos os marcadores osteoblásticos avaliados foram regulados positivamente em células crescidas sobre superfície de Ti com nanotopografia, em relação ao Ti controle, em pelo menos um (10 dias) dos três períodos avaliados. Corroborando esses achados, foi observado que a nanotopografia gerada por nanorevestimento com óxido de alumínio promove aumento da expressão de genes representativos da diferenciação osteoblástica em CTMs humanas crescidas sobre superfícies de Ti (Mendonça et al., 2009).

Entre as diferentes nanoestruturas de Ti, os nanotubos de TiO₂ têm sido alvo de muitos estudos e foi observado que o tamanho do nanotubo pode direcionar o destino da célula

(Zhang et al., 2011; Yu et al., 2010., Oh et al., 2009; Park et al., 2009; Brammer et al., 2009). Mais especificamente, nanotubos variando de 70 a 100 nm de diâmetro induzem a diferenciação osteoblástica de CTMs humanas na ausência de fatores osseointutores (Oh et al., 2009). Além disso, superfícies de poliuretano exibindo saliências e ranhuras de padrão submicrométrico suscitam o mesmo efeito em CTMs humanas (Watari et al., 2012). Como a superfície de Ti com nanotopografia aumentou a expressão gênica de todos os genes avaliados no dia 10 em um ambiente osteogênico, foi selecionado este período para avaliar a hipótese de que a nanotopografia por si só possa afetar a diferenciação osteoblástica. Os resultados deste estudo mostraram que a superfície de Ti com nanotopografia induziu a expressão gênica de todos os marcadores osteoblásticos avaliados quando CTMs foram cultivadas em meio não osteogênico. É interessante ressaltar que o aumento na expressão gênica induzido pela superfície de Ti com nanotopografia foi mais pronunciado em ambiente não osteogênico, sugerindo que os fatores osseointutores presentes no meio osteogênico poderiam mascarar o efeito da nanotopografia.

Uma das vantagens da nanotopografia é sua habilidade de mimetizar a matriz extracelular (Tran & Webster, 2009; Wang, 2003). Sabe-se que as integrinas, membros de uma grande família de receptores da superfície celular, medeiam interações entre as células e a matriz extracelular, exercendo um papel fundamental nos eventos de adesão, migração, proliferação e diferenciação durante o desenvolvimento e o reparo ósseo (Allori et al., 2008; Siebers et al., 2005; Ekholm et al., 2002). Assim, focamos nosso estudo nas integrinas, especificamente $\alpha 1\beta 1$, que estão associadas ao processo de reparo de fraturas ósseas, como sendo uma das possíveis vias de sinalização, ativadas pela nanotopografia, para induzir a diferenciação osteoblástica. Os resultados mostraram um aumento significativo na expressão gênica da integrina $\alpha 1\beta 1$ de CTMs crescidas em superfície de Ti com nanotopografia, comparadas ao Ti controle, em meio não osteogênico. Para comprovar que a nanotopografia

direciona o destino de CTMs levando à diferenciação osteoblástica por meio da via de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$, foram realizadas culturas de CTMs sobre superfícies de Ti com nanotopografia na presença de obtustatina, um potente inibidor seletivo da integrina $\alpha 1\beta 1$ (Marcinkiewicz et al., 2003). Os resultados mostraram claramente que os aumentos na expressão gênica de marcadores osteoblásticos e na atividade de Alp induzidos pela nanotopografia foram inibidos na presença da obtustatina, revelando o papel central da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito da nanotopografia sobre a diferenciação osteoblástica.

O resultados até aqui discutidos indicam que a associação de modificações físicas (presença de nanoporos) e químicas (espessura e pureza da camada de TiO_2) da superfície de Ti, produzidas por oxidação com uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, aumenta a proliferação celular e a diferenciação osteoblástica em meio osteogênico. Ainda, notou-se que essa nanotopografia direciona a diferenciação de CTMs de ratos para a linhagem osteoblástica na ausência de fatores osteogênicos. Este é o primeiro relato indicando a participação da via de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$ no efeito osseoindutor da superfície de Ti com nanotopografia em CTMs.

Adicionalmente à via de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$, foi avaliado o papel de miRs no potencial osteogênico da superfície de Ti com nanotopografia, utilizando CTMs humanas e células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1. Os resultados mostraram que a nanotopografia de Ti favorece a diferenciação osteoblástica de CTMs humanas, como evidenciado pelo aumento da expressão gênica e proteica dos marcadores osteoblásticos em tempos específicos. Também foi observada a expressão diferencial de alguns miRs em células crescidas sobre ambas as superfícies. Especificamente, a superfície de Ti com nanotopografia reduziu significativamente a expressão de 3 miRs, miR-4448, -4708 e -4773, que inibem a expressão de SMAD1 e SMAD4, dois transdutores da via de sinalização de Bmp-2. Dessa forma, propoemos que um dos mecanismos pelos quais a nanotopografia de Ti induz a diferenciação osteoblástica envolve uma regulação negativa de miR-4448, -4708 e -4773, que

atenua a degradação de SMAD1 e SMAD4 e, conseqüentemente, intensificam a transdução de sinal da Bmp-2.

Para a colonização da superfície de Ti é necessário que as células se proliferem, e os resultados com CTMs de ratos, discutidos anteriormente, somados às pesquisas realizadas com células derivadas da calvária de ratos recém-nascidos confirmam o efeito da nanotopografia de Ti sobre a proliferação celular (de Oliveira et al., 2007). Em CTMs humanas, padrões semelhantes para os parâmetros de proliferação e viabilidade celulares foram observados em ambas as superfícies de Ti, sem diferenças significativas no número de células nos períodos avaliados, sugerindo que células de diferentes origens podem responder de formas distintas à nanotopografia em termos de taxa proliferativa. Para analisar a diferenciação osteoblástica, a expressão dos marcadores osteoblásticos Runx2, ColIA1, Alp, Oc, Opn, e Bmp-2 e a atividade de Alp foram avaliadas, sendo observado que a superfície de Ti com nanotopografia regulou positivamente a expressão de todos estes marcadores em relação ao Ti controle, em pelo menos um dos três períodos avaliados e especialmente no dia 4. Esses resultados se assemelham aos já discutidos na primeira parte deste estudo, com CTMs de ratos, porém, com diferença para o período em que ocorreu o pico de expressão dos marcadores, que foi no dia 10. Além disso, assim como observado para CTMs de ratos, a alta expressão proteica de Alp em CTMs humanas cultivadas sobre Ti com nanotopografia não correspondeu a uma maior formação de matriz mineralizada.

Durante a diferenciação osteoblástica de CTMs humanas, o sequenciamento de miRs revelou que 60 miRs foram regulados positivamente e 58 miRs foram regulados negativamente pela superfície de Ti com nanotopografica. Esses achados corroboram dados de outras pesquisas, que têm demonstrado que superfícies de Ti modulam a expressão de miRs (Palmieri et al., 2008a; Palmieri et al., 2008b; Palmieri et al., 2007). Entretanto, esses estudos não exploraram os mecanismos pelos quais os miRs regulam o potencial osteogênico

das superfícies de Ti. Também foi demonstrado que superfícies de Ti com microporosidades, produzidas por condicionamento ácido, regulam negativamente a expressão dos miR-146a e -155, que supostamente têm como alvo os transdutores da sinalização de Tgf- β /Bmp; no entanto, esses alvos não foram confirmados experimentalmente (Chakravorty et al., 2012). Portanto, até o presente momento, o envolvimento de miRs nas interações célula/superfície de Ti foi pouco explorado, sendo assim pouco compreendido. Nesse contexto, apresentamos novos dados sobre 3 miRs, miR-4448, -4708 e -4773, regulados negativamente pela superfície de Ti com nanotopografia e que tem como alvos as proteínas SMAD1 e SMAD4, dois importantes transdutores da via de sinalização de Bmp-2 (Liu et al., 2014; Huang et al., 2014; Takase et al., 1998; Hata et al., 1998). Foi demonstrado que a sobreexpressão desses miRs em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 inibiu a expressão gênica e proteica de SMAD1 e SMAD4, o que atenuou a transdução de sinal de Bmp-2, levando à inibição das expressões gênicas de Bmp-2, Runx2 e Oc.

Alguns estudos têm apresentado evidências de colaboração entre a sinalização de integrina e de Bmp-2 na indução da diferenciação osteoblástica (Mai et al., 2013; Lai & Cheng, 2005). A inibição da integrina $\beta 1$ atenua tanto a síntese quanto a secreção de Bmp-2, assim como a repressão de Bmp-2 regula negativamente a expressão gênica da integrina $\beta 1$ em células da linhagem pré-osteoblástica de camundongos MC3T3-E1 (Mai et al., 2013). Além disso, a Bmp-2 não induz a diferenciação osteoblástica de células derivadas do osso medular humano na presença de um anticorpo que bloqueia a função da subunidade αv de integrina, sugerindo que integrinas que apresentam a subunidade αv são essenciais para o efeito osseoadutor de Bmp-2 (Lai & Cheng, 2005). Os resultados apresentados com CTMs de ratos mostraram o papel crucial da integrina $\alpha 1 \beta 1$ e, em CTMs humanas e células MC3T3-E1, foi identificada uma rede regulatória miR-SMAD-Bmp-2 que medeia a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia. Em conjunto, esses

resultados sugerem que a diferenciação osteoblástica induzida pela nanotopografia de Ti é orquestrada por um complexo mecanismo, baseado em uma comunicação entre as vias de sinalização da integrina $\alpha1\beta1$ e da Bmp-2, com uma participação crucial de miRs.

Por fim, a segunda parte deste estudo mostrou que a superfície de Ti nanotopografia direciona a diferenciação de CTMs humanas para a linhagem osteoblástica. Além disso, foram identificados 3 miRs, que agem sobre SMADs, com um papel crítico no efeito osseointegrador da superfície de Ti com nanotopografia sobre CTMs humanas. Pela regulação negativa de miR-4448, -4708 e 4773, a nanotopografia de Ti atenua a degradação de SMAD1 e SMAD4, intensificando a transdução do sinal de Bmp-2, estimulando diferenciação osteoblástica. Esse novo mecanismo, envolvendo um circuito miRs-SMAD-Bmp-2, que media a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia, e uma potencial comunicação com a via de sinalização da integrina $\alpha1\beta1$, abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de modificações de superfície de Ti com o objetivo de favorecer e/ou acelerar o processo de osseointegração.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicam que via de sinalização da integrina $\alpha 1\beta 1$ e que o circuito miR-4448,-4708 e -4773-SMAD 1 e 4-Bmp-2 exercem papel fundamental no efeito osseoadutor de superfície de Ti com nanotopografia.

7 REFERÊNCIAS

Albrektsson T, Johansson J. Quantified bone tissue reactions to various metallic materials with reference to the so-called osseointegration concept. *J Biomed Mater Res.* 1991; 2:357-363.

Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008; 14:275-283.

Annunziata M, Oliva A, Buosciolo A, Giordano M, Guida A, Guida L. Bone marrow mesenchymal stem cell response to nano-structured oxidized and turned titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23:733-740.

Bakhshandeh B, Hafizi M, Ghaemi N, Soleimani M. Down-regulation of miRNA-221 triggers osteogenic differentiation in human stem cells. *Biotechnol Lett.* 2012; 34:1579-1587.

Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Paylakhi SH, Ghaemi N. MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:7569-7581.

Ballo A, Agheli H, Lausmaa J, Thomsen P, Petronis S. Nanostructured model implants for in vivo studies: influence of well-defined nanotopography on de novo bone formation on titanium implants. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6:3415-3428.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281-297.

Beck GR Jr, Sullivan EC, Moran E, Zerler B. Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem.* 1998; 68:269-280.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.

Brammer KS, Oh S, Cobb CJ, Bjursten LM, van der Heyde H, Jin S. Improved bone-forming functionality on diameter-controlled TiO₂ nanotube surface. *Acta Biomaterials.* 2009; 5:3215-3223.

Bueno RB, Adachi P, Castro-Raucci LM, Rosa AL, Nanci A, de Oliveira PT. Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promotes production and extracellular accumulation of osteopontin. *Braz Dent J.* 2011; 22:179-184.

- Canalis E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem.* 2009; 108:769-777.
- Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J Cell Sci.* 2005; 118:1341-1353.
- 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.
- Chen Q, Liu W, Sinha KM, Yasuda H, de Crombrughe B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor osterix. *PLoS One.* 2013; 8:e58104-e58110.
- Chiu LH, Lai WF, Chang SF, Wong CC, Fan CY, Fang CL, Tsai YH. The effect of type II collagen on MSC osteogenic differentiation and bone defect repair. *Biomaterials.* 2014; 35:2680-2691.
- De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004; 25:403-413.
- De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 80:554-564.
- Deng Y, Bi X, Zhou H, You Z, Wang Y, Gu P, Fan X. Repair of critical-sized bone defects with anti-miR-31-expressing bone marrow stromal stem cells and poly (glycerol sebacate) scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2014; 15:13-25.
- Dong SW, Yang B, Guo HF, Kang F. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 418:587-591.
- Duchaine TF, Wohlschlegel JA, Kennedy S, Bei Y, Conte D Jr, Pang K, Brownell DR, Harding S, Mitani S, Ruvkun G, Yates JR 3rd, Mello CC. Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell.* 2006; 124:343-354.
- Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T, Calderwood SK. OstemiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2013; 8:e58796-e58802.
- Ekholm E, Hankenson KD, Uusitalo H, Hiltunen A, Gardner H, Heino J, Penttinen R. Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. *Am J Pathol.* 2002; 160:1779-1785.

Gams B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10:79-98.

Gaur T; Hussain S, Mudhasani R, Parulkar I, Colby JL, Frederick D, Kream BE, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Jones SN, Lian JB. Dicer inactivation in osteoprogenitor cells compromises fetal survival and bone formation, while excision in differentiated osteoblasts increases bone mass in the adult mouse. *Dev Biol.* 2010; 340:10-21.

Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:94-108.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285:1028-1032.

Goff LA, Boucher S, Ricupero CL, Fenstermacher S, Swerdel M, Chase LG. Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: Prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis. *Exp Hematol.* 2008; 36:1354-1369.

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.

Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone.* 2001; 28:174-181.

Hassan MQ, Gordon JAR, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a similar to 27a similar to 24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:19879-19884.

Hassan MQ, Maeda Y, Taipaleenmaki H, Zhang WB, Jafferji M, Gordon JAR. MiR-218 directs a WNT signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J Biol Chem.* 2012; 287:42084-42092.

Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 1998; 15:186-197.

He JY, Zheng XF, Jiang SD, Chen XD, Jiang LS. Sympathetic neuron can promote osteoblast differentiation through Bmp signaling pathway. *Cell Signal.* 2013; 26:298-310.

Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Sugita Y, Ueno T, Kojima N, Ogawa T. Effects of UV photofunctionalization on the nanotopography enhanced initial bioactivity of titanium. *Acta Biomater.* 2011; 7:3679-3691.

Hu R, Li H, Liu W, Yang L, Tan YF, Luo XH. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. *Expert Opin Ther Targets*. 2010; 14:1109-1120.

Huang RL, Yuan Y, Zou GM, Liu G, Tu J, Li Q. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits bmp-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling. *Stem Cells Dev*. 2014; 23:277-289.

Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010; 28:357-364.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 1987; 48:549-554.

Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, Iwasaki M, Sunamura S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Saito K, Nakamura T, Siomi H, Ito H, Arai Y, Shinomiya K, Takeda S. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:20794-20799.

Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J Biol Chem*. 2009; 284:19272-19279.

Jensen ED, Nair AK, Westendorf JJ. Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007; 17:187-196.

Jikko A, Harris SE, Chen D, Mendrick DL, Damsky CH. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by Bmp-2. *J Bone Miner Res*. 1999; 14:1075-1083.

Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. MiR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res*. 2009; 24:816-825.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89:755-764.

Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell Tissue Res*. 2010; 339:189-195.

Kureel J, Dixit M, Tyagi AM, Mansoori MN, Srivastava K, Raghuvanshi A, Maurya R, Trivedi R, Goel A, Singh D. MiR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. *Cell Death Dis*. 2014; 5:e1050-e1055.

Lai CF, Cheng SL. Alphavbeta integrins play an essential role in Bmp-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2005; 20:330-340.

Laine SK, Alm JJ, Virtanen SP, Aro HT, Laitala-Leinonen TK. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2012; 113:2687-2695.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The c-elegans heterochronic gene lin-4 encodes small rnas with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993; 75:843-854.

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; 284:15676-15684.

Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM. A microRNA signature for a Bmp-2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:13906-13911.

Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006; 7:1-16.

Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8:212-227.

Liston A, Linterman M, Lu LF. MicroRNA in the adaptive immune system, in sickness and in health. *J Clin Immunol.* 2010; 30:339-346.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta CT Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.

Liu Y, Liu Y, Zhang R, Wang X, Huang F, Yan Z, Nie M, Huang J, Wang Y, Wang Y, Chen L, Yin L, He B, Deng Z. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 47:47-56.

Lu Z, Zreiqat H. The osteoconductivity of biomaterials is regulated by bone morphogenetic protein 2 autocrine loop involving α 2 β 1 integrin and mitogen-activated protein kinase/extracellular related kinase signaling pathways. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16:3075-3084.

Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res.* 2008; 23:287-295.

Mai Z, Peng Z, Wu S, Zhang J, Chen L, Liang H, Bai D, Yan G, Ai H. Single bout short duration fluid shear stress induces osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via integrin β 1 and Bmp-2 signaling cross-talk. *PLoS One*. 2013; 8:e61600- e61612.

Marcinkiewicz C, Weinreb PH, Calvete JJ, Kisiel DG, Mousa SA, Tuszynski GP, Lobb RR. Obtustatin: a potent selective inhibitor of α 1 β 1 integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res*. 2003; 63:2020-2023.

Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. *In vivo* studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998; 13:17-29.

Mendonça G, Mendonça DB, Simões LG, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, Aragão FJ, Cooper LF. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials*. 2009; 30:4053-4062.

Mendonca G, Mendonca DBS, Aragao FJL, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology - From micron- to nanotopography. *Biomaterials*. 2008; 29:3822-3835.

Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2 β 1 integrin interaction. *J Cell Physiol*. 2000; 184:207-213.

Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol Cell Biol* 2011; 31:3019-3028.

Oh S, Brammer KS, Li YS, Teng D, Engler AJ, Chien S, Jin S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:2130-2135.

Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL, Chaudhri RA, Ornoy A, Boyan BD, Schwartz Z. Integrin α 2 β 1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:15767-15772.

Oskowitz AZ, Penfornis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, Prockop DJ, Pochampally R. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:18372-18377.

Owen T, Aronow M, Shalhoub V, Barone L, Wilming LM, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990; 143:420-430.

Palmieri A, Brunelli G, Guerzoni L, Lo Muzio L, Scarano A, Rubini C, Scapoli L, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci F. Comparison between titanium and anatase miRNAs regulation. *Nanomedicine* 2007; 3:138-143.

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* 2008A; 34:190-195.

Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, Lo Muzio L, Scarano A, Scapoli L, Martinelli M, Arlotti M, Guerzoni L, Rubini C, Carinci F. Short-period effects of zirconia and titanium on osteoblast microRNAs. *Clin Implant Dent Relat Res* 2008B; 10:200-205.

Park J, Bauer S, Schlegel KA, Neukam FW, von der Mark K, Schmuki P. TiO₂ nanotube surfaces: 15 nm – an optimal length scale of surface topography for cell adhesion and differentiation. *Small*. 2009; 5:666-671.

Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*. 1999; 20:2311-2321.

Ramis J, Taxt-Lamolle SF, Lyngstadaas SP, Reseland JE, Ellingsen JE, Monjo M. Identification of early response genes to roughness and fluoride modification of titanium implants in human osteoblasts. *Implant Dent*. 2012; 21:141-149.

Reddi AH, Cunningham NS. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *J Bone Miner Res*. 1993; 8 Suppl 2:S499-S502.

Rosen V. Bmp-2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:475-480.

Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Integrin-associated tyrosine kinase FAK affects Cbfa1 expression. *J Orthop Res*. 2011; 29:1443-1447.

Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Aldred SF. Functional profiling reveals critical role for mirna in differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos One*. 2009; 4:e9678-e9685.

Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res Part B-Appl Biomater*. 2009; 88B:544-557.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NHJ. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J Dent Res*. 2006; 85:496-500.

Shekaran A, García AJ. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 96:261-272.

Siebers MC, ter Brugge PJ, Walboomers XF, Jansen JA. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials*. 2005; 26:137-146.

Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996; 76:593-629.

Stein GS, Zaidi SK, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Montecino M, Young DW, Javed A, Pratap J, Choi JY, Ali SA, Pande S, Hassan MQ. Transcription-factor-mediated epigenetic control of cell fate and lineage commitment. *Biochem Cell Biol*. 2009; 87:1-6.

Sykaras N, Iacopino AM, Marker VA, Triplett RG, Woody RD. Implant materials, designs, and surface topographies: Their effect on osseointegration. A literature review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000; 15:675-690.

Taipaleenmaki H, Hokland LB, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166:359-371.

Tavares MG, de Oliveira PT, Nanci A, Hawthorne AC, Rosa AL, Xavier SP. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H₂SO₄/H₂O₂ enhances contact osteogenesis. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18:452-458.

Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepulveda JC, Fernandez-Gutierrez B, Dopazo A. MiR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2011; 18:985-995.

Tran N, Webster TJ. Nanotechnology for bone materials. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2009; 1:336-351.

Variola F, Yi J-H, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials*. 2008; 29:1285-1298.

Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi JH, 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; 9:659-665.

Vimalraj S, Selvamurugan N. MicroRNAs: Synthesis, Gene Regulation and Osteoblast Differentiation. *Curr Issues Mol Biol*. 2013; 15:7-18.

Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003; 24:2133-2151.

Wang T, Xu Z. MiR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 402:186-189.

Wang W, Zhao L, Wu K, Ma Q, Mei S, Chu PK, Wang Q, Zhang Y. The role of integrin-linked kinase/ β -catenin pathway in the enhanced MG63 differentiation by micro/nano-textured topography. *Biomaterials*. 2013; 34:631-640.

Watari S, Hayashi K, Wood JA, Russell P, Nealey PF, Murphy CJ, Genetos DC. Modulation of osteogenic differentiation in hMSCs cells by submicron topographically-patterned ridges and grooves. *Biomaterials*. 2012; 33:128-136.

Wazen RM, Kuroda S, Nishio C, Sellin K, Brunski JB, Nanci A. Gene expression profiling and histomorphometric analyses of the early bone healing response around nanotextured implants. *Nanomedicine* 2013; doi:10.2217/nnm.12.167.

Wei J, Shi Y, Zheng L, Zhou B, Inose H, Wang J, Guo XE, Grosschedl R, Karsenty G. MiR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. *J Cell Biol*. 2012; 197:509-521.

Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the α 2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem*. 1998; 273:32988-32994.

Yan YX, Gong YW, Guo Y, Lv Q, Guo C, Zhuang Y, Zhang Y, Li R, Zhang XZ. Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One*. 2012; 7:e35709-e35715.

Yi J-H, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. *Surf Sci* 2006; 600:4613-4621.

Yu WQ, Jiang XQ, Zhang FQ, Xu L. The effect of anatase TiO₂ nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 94:1012-1022.

Zhang Y, Xie RL, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:9863-9868.

Zimmerman D, Jin F, Leboy P, Hardy S, Damsky C. Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. *Dev Biol.* 2000; 220:2-15.

Zuo J, Huang X, Zhong X, Zhu B, Sun Q, Jin C, Quan H, Tang Z, Chen W. A comparative study of the influence of three pure titanium plates with different micro- and nanotopographic surfaces on preosteoblast behaviors. *J Biomed Mater Res A*; 2013; 130:1145-1154.

APÊNDICE

Tabela 1. Sequência de primers para reação de PCR em tempo real

Gene	Espécie	Sequência sense Sequência anti-sense
Runx2	Rato	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA
ColIA1	Rato	CCAACGAGATCGAGCTCAGG GACTGTCTTGCCCAAGTTCC
Alp	Rato	CCAACCTCATTTGTGCCAGAG CAGGGCATTITTTCAAGGTCTC
Oc	Rato	GCAGACACCATGAGGACCCT CCGGAGTCTATTACCACCTTACTG
Bsp	Rato	CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT GCTAGCGGTTACCCCTGAGA
Bmp-4	Rato	CGCAGCTTCTCTGAGCCTTTCCA ACGACCATCAGCATTTCGGTTACCAG
Integrina α 1	Rato	GCAACCGGAAGCGAGAGCTGG TAGCAGCAGTAGCCCCGCGA
Integrina β 1	Rato	GCAGGCGTGGTTGCCGGAAT TTTTACCCGTGTCCCCTTGGC
β -Actina	Rato	AAATGCTTCTAGGCGGACTG GGTTTTGTCAAAGAAAGGGTG
Runx2	Humano	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA
COL1A1	Humano	CCACAAAGAGTCTACATGTCTAGGGTC GTCATCGCACAAACACCTTGC
Alp	Humano	ACGTGGCTAAGAATGTCATC CTGGTAGGCGATGTCCTTA
Oc	Humano	CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC TCACAGTCCGGATTGAGCTCA
Opn	Humano	AGGCATCACCTGTGCCATAC TCTGGGTATTTGTTGTAAAGCTGC
Bmp-2	Humano/Camundongo	TTGCGCCAGGTCCTTTGACCAG GCAACGCTAGAAGACAGCGGGT GGGACCCGCTGTCTTCTAGT TCAACTCAAATTCGCTGAGGAC
SMAD1	Humano/Camundongo	CCATGGATTTGAGACAGTCTATGAG AGTAACATCCTGGCGGTGGT ACGGGTTTCGAGACCGTGTAT CATCCTGCCGGTGGTATTCTG
SMAD4	Humano/Camundongo	CTGGCCCAGGATCAGTAGGT AGCGACGAAGGTCATCAACA TGGGTCCGTGGGTGGAATA GAGGTCATCCACACCGATGC
β -Actina	Humano	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG
GAPDH	Camundongo	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
miR-4448	Humano/Camundongo	GGCTCCTTGGTCTAGGGGTA
miR-4708	Humano/Camundongo	AGCAAGCGGCATCTCTCTGAT
miR-4773	Humano/Camundongo	CAGAACAGGAGCATAGAAAGGC
U6	Humano/Camundongo	CACGAATTTGCGTGTATCCTT

Fator de transcrição relacionado ao runt 2 (Runx2), colágeno tipo I alpha 1 (ColIA1), fosfatase alcalina (Alp), osteocalcina (Oc), sialoproteína óssea (Bsp) osteopontina (Opn), proteína óssea morfogenética 4 (Bmp-4), proteína óssea morfogenética 2 (Bmp-2), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), integrina α 1, integrina β 1, β -actina, SMAD1, SMAD4, miR-4448, miR-4708, miR-4773, U6.

ANEXOS

Os resultados da presente tese foram utilizados para a preparação dos seguintes artigos:

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha 1 \beta 1$ integrin signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2014; 115:540-548.

Kato RB, Roy B, de Oliveira FS, Ferraz EP, de Oliveira PT, Kemper AG, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. *J Cell Physiol.*

Aceito para publicação em 12/03/2014.