UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA (PERIODONTIA)
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA BUCO-MAXILO-FACIAL

HEITOR FONTES DA SILVA

PARTICIPAÇÃO DE QUINASES REGULADAS POR SINAIS EXTRACELULARES NA INTERAÇÃO
ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E TITÂNIO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOBLÁSTICA E ADIPOCÍTICA

Ribeirão Preto

2016

HEITOR FONTES DA SILVA

**PARTICIPAÇÃO DE QUINASES REGULADAS POR SINAIS EXTRACELULARES NA INTERAÇÃO
ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E TITÂNIO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO
OSTEOBLÁSTICA E ADIPOCÍTICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), área de concentração Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti.

Ribeirão Preto

2016

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

Silva, Heitor Fontes da

Participação de quinases reguladas por sinais extracelulares na interação entre células-tronco mesenquimais e titânio durante a diferenciação osteoblástica e adipocítica. Ribeirão Preto, 2016.

53p.:il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia). Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

1. Nanotopografia. 2. Titânio. 3. ERKs. 4. Células-tronco mesenquimais.
5. Osteoblastos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Heitor Fontes da Silva

Participação de quinases reguladas por sinais extracelulares na interação entre células-tronco mesenquimais e titânio durante a diferenciação osteoblástica e adipocítica.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), área de concentração Cirurgia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

*À minha família, meus avós, meus pais e minhas
queridas irmãs, pelo apoio incondicional e
carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar saúde, coragem e força para caminhar e nunca desistir dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pela oportunidade de trabalharmos juntos, de aprender diversos conhecimentos da cultura de células e biologia molecular, de vivenciar o carinho no manuseio de escritas científicas e pela paciência na orientação. Levarei para minha carreira acadêmica os seus ensinamentos.

A todos os professores que convivi durante o Mestrado: Dr. Adalberto Luiz Rosa, Dr. Alexandre Elias Trivellato, Dr. Cássio Edvard Sverzut, Dr. Paulo Tambasco de Oliveira e Dr. Samuel Porfirio Xavier, por todo aprendizado em atividades práticas e teóricas durante as disciplinas.

A Priscilla Neves Raile, por todo carinho, apoio, respeito e acolhimento em sua família. Eu te admiro cada vez mais e sinto-me privilegiado em te namorar. Você é uma peça fundamental para concretização desta etapa em minha vida, te amo.

Aos funcionários Roger Rodrigo Fernandes, Milla Sprone Tavares e Fabíola Singaretti de Oliveira, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos e colaboração neste trabalho.

A Larissa Moreira Spínola de Castro-Raucci, por todo o carinho em mostrar todas as técnicas laboratoriais que eu necessitaria aprender para o desenvolvimento desta dissertação de mestrado.

A Rodrigo Abuná Paolo Flores e Helena Bacha Lopes, esses realmente acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho e meu sincero muito obrigado.

Aos amigos que ingressaram comigo no mestrado: Daniel Galvão Costa, Guilherme Spagnol, Rafael Tajra e Erick Silva, por todas as cirurgias que realizamos e aprendemos durante as atividades do PAE.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realizar um mestrado através de auxílio financeiro e concessão de bolsa.

Aos professores e amigos, Dr. Paulo Ricardo Saquete Martins-Filho e Thiago de Santana Santos (Universidade Federal de Sergipe), que sempre me estimularam à docência, à realização de residência em CTBMF. Vocês sabem que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Ao Hospital Instituto Dr. José Frota (IJF-CE) hospital em que pude trabalhar por 3 anos (2011-2014) durante a residência em CTBMF e estimular-me à continuar meus estudos através dos ensinamentos dos nossos queridos “staffs”, Dr. Manoel Jesus de Rodrigues Mello e Dra. Andréa Sílvia Walter de Aguiar (Universidade Federal do Ceará).

Às 87º e 88º turmas de Odontologia da FORP-USP pela possibilidade de acompanhar os primeiros passos na Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e à 85º turma através das diversas amizades que construímos.

À “República Descarregada” pela experiência de vivenciar morar em uma habitação coletiva, bem como os momentos de descontração. Em especial ao Yan Kawabe e Patrick Osborne, continuem brilhando em suas profissões.

E todos que fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional durante esse período (2014-2016) através do Laboratório de Cultura de Células e Biologia Molecular, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

*“A vida me ensinou a nunca desistir.
Nem ganhar, nem perder mas procurar
evoluír...”*

(Chorão- Charlie Brown Jr.)

RESUMO

SILVA, HF. Participação de quinases reguladas por sinais extracelulares na interação entre células-tronco mesenquimais e titânio durante a diferenciação osteoblástica e adipocítica. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2016.

A osseointegração de implantes de titânio (Ti) é dependente da interação entre a superfície de Ti e células, a qual é modulada por diversas vias de sinalização intracelular. Sabe-se que as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), atuam tanto na osteogênese, quanto na adipogênese e, portanto, podem estar envolvidas no processo de osseointegração de Ti. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a interação entre células-tronco mesenquimais (CTMs) e superfícies de Ti usinada e com nanotopografia é modulada, ao menos em parte, por ERK1/2 e o consequente efeito da inibição dessas ERKs na diferenciação osteoblástica e adipocítica. Para isso, CTMs derivadas de medula óssea de ratos foram cultivadas sobre discos de Ti usinados e com nanotopografia em condições osteogênicas e adipogênicas, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059, em concentração previamente determinada (25 μ M) e foram avaliados parâmetros relacionados à diferenciação osteoblástica e adipocítica. Os resultados mostraram que a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos RUNX2, osterix (OSX), fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OC) foi aumentada pela inibição da via de sinalização de ERK1/2 nas células crescidas sobre Ti usinado e apenas ALP e OC, naquelas crescidas sobre Ti com nanotopografia. A expressão proteica de RUNX2 foi discretamente maior nas células crescidas sobre Ti usinado, mas não sobre Ti com nanotopografia, quando ERK1/2 foram inibidas e essa inibição não afetou a formação de matriz extracelular mineralizada, independentemente da superfície de Ti avaliada. Com relação à diferenciação adipocítica, a inibição da via de sinalização de ERK1/2 aumentou a expressão gênica dos marcadores adipocíticos PPAR γ , adiponectina (ADIPOQ) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (AP2) nas células crescidas sobre ambas as superfícies de Ti, com efeito mais acentuado na superfície usinada, sem afetar a formação de acúmulo lipídico. Em conclusão, os resultados mostraram que a inibição de ERK1/2 favoreceu a diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre a superfície de Ti usinada, mas não sobre Ti com nanotopografia. Além disso, a inibição de ERK1/2 favoreceu a diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre as superfícies de Ti com nanotopografia e usinada, sendo o efeito mais acentuado na usinada. Considerando aplicações terapêuticas, esses resultados são relevantes para direcionar o desenvolvimento de superfícies de biomateriais que atuem em vias de sinalização que sabidamente modulam o processo de osteogênese.

Palavras chave: Nanotopografia; Titânio; ERKs; Células-tronco mesenquimais; Osteoblastos.

ABSTRACT

SILVA, HF. Participation of extracellular signal-regulated kinases in mesenchymal stem cells and titanium interaction during osteoblast and adipocyte differentiation. [Masters Degree]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2016.

Osseointegration of titanium (Ti) implants depends on interaction between Ti surface and cells, which is modulated by several intracellular signaling pathways. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) are members of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family and act on both osteogenesis and adipogenesis and, therefore, may be involved in the process of Ti osseointegration. In this context, the aim of this study was to evaluate if the interaction between mesenchymal stem cells (MSCs) and Ti surfaces, either machined or with nanotopography, is modulated, at least in part, by ERK1/2 and the effect of ERK1/2 inhibition on osteoblast and adipocyte differentiation. Rat bone marrow MSCs were cultured on Ti discs either machined or with nanotopography under osteogenic and adipogenic conditions, in presence or not of the ERK1/2 inhibitor, PD98059, at a concentration previously determined (25 μ M) and it was evaluated parameters related to osteoblast and adipocyte differentiation. The results showed that gene expression of the bone markers RUNX2, osterix (OSX), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) was increased by ERK1/2 signaling inhibition in cells grown on machined Ti and only ALP and OC in cells grown on Ti with nanotopography. RUNX2 protein expression was slightly higher in cells grown on machined Ti, but not on Ti with nanotopography, when ERK1/2 signaling was inhibited and such inhibition did not affect extracellular matrix mineralization, irrespective of the evaluated Ti surface. Regarding adipocyte differentiation, ERK1/2 signaling inhibition increased gene expression of the adipose tissue markers PPAR γ , adiponectin (ADIPOQ) and adipocyte fatty acid-binding protein (AP2) in cells grown on both Ti surfaces, with more prominent effect on machined one, without affecting lipid accumulation. In conclusion, our results showed that ERK1/2 signaling inhibition favored osteoblast differentiation of MSCs grown on machined Ti, but not on Ti with nanotopography. In addition, ERK1/2 signaling inhibition favored adipocyte differentiation of MSCs grown on both Ti surfaces, being more noticeable on machined one. Considering therapeutical applications, these results are relevant to drive the development of biomaterial surfaces to act on signaling pathways that regulate the process of osteogenesis.

Key-words: Nanotopography; Titanium; ERKs; Mesenchymal stem cells; Osteoblasts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura em alta resolução das superfícies de Ti-usinado (A) e Ti-nano. O Ti-usinado apresentou uma superfície lisa, enquanto o Ti-nano apresentou uma rede de nanoporos (B). Barra de escala: A,B= 200 μm 28
- Figura 2.** Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos: RUNX2 (A), osterix (B), fosfatase alcalina (C) e osteocalcina (D) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)30
- Figura 3.** Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos: RUNX2 (A), osterix (B), fosfatase alcalina (C) e osteocalcina (D) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)31
- Figura 4.** Expressão proteica de RUNX2 em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado (A) e Ti-nano (B), na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 10 dias33
- Figura 5.** Formação de matriz extracelular mineralizada em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado e Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 21 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e o asterisco indica diferença estatisticamente significativa entre Ti-nano na presença ou não de PD98059 ($p \leq 0,05$).....35
- Figura 6.** Expressão gênica dos marcadores adipocíticos, PPAR γ (A), adiponectina (B) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (AP2, C) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-usinado, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa dentro de cada superfície de Ti-usinado ($p \leq 0,05$)37
- Figura 7.** Expressão gênica dos marcadores adipocíticos, PPAR γ (A), adiponectina (B) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (AP2, C) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa dentro de cada superfície de Ti-nano ($p \leq 0,05$)38
- Figura 8.** Formação de acúmulo lipídico em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-usinado e Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μM), aos 21 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa dentro de cada superfície de Ti, usinado ou nano ($p > 0,05$)40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Preparo dos discos de Ti	19
3.2 Obtenção e cultura de CTMs de ratos	19
3.3 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti	20
3.3.1 Cultura de CTMs em condições osteogênicas	20
3.3.2 Análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real	21
3.3.3 Análise da expressão proteica de RUNX2 por <i>Western blot</i>	22
3.3.4 Detecção da formação de matriz mineralizada por vermelho de Alizarina S	24
3.4 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti	24
3.4.1 Cultura de CTMs em condições adipogênicas	24
3.4.2 Análise da expressão gênica de marcadores adipocíticos por PCR em tempo real	25
3.4.3 Detecção de acúmulo lipídico por Óleo vermelho O	25
3.5 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Caracterização das superfícies de Ti por MEV	27
4.2 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti	29
4.2.1 Expressão gênica de marcadores osteoblásticos	29
4.2.2 Expressão proteica de RUNX2	32
4.2.3 Detecção de matriz extracelular mineralizada	34
4.3 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti	36
4.3.1 Expressão gênica de marcadores adipocíticos	36
4.3.2 Detecção de acúmulo lipídico	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45
8 ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, várias vias regulatórias envolvidas na diferenciação osteoblástica e adipocítica foram descobertas por estudos moleculares e genéticos (CANALIS, 2009; MILAT e NG, 2009; ROSEN, 2009; KOMORI, 2010; GUIHARD et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2012; JOSHI et al., 2013; ZEE et al., 2013; ABUNA et al., 2016). Fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras e modificadores de estrutura de cromatina exercem papel fundamental nos mecanismos regulatórios da osteogênese e da adipogênese (LIAN et al., 2006; JENSEN et al., 2007; STEIN et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2012; ZHANG et al., 2012; JOSHI et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2013; YUE et al., 2016). O fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2) é o principal regulador da diferenciação osteoblástica e atua ligando-se ao DNA em diferentes genes-alvo e interagindo diretamente com diferentes classes de proteínas co-reguladoras envolvidas no processo de osteogênese (LIAN et al., 2006; JENSEN et al., 2007; STEIN et al., 2009; HASSAN et al., 2010; KUMAR et al., 2015). Já a adipogênese tem como principal modulador o fator de transcrição receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) que interage com proteínas co-reguladoras da diferenciação adipocítica (BRUN et al., 1996; AGUILAR et al., 2010; COUTURE et al., 2012; LI et al., 2016). Entre estas proteínas co-reguladoras, estão as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que atuam tanto na osteogênese, quanto na adipogênese (LIN et al., 2011; LIM et al., 2012; WU et al., 2012; MAHALINGAM et al., 2013; TURPIN et al., 2013; LEE et al., 2015; GE et al., 2016).

As vias de sinalização das MAPKs controlam diversos eventos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e morte celular (KESHET e SEGER, 2010). Cada uma das cascatas de sinalização consiste de várias proteínas que ativam umas às outras sequencialmente por fosforilação (LIN et al., 2011). As quatro cascatas de MAPKs são classificadas de acordo com o subgrupo de seus componentes MAPK em (1) ERKs, (2) quinase c-Jun terminal-N (JNK), (3) p38MAPK e (4) ERK5

(BOULTON et al., 1991; KYRIAKIS et al., 1994; ROUSE et al., 1994; ZHOU et al., 1995). As diferentes vias de sinalização apresentam efeitos fisiológicos distintos, sendo que as ERKs estão envolvidas em eventos de proliferação e diferenciação, as JNK e p38 respondem principalmente ao estresse e atuam na apoptose e a ERK5 transmite sinais mitogênicos e de estresse (KESHET e SEGER, 2010; YAN et al., 2012).

Dois genes distintos codificam as duas isoformas da proteína ERK, ERK1 (44 kDa) e ERK2 (42 kDa) e pelo fato de apresentarem alto grau de similaridade, podem ser consideradas funcionalmente redundantes, embora diferenças na especificidade por substratos tenham sido relatadas (SEGER e KREBS, 1995). As ERKs são ativadas, adquirindo a forma fosforilada (p-ERK), por diversos agentes extracelulares, incluindo fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores (ZHANG e LIU, 2002; NIGER et al., 2012). Os fatores extracelulares podem atuar sobre receptores acoplados à proteína G, receptores tirosina-quinase e canais iônicos e iniciar diversas sinalizações intracelulares que resultam na fosforilação, ou seja, na ativação das ERKs (RANE, 1999; NAOR et al., 2000; MARMOR et al., 2004). Estas proteínas quando ativadas fosforilam centenas de substratos no citoplasma e no núcleo celular, quando translocadas (CHUDERLAND e SEGER, 2005). A maioria das interações das ERKs ocorre com proteínas regulatórias e fatores de transcrição, entre os quais RUNX2 e PPAR γ , essenciais para o desenvolvimento dos fenótipos osteoblástico e adipocítico, respectivamente (RUBINFELD e SEGER, 2005; BURGERMEISTER et al., 2007; CHAU et al., 2009; GE et al., 2009; WANG et al., 2010).

O envolvimento das ERKs no comprometimento de células precursoras com a diferenciação osteoblástica está bem estabelecido. Foi relatado que as ERKs regulam positivamente o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico de células-tronco mesenquimais de medula óssea e de tecido adiposo (JAISWAL et al., 2000; SALASZNYK et al., 2004; LIU et al., 2009). Além disso, foi observado que uma baixa fosforilação das ERKs reduz a diferenciação osteoblástica de CTMs de medula óssea (ZHENG et al., 2007). O papel das ERKs no controle da diferenciação osteoblástica é,

muito provavelmente, mediado por RUNX2, visto que as ERKs podem fosforilar RUNX2 e essa fosforilação está associada a um aumento de sua atividade de transcrição em condições experimentais *in vitro* e *in vivo* (GE et al., 2007). Assim como para a osteogênese, as vias de sinalização das ERKs são também importantes para a adipogênese. A fosforilação do PPAR γ por ERKs resulta em redução da atividade de transcrição do PPAR γ em situações *in vitro* e *in vivo* (HU et al., 1996; ADAMS et al., 1997). Fatores de crescimento e citocinas que ativam as MAPKs são potentes inibidores da diferenciação adipocítica (TORTI et al., 1989; SERRERO e MILLS, 1991; BERG et al., 1994). Além disso, foi relatada uma diferença no padrão de fosforilação das ERKs entre osteogênese e adipogênese em culturas de CTMs de medula óssea (JUNG et al., 2011). As ERKs estão ativadas durante todo o processo de diferenciação osteoblástica, mas esta atividade é reduzida à medida que o processo de diferenciação adipocítica avança, indicando que esta queda da ativação das ERKs é necessária para a maturação dos adipócitos (JUNG et al., 2011).

Os resultados da literatura descritos previamente indicam que as ERKs exercem papel fundamental no controle do equilíbrio entre osteogênese e adipogênese. Alterações neste equilíbrio estão relacionadas ao envelhecimento e a doenças como a osteoporose e a osteopenia, em que uma redução na formação óssea é acompanhada de um aumento no volume de tecido adiposo (JAISWAL et al., 2000). A formação óssea é parte essencial do processo de osseointegração de implantes de titânio (Ti) e pode ser afetada por desequilíbrios nos processos de diferenciação osteoblástica e adipocítica que são regulados, pelo menos em parte, pelas ERKs.

O biomaterial mais frequentemente usado para a fabricação de implantes é o Ti por apresentar excelentes propriedades mecânicas e biológicas (BRANEMARK et al., 1977; ALBREKTSSON et al., 1981; TEIXEIRA et al., 2012). Sabe-se que a proporção de contato direto entre osso e Ti é influenciada por parâmetros clínicos, como condições do leito hospedeiro, técnica cirúrgica e utilização de carga, e por características do implante, como a topografia e a química de superfície (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 1991). Alguns estudos mostraram que associações de topografias nas escalas micro e

submicrométrica, entre 100-150 nm e menores do que 1 μm (ROSEI, 2004), favorecem a proliferação celular e a mineralização da matriz extracelular (TAN e SALTZMAN, 2004; ZINGER et al., 2004; WIELAND et al., 2005). Além disso, observou-se que características nanotopográficas de biomateriais estimulam a formação óssea em contato com o implante (BERGLUNDH et al., 2007; MEIRELLES et al., 2008). Tais achados têm chamado a atenção de pesquisadores para os efeitos biológicos de nanotopografias sobre diferentes células e tecidos, incluindo o tecido ósseo (STEVENS e GEORGE, 2005; LORD et al., 2010; VARIOLA et al., 2011; GITTENS et al., 2013). Superfícies de Ti com nanotopografia podem ser obtidas por um método simples, baseado em desoxidação e reoxidação controladas, por meio de condicionamento químico com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (VARIOLA et al., 2008). A nanotopografia obtida aumenta a expressão das proteínas sialoproteína óssea e osteopontina (DE OLIVEIRA e NANJI, 2004; BUENO et al., 2011) e acelera e/ou aumenta a formação de nódulos de matriz mineralizada, comparada à superfície usinada (DE OLIVEIRA et al., 2007).

O entendimento dos mecanismos pelos quais superfícies com nanotopografia atuam sobre células osteoblásticas modulando a diferenciação e a mineralização da matriz extracelular é relevante para o desenvolvimento de novas terapias voltadas para o favorecimento dos processos de regeneração óssea e osseointegração. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que as vias de sinalização de integrinas e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) estão envolvidas no potencial osteogênico da nanotopografia (KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016). Somado a este entendimento e considerando que as ERKs modulam o equilíbrio entre osteogênese e adipogênese, é plausível a elaboração da hipótese de que o efeito osteogênico da superfície de Ti com nanotopografia é, pelo menos parcialmente, devido à modulação das interações ERK/RUNX2/PPAR γ e, conseqüentemente, ao efeito no desenvolvimento dos fenótipos osteoblástico e adipocítico de CTMs de medula óssea de ratos. De fato, alguns estudos mostraram alterações na ativação das ERKs em linhagens osteoblásticas de humanos e de camundongos crescidas sobre biomateriais como hidroxiapatita, tricálcio fosfato-beta e Ti (HATA et al., 2007; SEO et al., 2007; SONG et al., 2008; LU e

ZREIQAT, 2010). No entanto, a literatura é ainda incipiente e não se conhece a relação entre características de superfície e equilíbrio entre diferenciação osteoblástica e adipocítica regulado por ERKs.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar se a interação entre CTMs de medula óssea de ratos e superfícies de Ti usinada e com nanotopografia é modulada, pelo menos em parte, por ERK1/2 e o consequente efeito da inibição dessas ERKs na diferenciação osteoblástica e adipocítica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo dos discos de Ti

Discos de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil), foram polidos em uma ordem crescente de granulação de folhas de lixas (320 e 600) e lavados com tolueno em ultrassom. Os discos denominados como “Ti-nano” foram submetidos a condicionamento em solução de H_2SO_4 10 N e H_2O_2 30% por 4 horas à temperatura ambiente, sob agitação constante para obtenção da nanotopografia (DE OLIVEIRA et al., 2007; RICHERT et al., 2008; VARIOLA et al., 2008). Os discos denominados como “Ti-usinado” não foram submetidos a tratamento de superfície posterior ao tratamento com lixas. Todos os discos foram lavados em água destilada, autoclavados e secos ao ar. Para a confirmação da produção das topografias distintas de superfície, os discos de Ti foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Inspect S50 (FEI Company, EUA) operado a 25 kV. Foram utilizados 160 discos de Ti-nano e 160 discos de Ti-usinado, totalizando 320 discos por experimento realizado.

3.2 Obtenção e cultura de CTMs de ratos

O estudo foi conduzido com células obtidas de 9 ratos machos da linhagem Wistar pesando entre 120 e 150 g e todos os procedimentos foram realizados em acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-FORP/USP, Processo 2015.1.163.58.5). Os animais foram sacrificados com dose excessiva de tribromoetanol e os fêmures foram cirurgicamente removidos, acondicionados em meio de transporte constituído por Meio Essencial Mínimo modificação alfa (alfa-MEM, Gibco-Life Technologies, EUA), suplementado com 500 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 $\mu\text{g/mL}$ de fungisona (Gibco-Life Technologies), transferidos para a capela de fluxo laminar e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos previamente ao isolamento das células.

As epífises dos fêmures foram removidas e as CTMs foram obtidas por lavagem do canal medular das diáfises com meio de cultura constituído por alfa-MEM (Gibco-Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 µg/mL de fungisona (Gibco-Life Technologies), denominado meio de expansão. As células obtidas foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA) em meio de expansão até a subconfluência da cultura primária. Foi então adicionada solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies) e EDTA a 1 mM (Gibco-Life Technologies) para obtenção da suspensão de células que foi utilizada nos experimentos descritos abaixo. A progressão foi avaliada em microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Zeiss, Alemanha). Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas e durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.3 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti

3.3.1 Cultura de CTMs em condições osteogênicas

Após a subconfluência da cultura primária e obtenção da suspensão de células (descrito em 3.2 *“Obtenção e cultura de CTMs de ratos”*), estas foram plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/poço, em placas de poliestireno (Corning Incorporated) em meio osteogênico contendo os discos de Ti (Ti-usinado e Ti-nano) com ou sem o agente inibidor da via de sinalização das ERK1/2, o PD98059 na concentração de 25 µM (LIU et al., 2009). O meio osteogênico foi composto por meio de expansão suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich, EUA) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma-Aldrich). A diferenciação osteoblástica das culturas osteogênicas foi avaliada pela análise da expressão gênica de RUNX2,

osterix (OSX), fosfatase alcalina (ALP) e osteocalcina (OC), por PCR em tempo real aos 10 dias, expressão proteica de RUNX2 por Western blot aos 10 dias e coloração da matriz mineralizada com vermelho de Alizarina S aos 21 dias.

3.3.2 Análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real

A expressão gênica de RUNX2, OSX, ALP e OC de células crescidas sobre Ti-usinado e Ti-nano foi avaliada por PCR em tempo real. Foi realizada a extração do RNA total através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado a partir de 1 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma). O gel foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco) em 144 mL de água previamente tratada com DEPC. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 65°C e, então, foram adicionados 20 mL de tampão de corrida (10X) (50 mM acetato de sódio, Merck, Alemanha; 5 mM EDTA, Merck; 100 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico, MOPS, Sigma) e 36 mL de formaldeído a 12,3 M (Merck). A mistura foi despejada em fôrmas adequadas para moldagem do gel.

Para o preparo das amostras, foram adicionados para um volume final de 10 µL, 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida (5X), 3,5 µL de formaldeído a 12,3 M e formamida para completar o volume de 10 µL (Merck). Esta mistura foi aquecida a 85°C por 10 minutos e, em seguida, submetida a resfriamento a 4°C. No momento de aplicação das amostras no gel, foram adicionados 2 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL, Sigma). A eletroforese foi conduzida a 80 Volts durante 1 a 3 horas, utilizando-se tampão de corrida 1X. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta (UV) a 300 nm. A caracterização de mRNA de boa qualidade foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características nos eucariotos (18S e 28S).

A partir de 1 µg de RNA total foi confeccionada a fita de cDNA utilizando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, sendo o volume final desta reação de 20 µL. Em seguida, foram adicionados 520 µL de água DNase-free no tubo contendo o cDNA sintetizado previamente e 540 µL do TaqMan Fast Advanced Master Mix (Invitrogen-Life Technologies). As reações de PCR em tempo real para a quantificação da expressão gênica foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Invitrogen-Life Technologies) no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 µL contendo 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 1,125 ng/µL 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 método comparativo do valor do ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) e os dados foram normalizados pelo gene constitutivo β -Actina e pelo Ti-usinado.

3.3.3 Análise da expressão proteica de RUNX2 por Western blot

A expressão proteica de células crescidas sobre Ti-usinado e Ti-nano foi avaliada por Western blot. As células foram tratadas com tampão RIPA (NaCl a 150 mM, Sigma; NP40 a 10%, Sigma; $C_{24}H_{39}O_4Na$ a 0,5%, Sigma; SDS a 0,1%, Sigma e Tris base a 50 mM, pH 8, Roche, EUA) e lisadas em ultrassom (Misonix, EUA; 5 pulsos com intensidade 10 por 10 segundos, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso). A quantidade de proteína foi quantificada no aparelho NanoVue (Ge Healthcare) utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Foram preparados géis de acrilamida a 8,5% (para um volume final de 10 mL - 2,84 mL de acrilamida, 2,60 mL de tampão – Tris a 1,5% e SDS a 0,4%, pH 8,8

–, 4,8 mL de água destilada, 10 µL de Temed e 75 µL de persulfato de amônia a 10%, National Diagnostics, EUA). Os géis foram montados em aparato próprio e foi adicionado tampão de corrida 1X (3,01 g de Tris base, Roche; 14,4 g de glicina, USB Corporation, EUA; e 1 g de SDS, Sigma; para um volume final de 1 L de água destilada). Amostras contendo aproximadamente 40 µg de proteína em 20 µL foram misturadas com 5 µL de *dye* 6X (7 mL de Tris base pH 6,8, Roche; 3 mL de glicerol, Sigma; 1 g de SDS, Sigma; 0,93 g de DTT, Sigma; 1,2 mg de bromofenol, Sigma em um volume final de 10 mL de água destilada) e mantidas em banho em água em ebulição por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas nos géis e a separação das proteínas foi feita com o aparato funcionando em 150 Volts por aproximadamente 1 hora. Para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um marcador (Bio-Rad, EUA) que identifica bandas entre 10 e 250 kDa. As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de PVDFE (Thermo Scientific, EUA), usando aparato adequado funcionando em 12 Volts por 45 minutos. As membranas passaram por três incubações de 1 hora à temperatura ambiente, sendo (1) solução de leite desnatado a 5% em TBS-T (2.43 g de Tris, (Roche); 8 g de NaCl, (Sigma); e 1 mL de *Tween 20* em um volume final de 1 L de água destilada e ajustando o pH final em 7,6) para bloqueio de sítios inespecíficos; (2) o anticorpo primário: anti-RUNX2 (MBL - Milipore, EUA); diluído em solução de leite desnatado a 5% em TBS-T e (3) anticorpo secundário (IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology), adequado a este anticorpo primário do RUNX2, diluído em solução de leite desnatado a 2% em TBS-T. Entre as incubações com anticorpo primário e secundário e ao final da incubação com anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T. Foi feita uma lavagem de 1 minuto com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, EUA) e as membranas foram analisadas no aparelho G-Box (Syngene, EUA) que detecta a luminescência das bandas marcadas referentes às proteínas de interesse. Ao final do processo, as membranas foram incubadas em solução Re-blot plus mild (Milipore), à temperatura ambiente por 20 minutos, para a remoção dos anticorpos primário e secundário e foram submetidas ao mesmo processo descrito previamente para Western blot, usando anticorpo primário anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) e

anticorpo secundário (IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology). A expressão de RUNX2 foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH.

3.3.4 Detecção da formação de matriz mineralizada por vermelho de Alizarina S

Culturas osteogênicas crescidas sobre Ti-usinado e Ti-nano foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 minutos e lavadas em PBS e água bidestilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina S (Sigma) a 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 minutos, lavadas com PBS e água bidestilada, observadas por epifluorescência em microscópio Leica DMLB (Leica, Alemanha) e a quantificação foi realizada por extração de cálcio. Em cada poço foram acrescentados 150 µL de ácido acético a 10% e as placas mantidas sob agitação por 30 minutos. A solução obtida foi transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, 100 µL de óleo mineral foram adicionados às amostras que estavam mantidas a 85°C por 10 minutos e transferidas para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos e ao final adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10%. Um volume de 150 µL do sobrenadante foi utilizado para a leitura em espectrofotômetro µQuant (Biotek, EUA) em um comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram expressos por absorbância.

3.4 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti

3.4.1 Cultura de CTMs em condições adipogênicas

Após a subconfluência da cultura primária e obtenção da suspensão de células (descrito em 3.2 “Obtenção e cultura de CTMs de ratos”), estas foram plaqueadas na densidade de 2×10^4

células/poço, em placas de poliestireno (Corning Incorporated) em meio adipogênico contendo os discos de Ti (Ti-usinado e Ti-nano) com ou sem o agente inibidor da via de sinalização das ERK1/2, o PD98059 na concentração de 25 μ M (LIU et al., 2009). O meio adipogênico foi composto por meio de expansão suplementado com dexametasona 10^{-6} M (Sigma-Aldrich), 3-isobutil-1-metilxantina a 0,5 μ M (Sigma-Aldrich), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e indometacina a 0,1 M (Sigma-Aldrich). A expressão gênica de PPAR γ , adiponectina (ADIPOQ) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (AP2) foi avaliada por PCR em tempo real aos 10 dias e a detecção de acúmulo lipídico por coloração com Óleo vermelho O aos 21 dias foram usadas para avaliar a diferenciação adipocítica das culturas adipogênicas.

3.4.2 Análise da expressão gênica de marcadores adipocíticos por PCR em tempo real

A expressão gênica de PPAR γ , ADIPOQ e AP2 de células crescidas sobre Ti-usinado e Ti-nano foi avaliada por PCR em tempo real, seguindo as especificações do ensaio de PCR em tempo real descritas no item 3.3.2 “*Análise da expressão gênica de marcadores osteoblásticos por PCR em tempo real*”.

3.4.3 Detecção de acúmulo lipídico por Óleo vermelho O

Culturas adipogênicas crescidas sobre superfícies de Ti-usinado e Ti-nano foram lavadas em PBS e fixadas com formalina a 4% por 10 minutos e lavados com isopropanol a 3%. Em seguida, foram coradas com Óleo vermelho O (Sigma) a 2% por 1 hora à temperatura ambiente. A quantificação foi realizada por extração do conteúdo lipídico corado pelo Óleo vermelho O. Em cada poço foram acrescentados 750 μ L de isopropanol a 100% e as placas serão mantidas sob agitação por 10 minutos. A solução obtida foi transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos e utilizada

para a leitura em espectrofotômetro μ Quant (Biotek, EUA) em um comprimento de onda de 500 nm. Os dados foram expressos por absorbância.

3.5 Análise estatística

Os dados apresentados são representativos de três experimentos independentes realizados com três culturas realizadas a partir de três pools constituídos por três ratos cada. Para cada experimento, as expressões gênica e proteica foram realizadas em triplicata ($n=3$) e formação de matriz mineralizada e acúmulo lipídico, em quintuplicata ($n=5$). Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico, para dados independentes e duas amostras, de Mann-Whitney para comparar células crescidas sobre Ti-usinado com e sem PD98059 ou células crescidas sobre Ti-nano com e sem PD98059. Para todos os experimentos o nível de significância foi $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das superfícies de Ti por MEV

Em escala nanométrica, o Ti-usinado apresentou uma superfície lisa e regular (Figura 1A), enquanto o Ti-nano apresentou uma rede de nanoporos (Figura 1B).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura em alta resolução das superfícies de Ti-usinado (A) e Ti-nano (B). O Ti-usinado apresentou uma superfície lisa, enquanto o Ti-nano apresentou uma rede de nanoporos (B). Barra de escala: A,B= 200 μ m.

4.2 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti

4.2.1 Expressão gênica de marcadores osteoblásticos

Em geral, aos 10 dias, a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos foi aumentada pela inibição da via de sinalização das ERKs, pelo PD98059 (25 μ M), principalmente nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 2). A expressão gênica de RUNX2 foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 2A) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$). A expressão gênica de RUNX2 não foi afetada pela presença de PD98059 nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 3A) ($p=0,177$). A expressão gênica de OSX foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 2B) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$). A expressão gênica de OSX não foi afetada pela presença de PD98059 nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 3B) ($p=0,620$). A expressão gênica de ALP foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 2C) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$) e também foi maior nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 3C) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-nano na ausência de PD98059 ($p=0,001$). A expressão gênica de OC foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 2D) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$) e também foi maior nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 3D) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-nano na ausência de PD98059 ($p=0,001$).

Figura 2. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), osterix (B), fosfatase alcalina (C) e osteocalcina (D) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos RUNX2 (A), osterix (B), fosfatase alcalina (C) e osteocalcina (D) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Expressão proteica de RUNX2

Aos 10 dias de cultura, a análise semi-quantitativa da expressão proteica de RUNX2 corroborou os resultados da expressão gênica. Assim, a expressão proteica de RUNX2 foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 4A) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059, e não foi afetada pela presença de PD98059 nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 4B).

Figura 4. Expressão proteica de RUNX2 em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado (A) e Ti-nano (B), na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 10 dias.

4.2.3 Detecção de matriz extracelular mineralizada

Aos 21 dias de cultura, a formação de matriz extracelular mineralizada não foi afetada pela presença de PD98059 nas células crescidas sobre Ti-usinado ($p=0,330$), sendo menor e estatisticamente significativa ($p=0,001$) nas células crescidas sobre Ti-nano na presença de PD98059 quando comparadas às células crescidas sobre Ti-nano na ausência de PD98059 (Figura 5).

Figura 5. Formação de matriz extracelular mineralizada em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições osteogênicas sobre discos de Ti-usinado e Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 21 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e o asterisco indica diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

4.3 Efeito da inibição da via de sinalização das ERKs na diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti

4.3.1 Expressão gênica de marcadores adipocíticos

Em geral, aos 10 dias, a expressão gênica dos marcadores adipocíticos foi aumentada pela inibição da via de sinalização das ERKs, pelo PD98059 (25 μ M) nas células crescidas sobre Ti-usinado e Ti-nano (Figuras 6 e 7). A expressão gênica de PPAR γ foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 6A) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$), seguindo o mesmo padrão nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 7A) na presença ou não de PD98059 ($p=0,005$). A expressão gênica de adiponectina foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 6B) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$), seguindo o mesmo padrão nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 7B) na presença ou não de PD98059 ($p=0,001$). A expressão gênica de AP2 foi maior nas células crescidas sobre Ti-usinado (Figura 6C) na presença de PD98059 comparadas às células crescidas sobre Ti-usinado na ausência de PD98059 ($p=0,001$), seguindo o mesmo padrão nas células crescidas sobre Ti-nano (Figura 7C) na presença ou não de PD98059 ($p=0,001$).

Figura 6. Expressão gênica dos marcadores adipocíticos, PPAR γ (A), adiponectina (B) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (C) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-usinado, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

Figura 7. Expressão gênica dos marcadores adipocíticos, PPAR γ (A), adiponectina (B) e proteína ligadora de ácido graxo do adipócito (AP2, C) em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 10 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão e os asteriscos indicam diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

4.3.2 Detecção de acúmulo lipídico

Aos 21 dias de cultura, a formação de acúmulo lipídico não foi afetada pela presença de PD98059 nas células crescidas sobre Ti-usinado ($p=0,083$) e Ti-nano ($p=0,083$) (Figura 8).

Figura 8. Formação de acúmulo lipídico em culturas de células-tronco mesenquimais crescidas em condições adipogênicas sobre discos de Ti-usinado e Ti-nano, na presença ou não do inibidor de ERK1/2, PD98059 (25 μ M), aos 21 dias. Os dados são apresentados com média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A investigação dos mecanismos pelos quais células interagem com superfícies de Ti pode contribuir para o desenvolvimento de terapias que favoreçam os processos de regeneração óssea e osseointegração. Nesse contexto, no presente estudo, foi avaliada a participação das ERKs no desenvolvimento dos fenótipos osteoblástico e adipocítico de CTMs crescidas sobre superfícies de Ti usinada e com nanotopografia. Os resultados mostraram que, em geral, as CTMs são mais responsivas à inibição da via de sinalização das ERKs quando crescidas sobre a superfície de Ti usinada quando comparada à superfície de Ti com nanotopografia. A inibição da via de sinalização das ERKs favoreceu a diferenciação osteoblástica e adipocítica de CTMs crescidas em condições osteogênicas e adipogênicas sobre a superfície de Ti usinada e teve efeito discreto nas CTMs crescidas sobre a superfície de Ti com nanotopografia, favorecendo apenas a diferenciação adipocítica.

As MAPKs fazem parte de complexas vias de sinalização nas quais está envolvido um amplo espectro de estímulos extracelulares que regulam respostas celulares cruciais como migração, proliferação, diferenciação e morte celular (CHANG e KARIN, 2001). Os primeiros membros identificados dessa família, as ERKs, estão envolvidos em eventos de proliferação e diferenciação celular e são predominantemente ativados por fatores de crescimento através da via Ras (MARSHALL, 1995; KESHET e SEGER, 2010; YAN et al., 2012). Para investigar o papel da ERKs na interação entre CTMs e superfícies de Ti, o desenho experimental foi baseado na utilização da droga PD98059, um inibidor seletivo de ERK1/2 (PANG et al., 1995). Em estudo prévio, foi observado que concentrações de PD98059 variando entre 10 e 100 μM foram capazes de inibir completamente o efeito do fator de crescimento do nervo, o qual é capaz de aumentar até quatro vezes a atividade de ERKs (PANG et al., 1995). Em nosso experimento, utilizamos a concentração de 25 μM com base em dados da literatura (LIU et al., 2009).

Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a superfície de Ti com nanotopografia aqui avaliada tem potencial osteogênico, o qual é mediado por, ao menos, duas vias de sinalização, das integrinas

e das BMPs (DE OLIVEIRA et al., 2007; KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016). Os achados indicaram que a nanotopografia aumenta a expressão das integrinas $\alpha 1$ e $\beta 1$ e que a inibição dessa via reduz a diferenciação osteoblástica de células crescidas sobre essa superfície (ROSA et al., 2014). Além disso, foi observada que a inibição da expressão de microRNAs que inibem a sinalização de BMP-2, resulta em uma maior responsividade à BMP-2 exógena e indução da produção de BMP-2 endógena em células crescidas sobre a nanotopografia (KATO et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016). Nesse estudo, investigamos a possível participação de um mecanismo adicional, envolvendo as ERKs, na interação entre células e superfícies de Ti com nanotopografia e usinada. Os resultados mostraram que a inibição de ERK1/2 aumentou a expressão gênica de marcadores osteoblásticos, além de aumentar discretamente a expressão proteica de RUNX2 e a formação de matriz extracelular mineralizada nas CTMs crescidas sobre a superfície de Ti usinada. Em concordância com esses achados, a inibição de ERK1/2 aumentou a expressão gênica de marcadores osteoblásticos em células da linhagem MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti rugosa ($R_a = 3.2 \text{ mm}$), tratada com jateamento e ataque ácido (ZHUANG et al., 2012). No entanto, a inibição de ERK1/2 não afetou a capacidade de diferenciação osteoblástica das CTMs crescidas sobre a superfície de Ti com nanotopografia. Corroborando esses achados, a utilização do PD98059, o inibidor de ERK1/2 aqui empregado, não afetou a produção de OC em células osteoblásticas da linhagem MG63 crescidas sobre superfícies de Ti com diferentes rugosidades (SCHWARTZ et al., 2001). Com base nessas informações, é possível sugerir que o efeito da modulação da via de sinalização das ERKs sobre a diferenciação osteoblástica é dependente da topografia de superfície do Ti e que o maior potencial osteogênico da superfície de Ti com nanotopografia comparada à superfície usinada, mostrado em estudos prévios (DE OLIVEIRA et al., 2007; ROSA et al., 2014), independe do grau de ativação de ERK1/2. Ainda, é possível especular que um eventual aumento da diferenciação osteoblástica resultante da inibição de ERK1/2 seria mascarado pela alta capacidade osseoindutora da nanotopografia, neste caso com a participação de integrinas e BMPs como mostrado previamente (KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016).

As células progenitoras presentes nos sítios de implantação são alvos de diversos estímulos além do osteogênico, incluindo o adipogênico, o que torna relevante a investigação do efeito das superfícies de Ti sobre a adipogênese. Em estudo recente, observamos que CTMs de medula óssea são mais osteogênicas e menos adipogênicas que CTMs de tecido adiposo (ABUNA et al., 2016). Além disso, foi demonstrado que adipócitos inibem a diferenciação osteoblástica por sintetizar e secretar TNF- α (ABUNA et al., 2016). Os resultados do presente estudo mostraram que a inibição de ERK1/2 aumentou a expressão gênica de marcadores adipocíticos em CTMs crescidas sobre as superfícies de Ti com nanotopografia e usinada, sendo o efeito mais acentuado no Ti usinado. A comparação dos nossos achados com dados da literatura é comprometida pela ausência de trabalhos avaliando adipogênese em células crescidas sobre superfícies de Ti. No entanto, os resultados aqui apresentados estão em acordo com a redução da diferenciação adipocítica induzida pela estimulação das ERKs em células mesenquimais da linhagem ST2 e CTMs de camundongos (LIU et al., 2015; GE et al., 2016). Também corroboram nossos achados a reversão do efeito inibitório do propril galato sobre a diferenciação adipocítica de CTMs derivadas de tecido adiposo humano obtida pelo bloqueio das ERKs (LEE et al., 2015). O aumento da expressão gênica dos marcadores adipocíticos induzido pela inibição de ERK1/2 não resultou em alteração na formação de acúmulo lipídico independentemente da superfícies de Ti, o que pode estar relacionado com os diferentes métodos empregados, uma vez que o PCR em tempo real utilizado para avaliação da expressão gênica é mais sensível do que o método colorimétrico empregado para quantificação do acúmulo lipídico.

Em conjunto, os achados prévios e os do presente estudo indicam que o potencial osseoindutor da nanotopografia envolve as vias de sinalização das integrinas e BMPs, mas independe das ERKs. Do ponto de vista terapêutico, esses resultados são relevantes para direcionar o desenvolvimento de superfícies de biomateriais que atuem em vias de sinalização que sabidamente modulam o processo de osteogênese.

6 CONCLUSÕES

- ERK1/2 modularam a interação entre CTMs de medula óssea de ratos e superfícies de Ti usinada e com nanotopografia.
- A inibição de ERK1/2 favoreceu a diferenciação osteoblástica de CTMs crescidas sobre a superfície de Ti usinada, mas não sobre Ti com nanotopografia.
- A inibição de ERK1/2 favoreceu a diferenciação adipocítica de CTMs crescidas sobre as superfícies de Ti com nanotopografia e usinada, sendo o efeito mais acentuado na usinada.

7 REFERÊNCIAS

ABUNA, R.P.F.; DE OLIVEIRA, F.S.; SANTOS, T. S.; GUERRA, T. R.; ROSA, AL.; BELOTI, M. M. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. *J Cell Physiology*. 2016; 231(1):204-214.

ADAMS, M.; REGINATO, M.J.; SHAO, D.; LAZAR, M.A.; CHATTERJEE, V.K. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*. 1997; 272(8):5128-5132.

AGUILAR, V.; ANNICOTTE, J.S.; ESCOTE, X.; VENDRELL, J.; LANGIN, D.; FAJAS, L. Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR gamma coactivation. *Endocrinology*. 2010; 151(11):5247-5254.

ALBREKTSSON, T.; BRÅNEMARK, P.I.; HANSSON, H.A.; LINDSTRÖM, J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52(2):155-170.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, J. Quantified bone tissue reactions to various metallic materials with reference to the so-called osseointegration concept. In: Davies, J.E.; Albrektsson, T. eds. *The Bone Biomaterial Interface*. 1991; II volume, p.357-363. Toronto: University of Toronto Press.

BERG, M.; FRAKER, D.L.; ALEXANDER, H.R. Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes. *Cytokine*. 1994; 6(4):425-432.

BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I.; ALBOUY, J.P.; LINDHE, J. Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(2):147-152.

BOULTON, T.G.; NYE, S.H.; ROBBINS, D.J.; IP, N.Y.; RADZIEJEWSKA, E.; MORGENBESSER, S.D.; DEPINHO, R.A.; PANAYOTATOS, N.; COBB, M.H.; YANCOPOULOS, G.D. ERKS: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991; 65(4):663-675.

BRANEMARK, P.I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRÖM, J.; HALLÉN, O.; OHMAN, A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977; 16:1-132.

BRUN, R.P.; TONTONNOZ, P.; FORMAN, B.M.; ELLIS, R.; CHEN, J.; EVANS, R.M.; SPIEGELMAN, B.M. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev*. 1996; 10(8):974-984.

- BUENO, R.B.; ADACHI, P.; CASTRO-RAUCCI, L.M.; ROSA, A.L.; NANJI, A.; OLIVEIRA, P.T. Oxidative nanopatterning of titanium surfaces promotes production and extracellular accumulation of osteopontin. *Braz Dent J.* 2011; 22(3):179-184.
- BURGERMEISTER, E.; CHUDERLAND, D.; HANOCH, T.; MEYER, M.; LISCOVITCH, M.; SEGER, R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(3):803-817.
- CANALIS, E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem.* 2009; 108(4):769-777.
- CASTRO-RAUCCI, L.M.S.; FRANCISCHINI, M.S.; TEIXEIRA, L.N.; FERRAZ, E.P.; LOPES, H.B.; DE OLIVEIRA, P.T.; HASSAN, M.Q.; ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2016; 117:1718-1726.
- CHAN, G.K.; DECKELBAUM, R.A.; BOLIVAR, I.; GOLTZMAN, D.; KARAPLIS, A.C. PTHrP inhibits adipocyte differentiation by down-regulating PPAR gamma activity via a MAPK-dependent pathway. *Endocrinology.* 2001; 142(11):4900-4909.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001; 410(6824):37-40.
- CHAU, J.F.; LEONG, W.F.; LI, B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol.* 2009; 24(12):1593-1606.
- CHUDERLAND, D.; SEGER, R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol.* 2005; 29(1):57-74.
- COUTURE, J.P.; NOLET, G.; BEAULIEU, E.; BLOUIN, R.; GÉVRY, N. The p400/Brd8 chromatin remodeling complex promotes adipogenesis by incorporating histone variant H2A.Z at PPAR γ target genes. *Endocrinology.* 2012; 153(12):5796-5808.
- DE OLIVEIRA, P.T.; NANJI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004; 25(3):403-413.
- DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L.; NANJI, A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 80(3):554-564.
- GE, C.; XIAO, G.; JIANG, D.; FRANCESCHI, R.T. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol.* 2007; 176(5):709-718.

GE, C.; XIAO, G.; JIANG, D.; YANG, Q.; HATCH, N.E.; ROCA, H.; FRANCESCHI, R.T. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the RUNX2 transcription factor. *J Biol Chem*. 2009; 284(47):32533-32543.

GE, C.; CAWTHORN, W.P.; LI, Y.; ZHAO, G.; MACDOUGALD, O.A.; FRANCESCHI, R.T. Reciprocal control of osteogenic and adipogenic differentiation by erk/map kinase phosphorylation of RUNX2 and PPAR γ transcription factors. *J Cell Physiol*. 2016; 231(3):587-596.

GITTENS, R.A.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CHENG, A.; ANDERSON, D.M.; MCLACHLAN, T.; STEPHAN, I.; GEIS-GERSTORFER, J.; SANDHAGE, K.H.; FEDOROV, A.G.; RUPP, F.; BOYAN, B.D.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater*. 2013; 9(4):6268-6277.

GUIHARD, P.; DANGER, Y.; BROUNAIS, B.; DAVID, E.; BRION, R.; DELECRIN, J.; RICHARDS, C.D.; CHEVALIER, S.; RÉDINI, F.; HEYMANN, D.; GASCAN, H.; BLANCHARD, F. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*. 2012; 30(4):762-772.

HASSAN, M.Q.; GORDON, J.A.; BELOTI, M.M.; CROCE, C.M.; VAN.; WIJNEN, A.J.; STEIN, J.L.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. A network connecting RUNX2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(46):19879-19884.

HATA, K.; IKEBE, K.; WADA, M.; NOKUBI, T. Osteoblast response to titanium regulates transcriptional activity of RUNX2 through MAPK pathway. *J Biomed Mater Res A*. 2007; 81(2):446-452.

HU, E.; KIM, J.B.; SARRAF, P.; SPIEGELMAN, B.M. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science*. 1996; 274(5295):2100-2103.

JAISWAL, R.K.; JAISWAL, N.; BRUDER, S.P.; MBALAVIELE, G.; MARSHAK, D.R.; PITTENGER, M.F. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000; 275(13):9645-9652.

JENSEN, E.D.; NAIR, A.K.; WESTENDORF, J.J. Histone deacetylase co-repressor complex control of RUNX2 and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007; 17(3):187-196.

JOSHI, S.K.; LIU, X.; SAMAGH, S.P.; LOVETT, D.H.; BODINE, S.C.; KIM, H.T.; FEELEY, B.T. mTOR regulates fatty infiltration through SREBP-1 and PPAR γ after a combined massive rotator cuff tear and suprascapular nerve injury in rats. *J Orthop Res*. 2013; 31(5):724-730.

JUNG, H.S.; KIM, Y.H.; LEE, J.W. Duration and magnitude of extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation determine adipogenesis or osteogenesis in human bone marrow-derived stem cells. *Yonsei Med J*. 2011; 52(1):165-172.

KATO, R.B.; ROY, B.; DE OLIVEIRA, F.S.; FERRAZ, E.P.; DE OLIVEIRA, P.T.; KEMPER, A.G.; HASSAN, M.Q.; ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. *J Cell Physiol.* 2014; 229(11):1690–1696.

KESHET, Y.; SEGER, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol.* 2010; 661:3-38.

KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1):189-195.

KUMAR, Y.; KAPOOR, I.; KHAN, K.; THACKER, G.; KHAN, M.P.; SHUKLA, N.; KANAUIYA, J.K.; SANYAL, S.; CHATTOPADHYAY, N.; TRIVEDI, A.K. E3 Ubiquitin ligase Fbw7 negatively regulates osteoblast differentiation by targeting RUNX2 for degradation. *J Biol Chem.* 2015; 290(52):30975-30987.

KYRIAKIS, J.M.; BANERJEE, P.; NIKOLAKAKI, E.; DAI, T.; RUBIE, E.A.; AHMAD, M.F.; AVRUCH, J.; WOODGETT, J.R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994; 369(6476):156-160.

LEE, H.M.; JOO, B.S.; LEE, C.H.; KIM, H.Y.; OCK, J.H.; LEE, Y.S. Effect of glucagon-like peptide-1 on the differentiation of adipose-derived stem cells into osteoblasts and adipocytes. *J Menopausal Med.* 2015; 21(2):93-103.

LEE, J.E.; KIM, J.M.; JANG, H.J.; LIM, S.Y.; CHOI, S.J.; LEE, N.H.; SUH, P.G.; CHOI, U.K. Propyl gallate inhibits adipogenesis by stimulating extracellular signal-related kinases in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cells.* 2015; 38(4):336-342.

LI, Q.; PENG, H.; FAN, H.; ZOU, X.; LIU, Q.; ZHANG, Y.; XU, H.; CHU, Y.; WANG, C.; AYYANATHAN, K.; RAUSCHER, F.J.; ZHANG, K.; HOU, Z. The LIM protein Ajuba promotes adipogenesis by enhancing PPAR γ and p300/CBP interaction. *Cell Death Differ.* 2016; 23(1):158-168.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S.; JAVED, A.; VAN WIJNEN, A.J.; STEIN, J.L.; MONTECINO, M.; HASSAN, M.Q.; GAUR, T.; LENGNER, C.J.; YOUNG, D.W. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006; 7(1-2):1-16.

LIM, S.; JANG, H.J.; PARK, E.H.; KIM, J.K.; KIM, J.M.; KIM, E.K.; YEA, K.; KIM, Y.H.; LEE-KWON, W.; RYU, S.H.; SUH, P.G. Wedelolactone inhibits adipogenesis through the ERK pathway in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2012; 113(11):3436-3645.

LIN, F.H.; CHANG, J.B.; BRIGMAN, B.E. Role of mitogen-activated protein kinase in osteoblast differentiation. *J Orthop Res.* 2011; 29(2):204-210.

LIU, Q.; CEN, L.; ZHOU, H.; YIN, S.; LIU, G.; LIU, W.; CAO, Y.; CUI, L. The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(11):3487-3497.

LIU, G.X.; ZHU, J.C.; CHEN, X.Y.; ZHU, A.Z.; LIU, C.C.; LAI, Q.; CHEN, S.T. Inhibition of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by erythropoietin via activating ERK and P38 MAPK. *Genet Mol Res*. 2015; 14(2):6968-6977.

LORD, M.S.; FOSS, M.; BESENBACHER, F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nano Today*. 2010; 5:66-78.

LU, Z.; ZREIQAT, H. Beta-tricalcium phosphate exerts osteoconductivity through $\alpha 2 \beta 1$ integrin and down-stream MAPK/ERK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 394(2):323-329.

MAHALINGAM, C.D.; SAMPATHI, B.R.; SHARMA, S.; DATTA, T.; DAS, V.; ABOU-SAMRA, A.B.; DATTA, N.S. MKP1-dependent PTH modulation of bone matrix mineralization in female mice is osteoblast maturation stage specific and involves P-ERK and P-p38 MAPKs. *J Endocrinol*. 2013; 216(3):315-329.

MARMOR, M.D.; SKARIA, K.B.; YARDEN, Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58(3):903-913.

MARSHALL, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995; 80(2):179-185.

MEIRELLES, L.; MELIN, L.; PELTOLA, T.; KJELLIN, P.; KANGASNIEMI, I.; CURRIE, F.; ANDERSSON, M.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008; 10(4):245-254.

MILAT, F.; NG, K.W. Is Wnt signalling the final common pathway leading to bone formation? *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 310(1-2):52-62.

NAOR, Z.; BENARD, O.; SEGER, R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11(3):91-99.

NIGER, C.; BUO, A.M.; HEBERT, C.; DUGGAN, B.T.; WILLIAMS, M.S.; STAINS, J.P. ERK acts in parallel to PKC δ to mediate the connexin43-dependent potentiation of RUNX2 activity by FGF2 in MC3T3 osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302(7):1035-1044.

PANG, L.; SAWADA, T.; DECKER, S.J.; SALTIEL, A.R. Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 1995; 270(23):13585-13588.

RANE, S.G. Ion channels as physiological effectors for growth factor receptor and Ras/ERK signaling pathways. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1999; 33:107-127.

RICHERT, L.; VETRONE, F.; YI, J.-H.; ZALZAL, S.F.; WUEST, J.D.; ROSEI, F.; NANJI, A. Surface nanopatterning to control cell growth. *Adv Mater.* 2008; 15:1-5.

ROSA, A.L.; KATO, R.B.; CASTRO RAUCCI, L.M.; TEIXEIRA, L.N.; DE OLIVEIRA, F.S.; BELLESINI, L.S.; DE OLIVEIRA, P.T.; HASSAN, M.Q.; BELOTI, M.M. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha 1 \beta 1$ integrin signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2014; 115:540–548.

ROSEI, F. Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. *J Physics: Condensed Matter.* 2004; 16:1373-1436.

ROSEN, V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009; 20(5-6):475-480.

ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBRED, A.R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPK kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994; 78(6):1027-1037.

RUBINFELD, H.; SEGER, R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* 2005; 31(2):151-174.

SALASZNYK, R.M.; KLEES, R.F.; HUGHLOCK, M.K.; PLOPPER, G.E. ERK signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on collagen I and vitronectin. *Cell Commun Adhes.* 2004; 11(5-6):137-153.

SCHWARTZ, Z.; LOHMANN, C.H.; VOCKE, A.K.; SYLVIA, V.L.; COCHRAN, D.L.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. Osteoblast response to titanium surface roughness and $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ is mediated through the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. *J Biomed Mater Res.* 2001; 56(3):417-426.

SEGER, R.; KREBS, E.G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995; 9:726-735.

SEO, S.W.; LEE, D.; CHO, S.K.; KIM, A.D.; MINEMATSU, H.; CELIL AYDEMIR, A.B.; GELLER, J.A.; MACAULAY, W.; YANG, J.; YOUNG-IN, L.; LEE, F. ERK signaling regulates macrophage colony-stimulating factor expression induced by titanium particles in MC3T3.E1 murine calvarial preosteoblastic cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1117:151-158.

SERRERO, G.; MILLS, D. Physiological role of epidermal growth factor on adipose tissue development in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(9):3912-3916.

SONG, J.H.; KIM, J.H.; PARK, S.; KANG, W.; KIM, H.W.; KIM, H.E.; JANG, J.H. Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(2):138-142.

STEIN, G.S.; ZAIDI, S.K.; STEIN, J.L.; LIAN, J.B.; VAN WIJNEN, A.J.; MONTECINO, M.; YOUNG, D.W.; JAVED, A.; PRATAP, J.; CHOI, J.Y.; ALI, S.A.; PANDE, S.; HASSAN, M.Q. Transcription-factor-mediated epigenetic control of cell fate and lineage commitment. *Biochem Cell Biol.* 2009; 87(1):1-6.

STEVENS, M.M.; GEORGE, J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005; 310(5751):1135-1138.

TAKAHASHI, A.; MORITA, M.; YOKOYAMA, K.; SUZUKI, T.; YAMAMOTO, T. Tob2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 expression by sequestering Smads and C/EBP α during adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2012; 32(24):5067-5077.

TAN, J.; SALTZMAN, W.M. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials.* 2004; 25(17):3593-3601.

TEIXEIRA, L.N.; CRIPPA, G.E.; LEFEBVRE, L.P.; DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L.; BELOTI, M.M. The influence of pore size on osteoblast phenotype expression in cultures grown on porous titanium. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 41(9):1097-1101.

TORTI, F.M.; TORTI, S.V.; LARRICK, J.W.; RINGOLD, G.M. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta. *J Cell Biol.* 1989; 108(3):1105-1113.

TURPIN, E.; MUSCAT, A.; VATIER, C.; CHETRITE, G.; CORRUBLE, E.; MOLDES, M.; FÈVE, B. Carbamazepine directly inhibits adipocyte differentiation through activation of the ERK 1/2 pathway. *Br J Pharmacol.* 2013; 168(1):139-150.

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

VARIOLA F, BRUNSKI JB, ORSINI G, TAMBASCO DE OLIVEIRA P, WAZEN R, NANCI A. Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. *Nanoscale*, 2011; 3(2):335-353.

WANG, W.; ZHANG, X.; ZHENG, J.; YANG, J. High glucose stimulates adipogenic and inhibits osteogenic differentiation in MG-63 cells through cAMP/protein kinase A/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biochem.* 2010; 338(1-2):115-122.

WIELAND, M.; TEXTOR, M.; CHEHROUDI, B.; BRUNETTE, D.M. Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts. *Biomaterials.* 2005; 26(10):1119-1130.

WU, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, P.; FANG, B.; JIANG, L. Intermittent traction stretch promotes the osteoblastic differentiation of bone mesenchymal stem cells by the ERK1/2-activated Cbfa1 pathway. *Connect Tissue Res.* 2012; 53(6):451-459.

YAMAMOTO, Y.; YOSHIZAWA, T.; FUKUDA, T.; SHIRODE-FUKUDA, Y.; YU, T.; SEKINE, K.; SATO, T.; KAWANO, H.; AIHARA, K.; NAKAMICHI, Y.; WATANABE, T.; SHINDO, M.; INOUE, K.; INOUE, E.; TSUJI, N.; HOSHINO, M.; KARSENTY, G.; METZGER, D.; CHAMBON, P.; KATO, S.; IMAI, Y. Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology.* 2013; 154(3):1008-1020.

YAN, Y.X.; GONG, Y.W.; GUO, Y.; LV, Q.; GUO, C.; ZHUANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, R.; ZHANG, X.Z. Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35709.

YUE, R.; ZHOU, B.O.; SHIMADA, I.S.; ZHAO, Z.; MORRISON, S.J. Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell.* 2016; 18 (6):782-796.

ZEE, T.; BOLLER, S.; GYÖRY, I.; MAKINISTOGLU, M.P.; TUCKERMANN, J.P.; GROSSCHEDL, R.; KARSENTY, G. The transcription factor early B-cell factor 1 regulates bone formation in an osteoblast-nonautonomous manner. *FEBS Lett.* 2013; 587(6):711-716.

ZHANG, Q.; RAMLEE, M.K.; BRUNMEIR, R.; VILLANUEVA, C.J.; HALPERIN, D.; XU, F. Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle.* 2012; 11(23):4310-4322.

ZHANG, W.; LIU, H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002; 12(1):9-18.

ZHENG, Q.; HUANG, G.; YANG, J.; XU, Y.; GUO, C.; XI, Y.; PAN, Z.; WANG, J. Could the effect of modeled microgravity on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells be reversed by regulation of signaling pathways? *Biol Chem.* 2007; 388(7):755-763.

ZHOU, G.; BAO, Z.Q.; DIXON, J.E. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1995; 270(21):12665-12669.

ZHUANG, L.F.; JIANG, H.H.; QIAO, S.C.; APPERT, C.; SI, M.S.; GU, Y.X.; LAI, H.C. The roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in regulating osteogenic differentiation of murine preosteoblasts MC3T3-E1 cells on roughened titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A.* 2012; 100(1):125-133.

ZINGER O, ANSELME K, DENZER A, HABERSETZER P, WIELAND M, JEANFILS J, HARDOUIN P, LANDOLT D. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials.* 2004; 25(14):2695-2711.

8 ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 055/2016

Ribeirão Preto, 15 de junho de 2016.

Ref. processo nº 2015.1.163.58.5

Senhor Pesquisador,

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais, em sua 39ª Sessão, realizada em 15/06/2016, **aprovou** o Relatório Final da Pesquisa intitulada: "Efeito da micro e da nanotopografia de titânio sobre quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs) no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico e adipocítico de células-tronco mesenquimais".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Michel Reis Messoria

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica
desta Faculdade

./rcq