UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Gabriela Cerminaro Rodrigues

Avaliação do comportamento de células indiferenciadas do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície de titânio nanotexturizado.

Ribeirão Preto

2015

GABRIELA CERMINARO RODRIGUES

Avaliação do comportamento de células indiferenciadas do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície de titânio nanotexturizado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre no Programa de Reabilitação Oral.
Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2015

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

RODRIGUES, G. C.

Avaliação do comportamento de células indiferenciadas do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície de titânio nanotexturizado.Ribeirão Preto, 2015.

88 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodrigues, Gabriela Cerminaro. Avaliação do comportamento de células indiferenciadas do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície de titânio nanotexturizado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Biologia Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

1. Prof.(a). Dr.(a).:_____
   Instituição: _____
   Julgamento: _____Assinatura: _____

2. Prof.(a). Dr.(a).:_____
   Instituição: _____
   Julgamento: _____Assinatura: _____

3. Prof.(a). Dr.(a).:_____
   Instituição: _____
   Julgamento: _____Assinatura: _____

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, e no Laboratório de Biologia Molecular, do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2013/19041-9.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Magda M. C. Rodrigues*** e ***Carlos Roberto Rodrigues***, por se dedicarem, abdicarem tempo e projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e ter uma boa formação profissional e pessoal. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo reitor ***Marco Antonio Zago***, vice-reitor ***Vahan Agopyan*** e a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, representada pelo diretor ***Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros*** e vice-diretora ***Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva.***

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral (Biologia Oral) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da ***Profa. Dra. Rossana Pereira de Almeida Antunes.***

À ***Profa. Dra. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza***, pela oportunidade em realizar o mestrado.

Agradeço especialmente, ***Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado***, que é uma excelente professora e orientadora, e acima de tudo uma grande amiga. Obrigada pela confiança, paciência, incentivo e por ser exemplo de competência, dedicação à pesquisa e de que é possível estabelecer relações humanas com as pessoas a quem se ensina. Muito obrigada!

Ao ***Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira***, por despertar e incentivar o meu interesse a pesquisa desde o período de iniciação científica, por todos os conselhos e troca de experiências.

Ao ***Roger Rodrigo Fernandes*** por sua dedicação aos alunos do Laboratório de Cultura de Células, por todos os ensinamentos, disponibilidade, amizade, paciência e pela solidariedade nos momentos difíceis durante esses 6 anos de convivência.

À ***Fabíola Singaretti de Oliveira*** e ***Milla Sprone Tavares Ricoldi*** pelo apoio constante, contribuições nos experimentos, conselhos e amizade.

É muito bom saber que sou formada de tantas outras pessoas, então gostaria de expressar meu agradecimento e reconhecimento a todos os meus amigos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho. À ***Larissa Moreira Spinola De Castro Raucci*** e ***Lucas Novaes Teixeira***, por me acolherem desde a graduação, por todas as explicações, incentivo e serem exemplos de dedicação. Ao ***Rodrigo Paolo Flores Abuna***, pela amizade, risadas, incentivo e paciência. À ***Emanuela Prado Ferraz, Fernanda Grilo de Azevedo, Mayara Sgarbi Semeghini, Nicolly Parente Ribeiro Frota, Maidy Rehder Wimmers Ferreira, Helena Bacha Lopes, Gileade Pereira Freitas, Daniel Galvão Costa, Heitor Fontes da Silva, Camila Alves Costa, Leticia Faustino Adolpho, Leonardo Pimentel Fiori, Pedro Flório, Marcelo Soares Francischini*** e ***Victor Augusto Miari***, pelos inúmeros momentos de alegria e muito incentivo.

Aos alunos de iniciação científica ***Carolina Alves Freiria de Oliveira, Denise Weffort*** e ***Gustavo Ribeiro Oliveira***, pela amizade e auxilio.

À ***Clélia Aparecida Celino***, secretária do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À ***Fernanda Talita de Freitas***, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Reabilitação Oral) Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por toda paciência, calma e carinho com alunos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos meus pais, ***Marga M. C. Rodrigues*** e ***Carlos Roberto Rodrigues***, sou grata pela vida, amor incondicional, por me sempre me mostrarem a direção correta e me ensinarem a ter fé na vida.

A minha irmã, ***Geovanna C. Rodrigues***, pelo companheirismo, palavras de incentivo e proteção. Por ser exemplo de força, personalidade e bondade.

Aos meus avós ***Francisco*** (in memoriam), ***Maria, Antenor*** e ***Dirce*** pela sabedoria, troca de experiências, por todo carinho e cuidados.

Ao ***Lucas S. Busatto***, pela paciência, companheirismo e carinho.

A ***Deus***, pelas bênçãos e pessoas que colocou em minha vida, pois me inspiraram e me encorajam a ser cada dia melhor.

À ***Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*** **(FAPESP),** pelo auxilio pesquisa e bolsa de mestrado concedidos (processo 2013/19041-9).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

RESUMO

RODRIGUES G C**. Avaliação do comportamento de células indiferenciadas do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície de titânio nanotexturizado.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, 2015. 88p

Implantes de titânio têm sido extensivamente utilizados na ortopedia e na odontologia principalmente como substituto de elementos dentários ausentes. O titânio é um implante metálico de escolha por ser biocompatível, resistente à corrosão e desfavorecer reações imunológicas. A influência das características superficiais do titânio no comportamento e morfologia celular tem sido amplamente investigada, mas ainda existem questões em aberto sobre a sua interação com diferentes células em um microambiente. O objetivo do presente projeto foi caracterizar o comportamento de células provenientes do cordão umbilical humano em contato com uma superfície de titânio nanotexturizada em meio osteogênico e não-osteogênico. As células da sub-íntima da veia do cordão umbilical foram isoladas e colocadas em garrafas de cultura em meio essencial mínimo. Após a subconfluência, as células foram cultivadas em placas de 24 poços (n=5) em contato com discos de titânio comercialmente puro (cpTi) polidos (grupo controle) e com discos de titânio nanotexturizados através de condicionamento ácido (grupo Ti-nano). Os parâmetros avaliados foram: proliferação e viabilidade celular, quantidade de proteína total e atividade de fosfatase alcalina, além da detecção de nódulos mineralizados. Também foi realizada a expressão gênica quantitativa de genes relacionados à adesão e diferenciação por meio de PCR em tempo real. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados analisados através do teste estatístico Sigma Plot após aplicação de testes de normalidade e homogeneidade para $p<0,05$.

Palavras-chave: cordão umbilical humano, titânio nanotexturizado, meio osteogênico.

ABSTRACT

ABSTRACT

RODRIGUES G C**. Behavior of undifferentiated cells from human umbilical cord vein cultured on nanotextured titanium surface.** Ribeirão Preto: University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto, 2015. 88p

Titanium implants have been extensively used in orthopedics and dentistry, mainly as a replacement for missing teeth. Titanium is a metal implant of choice due to its high biocompatibility and corrosion resistance, as well as absence of immune response. The influence of titanium superficial characteristics on morphology and cell behavior has been broadly investigated, but there are still questions about the interaction between titanium and different types of cells in a microenvironment. The purpose of the present investigation is to characterize the behavior of cells from human umbilical cord vein in contact with a nanotextured titanium surface cultured on osteogenic and non-osteogenic medium. Cells were obtained from umbilical cord subintimal vein layer and cultivated in minimal essential medium. After subconfluence, cells were cultured in 24-well plates (n=5) on pure commercial polished titanium discs (control group) and on nanotextured titanium discs by means of acid etching. The evaluated parameters were cell viability, alkaline phosphatase activity as well as the detection of mineralized nodules. It was also performed quantitative gene expression of genes associated to adhesion and extracellular matrix by means of Real Time PCR. All the assays were performed in triplicate and the data obtained were analyzed by means of statistical test (Sigma Plot) after normality and homogeneity tests.

Keywords: umbilical cord cells, nanotextured titanium, osteogenic medium.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies controle (a, c) e tratadas (b, d) de titânio.. Escala de a, b = 50µm; c, d=10µm (adaptado de Marconi e cols. 2007)..... **29**

Figura 2. Manipulação e limpeza do cordão umbilical com PBS para exposição da veia do cordão umbilical (seta)..... **39**

Figura 3. Preenchimento da veia do cordão umbilical com colagenase para remoção das células da subíntima da parede venosa..... **39**

Figura 4. Clampagem e imersão do cordão umbilical em PBS em banho-maria por 30 minutos..... **40**

Figura 5. Lavagem da veia do cordão com cânula e meio essencial mínimo para posterior centrifugação e plaqueamento..... **40**

Figura 6. Células da veia do cordão umbilical sendo semeadas em garrafa de cultura para expansão e futuro plaqueamento..... **41**

Figura 7. Plaqueamento das células da veia do cordão umbilical sobre os discos de titânio controle e nanotexturizado..... **42**

Figura 8. Identificação das sondas do sistema Taqman para genes ALP, Runx2, BMP2, ITGA1, CASP7, FN1 e ACTB..... **47**

Figura 9. Células da veia do cordão umbilical cultivadas em meio não osteogênico após 7 dias. Microscópio de contraste de fase, objetiva de 10x..... **50**

Figura 10. Células da veia do cordão umbilical cultivadas em meio osteogênico após 7 dias. Microscópio de contraste de fase, objetiva de 10x..... **51**

Figura 11. Viabilidade de células derivadas de cordão umbilical humano cultivadas sobre superfícies de discos de titânio polido (Ti-controle) e nanotexturizado (Ti-nano) expostas a meio de cultura não osteogênico (MEM) e osteogênico (MTS) em 7 (A),14 (B) e 17 (C) dias. Valores apresentados como média ± desvio padrão..... **52**

Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina em células provenientes do cordão umbilical humano cultivadas sobre discos de titânio polido (Ti-controle) e nanotexturizados (Ti-nano) expostas a meio de cultura não osteogênico (MEM) e osteogênico (MTS) em 7 (A),14 (B) e 17 (C) dias. Valores apresentados como média ± desvio padrão..... **53**

Figura 13. Aspecto macroscópico da cultura de células provenientes de cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti-Controle) (A) e nanotexturizados (Ti-nano) (B) em meio não

osteogênico (MEM); discos de titânio polidos (Ti-Controle)(C) e nanotexturizados (Ti-nano) (D) cultivadas em meio osteogênico (MTS) coradas por vermelho de alizarina aos 17 dias..... **54**

Figura 14. Avaliação da integridade das amostras de RNA das células da veia do cordão umbilical humano aos 7 dias: A discos de titânio polidos (Ti-controle) e B. discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM); C. discos de titânio polidos (Ti-controle) e D.discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio osteogênico (MTS). Aos 10 dias: E. discos de titânio polidos (Ti-controle) e F. discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM); G. discos de titânio polidos (Ti-controle) e H. discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio osteogênico (MTS)..... **55**

Figura 15. Expressão relativa de RNAm para os genes ALP (A; B), BMP2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células da veia do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo)..... **56**

Figura 16. Expressão relativa de RNAm para os genes ITGA1 (A; B) e ITGA2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células da veia do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo)..... **57**

Figura 17. Expressão relativa de RNAm para os genes FN1(A; B) e Runx2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo)..... **58**

Figura 18. Expressão relativa de RNAm para o gene CASP7 aos 7 (A) e 10 (B) dias de células do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo)..... **59**

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparações entre as amostras para viabilidade celular pelo pós-teste de Student-Neuman- Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **84**

Tabela 2. Comparações entre as amostras de ALP pelo pós-teste de Student-Neuman- Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **84**

Tabela 3. Comparações entre as amostras para parâmetro de expressão do gene ALP pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **85**

Tabela 4. Comparações entre as amostras do gene BMP2 pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **85**

Tabela 5. Comparações entre as amostras do gene ITG1 pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **86**

Tabela 6. Comparações entre as amostras do gene ITGA2 2 pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **86**

Tabela 7. Comparações entre as amostras do gene FN1 pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **87**

Tabela 8. Comparações entre as amostras do gene RUNX 2 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **87**

Tabela 9. Comparações entre as amostras do gene CASP7 pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis..... **88**

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO..... 25

2. HIPÓTESE..... 33

3. PROPOSIÇÃO..... 35

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 37

4.1 Preparo e obtenção da superfície nanotexturizada do titânio..... 38

4.2 Obtenção das células da veia do cordão umbilical humano..... 38

4.3 Métodos de Avaliação Celular..... 42

4.3.1 Viabilidade celular..... 42

4.3.2 Conteúdo de Proteína total e Atividade de fosfatase alcalina (ALP)..... 43

4.3.2.1 Proteína total..... 43

4.3.2.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)..... 44

4.3.3 Formação de matriz mineralizada..... 44

4.3.4 PCR em tempo real..... 45

4.3.4.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa..... 45

4.3.4.2 Reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas TaqMan..... 46

4.4 Forma de análise dos resultados..... 48

5. RESULTADOS..... 49

5.1 Morfologia celular..... 50

5.2 Ensaios bioquímicos..... 51

5.2.1 Viabilidade celular (MTT)..... 51

5.2.2 Atividade fosfatase alcalina (ALP)..... 52

5.2.3 Detecção de nódulos de mineralização..... 53

5.3 Avaliação da integridade do RNA total..... 54

5.4 Expressão gênica quantitativa..... 56

6. DISCUSSÃO..... 60
7. CONCLUSÃO..... 65
REFERÊNCIAS..... 67
ANEXOS..... 83

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O titânio e suas ligas têm sido extensivamente utilizados como materiais metálicos de escolha na ortopedia e cirurgia oral e maxilofacial nas últimas décadas devido a sua excelente biocompatibilidade (Albrektsson e cols., 2004), atribuída principalmente a fatores como: 1) melhor adaptação de suas propriedades mecânicas ao tecido ósseo quando comparadas com outros implantes metálicos; 2) recobrimento de sua superfície por uma camada de óxido de uma espessura de alguns nanômetros, responsável pela resistência à corrosão do material e 3) ser biologicamente inerte *in vivo* (Bozzini e cols., 2008; Popa e cols., 2008). Este comportamento permite com que haja uma boa osseointegração do material, especialmente em pacientes saudáveis. Entretanto, demora ou ausência da osseointegração podem ocorrer em pacientes que apresentam certos fatores predisponentes, como o vício do fumo e doenças crônicas tais como diabetes, osteoporose ou artrite (Esposito e cols., 1998; Vandamme e cols., 2011). Além disso, o aumento gradual nos últimos anos da expectativa de vida da população leva a um aumento do número de pacientes com qualidade óssea deficiente, aumentando a exigência de revisões após a cirurgia primária (Johnssen e cols., 2006). Todos estes desafios requerem uma superfície de excelência para que ocorra uma interação osso-biomaterial adequada e funcional (Bhola e cols., 2011). Sendo assim, a procura por um material que tenha alta biocompatibilidade, resistência à corrosão, ausência de indução de reações imunológicas recai sobre o titânio, culminando com a promoção da osseointegração (Palaiogolou e cols., 2012). Entretanto, independente do tipo de biomaterial sabe-se que a topografia pode determinar a resposta celular (Kriparamanan e cols., 2006).

1.1 Morfologia da superfície do titânio

Atualmente, a morfologia das superfícies metálicas podem ser modificadas por tratamento eletroquímico, químico e mecânico, sendo os dois últimos muito utilizados na

implantodontia (Teixeira e cols., 2001; Schuler e cols., 2006). O tratamento da superfície pode acelerar o crescimento, a maturação óssea e aumentar a estabilidade primária. Há inúmeras variáveis e combinações de parâmetros relacionados ao tratamento da superfície e fatores que interferem na osseointegração (forma do implante, material, superfície, qualidade, quantidade óssea, técnica cirúrgica), porém ainda não foi possível estabelecer a melhor rugosidade, superfície e forma do implante.

Estudos têm sido feitos para avaliar técnicas de tratamento da superfície do titânio para que seja possível aumentar a superfície ativa do implante, retenção do coágulo, estimular o processo de cicatrização, a área de contato e a resistência da interface osso-implante. A tendência atual é o desenvolvimento de superfícies híbridas, a morfologia com micro e nanorugosidades, além da incorporação de cálcio, fósforo e flúor (Sandrini e cols., 2003; Ellingsen e cols., 2004).

No tratamento químico com ácidos a rugosidade da superfície do titânio torna-se mais homogênea, promovendo um aumento na área superficial ativa e melhorando a bioadesão (Lima e cols, 2003). A morfologia da superfície do titânio mostrada na Figura 1 facilita a retenção de células osteogênicas e de fibrina (Braceras e cols., 2009; Marconi e cols., 2007) . Portanto, tratamentos químicos com ácidos e oxidantes podem melhorar a adesão e proliferação de células osteogênicas (Qu e cols., 2007), a precipitação de apatita e a expressão de genes relacionados à osteogênese. Sendo assim, modificações superficiais como jateamento e tratamento químico com ácidos têm sido utilizados para modificar a topografia em microescala e estimular a resposta celular tecidual (Vetrone e cols., 2009; Kubies e cols., 2011; Bonfante e cols., 2011).

A nanotecnologia é uma ferramenta que modula as respostas osteoblásticas sobre as superfícies de implantes de titânio, afetando diretamente o processo de osseointegração (Bueno e cols., 2011.; Dimitrievska e cols. 2011.; Menon e cols., 2012.; Gittens e cols, 2013). Foi demonstrado que os padrões distintos de nanotopografia regulam a atividade de células

osteoblásticas, desde a adesão até a mineralização da matriz extracelular (De Oliveira e cols., 2007; Divya e cols., 2009; Vetrone e cols., 2009). O nano revestimento do titânio com TiO_2, ZrO_2 ou Al_2O_3, assim como o tratamento com H_2SO_4/H_2O_2 produziram superfícies que regulam positivamente um conjunto de moduladores do fenótipo osteoblástico em células mesenquimais humanas (MSCs) (Mendonça e cols., 2010).

A influência das características superficiais do titânio no comportamento e morfologia celular tem sido amplamente investigada, mas ainda existem questões em aberto sobre a sua interação com diferentes células em um microambiente. Ainda que muitos estudos relatem as diferentes substâncias e técnicas utilizadas na caracterização da superfície de titânio, a superfície ideal continua sendo estudada, já que muitos fatores necessitam ser controlados e que, em conjunto, interferem na reação celular (Baxter e cols., 2002).

Em contraste com experimentos *in vivo*, o estudo com culturas celulares é considerado uma ferramenta útil devido à possibilidade de analisar a interação célula-matriz com a superfície do titânio (Rausch-fan e cols., 2008) e a influência das diferentes superfícies de titânio na cultura de vários tipos celulares, entre elas os osteoblastos (Martin e cols., 1995; Montanaro e cols., 2002). O fenótipo dessas células geralmente é mantido, porém elas não respondem da mesma maneira em culturas sobre discos de titânio com superfícies diferentes.

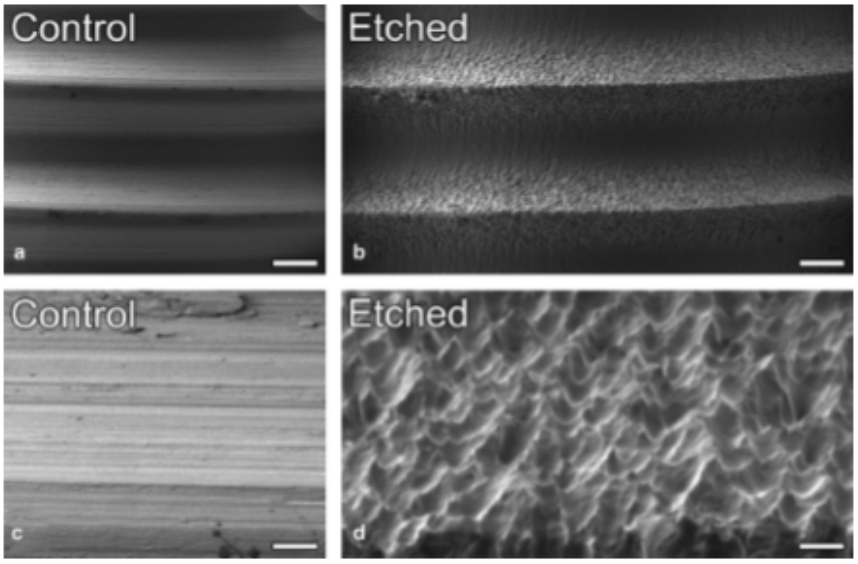

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies controle (a, c) e tratadas (b, d) de titânio Escala de a, b = 50µm; c, d=10µm (adaptado de Marconi e cols. 2007).

1.2 Cultura celular

A cultura de células é uma maneira empregada para estudar as células vivas e esclarecer os mecanismos fundamentais da biologia celular (De Robertis e cols., 2006). A utilização desta metodologia com o objetivo de avaliar o efeito de um substrato sobre o comportamento de células durante o processo de osseointegração tem sido amplamente estudada. Alguns dos eventos que podem ser analisados isoladamente são a adesão, proliferação e diferenciação celular, assim como a produção e mineralização de matriz. A utilização das culturas facilita o acesso a informações celulares e moleculares que auxiliam no futuro desenho do implante, proporcionando uma oportunidade única dentro do processo e fenômeno de osseointegração (Cooper e cols., 1998).

Atualmente, é possível observar um avanço significativo na compreensão do funcionamento das células-tronco, que são células indiferenciadas com capacidade de auto-replicação e diferenciação em diversos tipos celulares (Mitsiadis e cols, 2011). Tais

características fazem delas uma grande ferramenta para o tratamento de inúmeras doenças que não podem ser tratadas por métodos tradicionais. Se conseguirmos compreender os mecanismos pelos quais estas células indiferenciadas de tecidos específicos se diferenciam em células maduras, assim como suas funções e qualidades, estaremos perto da utilização de células-tronco na clínica como forma de substituir tecidos danificados por lesões ou doenças.

As células-tronco são conhecidas por existirem em diversas regiões do organismo, como medula óssea (Fritz e cols., 2008), sinóvia (Nimura e cols., 2008), pulmão (Kannan e cols., 2008), tecido adiposo (Gu e cols., 2014; Zuk Pa e cols., 2002), sangue periférico, polpa dentária e ligamento periodontal (Chen e cols., 2009).

As células-tronco da medula óssea têm sido aplicadas como base para terapia celular, incluindo o reparo ósseo (Arinzeh e col., 2003; Bruder e cols., 1998). No entanto, devido à disponibilidade limitada do número de células para uso autógeno e à possibilidade do doador desenvolver doenças, há uma necessidade de se identificar novas fontes de células-tronco. Uma alternativa é o tecido do cordão umbilical (Eblenkamp e cols,, 2004). As duas artérias e a veia do cordão umbilical são rodeadas por um tecido conjuntivo mucoso chamado geléia de Wharton (Mitchell e cols., 2003; Wang e cols., 2004), que as protege contra a compressão, torção e flexão (Nanaev e cols,1997;). Weiss e cols., (2008) descreve que as células mesenquimais derivadas da região perivascular dos tecidos do cordão umbilical são denominadas coletivamente como células mesenquimais derivadas do cordão umbilical (UCMSC). Diferentes procedimentos de coleta da geléia de Wharton originaram células que exibem fenótipo neural (Fu e cols.,2006), sugerindo um grande potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas, além de expressarem marcadores de cardiomiócitos, sugerindo a versatilidade desta fonte de células. Outra alternativa é o sangue de cordão umbilical, uma fonte rica e ilimitada de células-tronco hematopoiéticas para serem utilizadas em transplante alogênicos no tratamento de desordens oncológicas, genéticas, hematológicas e de

imunodeficiência (Bahl e cols., 2013). Esta fonte tem sido muito valiosa, mas o seu potencial terapêutico se estende para além do componente hematopoiético sugerindo, assim, um potencial regenerativo de órgãos sólidos (Bieback e cols., 2007). Uma vez que um órgão comum contém diversos tipos de células, o mais valioso para a regeneração seria se as células-tronco possuíssem elevado potencial de auto-renovação e ao mesmo tempo contribuíssem com os tecidos de camadas germinativas diferentes. Segundo Romanov e cols. (2003), as células mesenquimais progenitoras (MPCs) estão presentes na camada subendotelial da veia do cordão umbilical humano. O cordão umbilical humano é a conexão entre a mãe e o feto (Fan e cols, 2011). Desenvolve-se no 26º dia da gestação, e cresce até o nascimento para formar um órgão branco leitoso, helicoidal de 30 a 50 centímetros de comprimento e sua extensão é da área umbilical do feto para o centro da superfície fetal placentária (Ziegel & Cranley, 1985). Alguns estudos observaram que existem células-tronco mesenquimais (MSCs) na veia do cordão umbilical humano que originam uma população de células aderentes com uma morfologia típica de fibroblasto (Liu e cols., 2007).

Sarugaser e cols. (2005) sugerem que embora a função *in vivo* das células da veia do cordão umbilical humano ainda deva ser estudada, estas células representam uma população celular normal, com rápida expansão e representam uma alternativa significativa à medula óssea no tratamento de patologias do corpo humano. As células da veia do cordão umbilical possuem algumas vantagens sobre a medula óssea como serem obtidas por um método menos invasivo sem provocar danos à mãe ou à criança (Rubinstein e cols., 1993), poderem ser amplamente expandidas e mantidas em cultura mesmo após a criopreservação (Seshareddy e cols., 2008), assim como apresentarem menor potencial teratogênico (Mitchell e cols., 2003; WEISS e cols., 2008). Além disso, não geram a necessidade de uma compatibilidade completa entre doador e receptor e favorecem um menor risco de desenvolvimento da doença do enxerto *versus* hospedeiro (Alkindi e cols, 2011). Bombonato-Prado e cols (2014) relataram por meio da tecnologia de cDNA *microarray* que as células da veia do cordão

umbilical humano apresentam genes que sofrem modulação similar aos genes das células da medula óssea quando induzidas à diferenciação osteoblástica. Já Nascimento e cols (2014) comprovaram a diferenciação osteoblástica deste grupo celular por meio de ensaios bioquímicos e imunofluorescência. Outros artigos confirmam além disso sua multipotência e capacidade de se diferenciarem em células ósseas, cartilaginosas, musculares e neurais (Aigner, 2005; Eblenkamp, 2004; Kestendjieva e cols, 2008). Não menos importante, estas células são capazes de aderir ao plástico (Dimitrov e cols., 2008).

Alguns estudos se mostram céticos em relação ao cordão umbilical ser considerado uma fonte de células-tronco (Mareschi e cols., 2001; Wexler e cols., 2003), porém outros estudos mostram que é possível isolar células-tronco a partir do cordão umbilical (Bieback, 2004; Ko¨gler, 2004). Os avanços na engenharia tecidual sugerem que mudanças significativas na tradicional clínica odontológica estão começando a ocorrer. Futuramente, o tratamento baseado em células-tronco estará associado ao controle da inflamação e infecção, capacidade de regenerar novos tecidos, tais como ligamento periodontal e osso alveolar, proporcionando uma maior eficiência, bem como a estabilidade pós-operatória (Chen e cols., 2009).

Estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram a capacidade de diferenciação de células da veia do cordão umbilical humano por meio de substâncias químicas colocadas no meio de cultura (Bombonato-Prado e cols, 2014; Nascimento e cols, 2014) e cultivadas sobre o poliestireno. Além disso, também demonstramos um favorecimento da proliferação deste grupo celular em titânio nanotexturizado por imunolocalização do anticorpo Ki-67 (Vetrone e cols, 2009). Até o presente momento, por não haverem estudos relacionando a atividade proteica e expressão gênica das células da veia do cordão umbilical humano em contato com titânio nanotexturizado, foi objetivo deste trabalho analisar a influência desta nanotopografia no metabolismo destas células para que os resultados possam servir como base para futuras aplicações clínicas na odontologia e áreas médicas afins.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho foi a de que a superfície nanotexturizada do titânio pode influenciar positivamente a atividade protéica e a expressão de genes associados à adesão e formação de matriz extracelular de células indiferenciadas da veia do cordão umbilical, independente da presença de meio osteogênico nas culturas celulares.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O desafio científico do presente projeto foi comprovar diferenças no metabolismo de células provenientes da veia do cordão umbilical humano cultivadas sobre uma superfície nanotexturizada de titânio por meio de ensaios bioquímicos e de expressão gênica quantitativa. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) para confirmação dos resultados e analisados por programa estatístico. Os parâmetros utilizados foram:

Ensaios bioquímicos:

- - viabilidade celular;
- -atividade de fosfatase alcalina;
- -quantidade de proteína total;
- -detecção de nódulos mineralizados.

Expressão gênica quantitativa:

- Avaliação quantitativa da expressão de genes associados à adesão e formação da matriz extracelular por meio de PCR em tempo real aos 7 e 10 dias de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo e obtenção da superfície nanotexturizada do titânio

Discos de titânio comercialmente puro (cpTi) de grau 2 de 13mm de diâmetro e 2mm de espessura foram polidos em papéis abrasivos de carboneto de silício (320 e 600 mesh). Posteriormente, todos os discos foram lavados em sabão, álcool 70° GL e água deionizada em ultrassom por ciclos de 30 minutos (cada passagem). Para obtenção das superfícies nanotexturizadas, foram utilizados volumes iguais de ácido sulfúrico concentrado P.A. (Sigma-Aldrich, USA) e 30% de peróxido de hidrogênio aquoso (H_2O_2aq) (Sigma-Aldrich, USA) (Yi e cols., 2006; Variola e cols., 2008) Em um béquer com os discos sob agitação, foram adicionados primeiramente o peróxido de hidrogênio e posteriormente na sequência, o ácido sulfúrico, sendo o mistura mantida por 4 horas sob agitação contínua em temperatura ambiente, dentro da capela de exaustão, para obter a superfície nanotexturizada. Após o condicionamento, os discos foram lavados em ultrassom com água destilada por 20 minutos e secos na estufa para posteriormente serem esterilizados em auto-clave para seu uso na cultura celular.

4.2 Obtenção das células da veia do cordão umbilical humano

Os experimentos com cultura de células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo após aprovação do comitê de Ética desta unidade. A veia dos cordões umbilicais foram cateterizadas e lavadas internamente com PBS e sua extremidade distal clampada (Figura 2). As veias foram então preenchidas com 1% de colagenase tipo II (Sigma) em PBS e a extremidade proximal clampada (Figura 3).

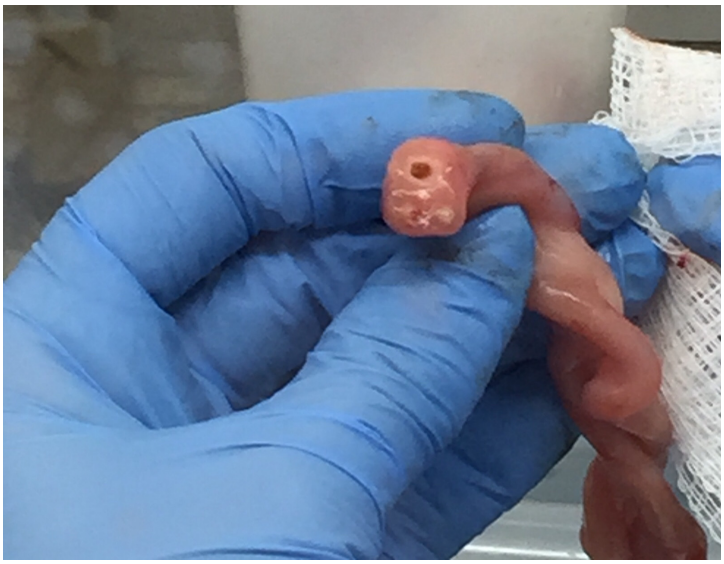

Figura 2. Manipulação e limpeza do cordão umbilical com PBS para exposição do vaso venoso.

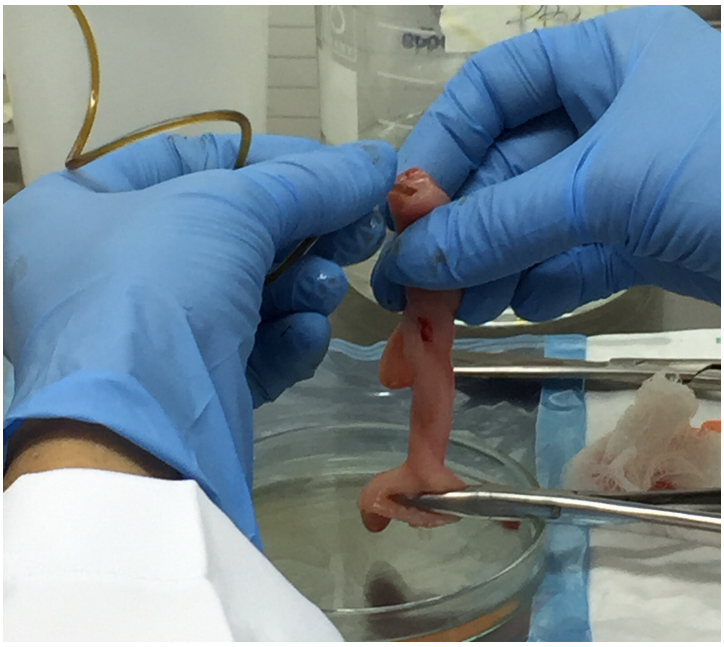

Figura 3. Preenchimento da veia do cordão umbilical com colagenase do tipo II para remoção das células da subíntima da parede venosa.

Após imersão em banho-maria por 30 minutos a 37ºC (Figura 4), as células das camadas endoteliais e subendoteliais foram coletadas por lavagem com meio de cultura α-MEM e 5% de soro fetal bovino (Figura 5). A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 2000rpm e o pellet ressuspenso em meio α-MEM, 10% de soro fetal bovino e fungizone (Gibco). Em seguida, as células foram colocadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 (Figura 6).

Após a confluência, as células foram tripsinizadas, lavadas em PBS, ressuspensas em meio de cultura e cultivadas em placas de 24 poços em contato com os discos de titânio controle e nanotexturizado (Figura 7).

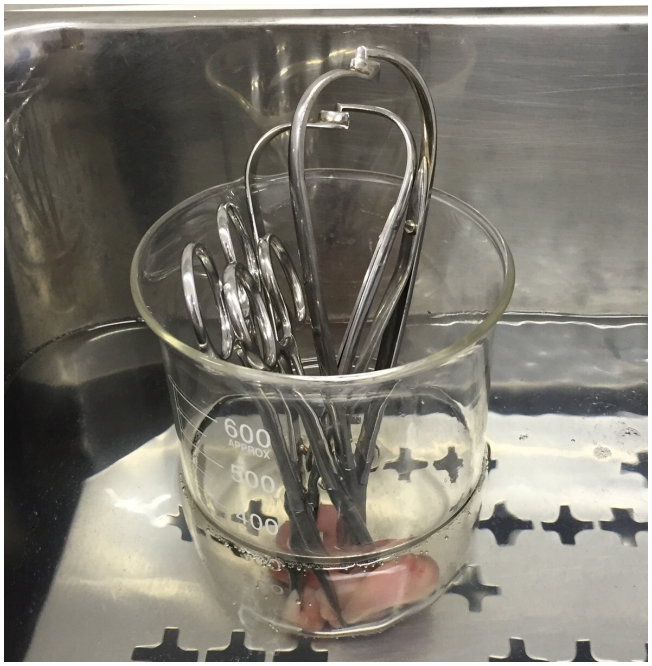

Figura 4. Clampagem e imersão do cordão umbilical em PBS em banho-maria por 30 minutos.

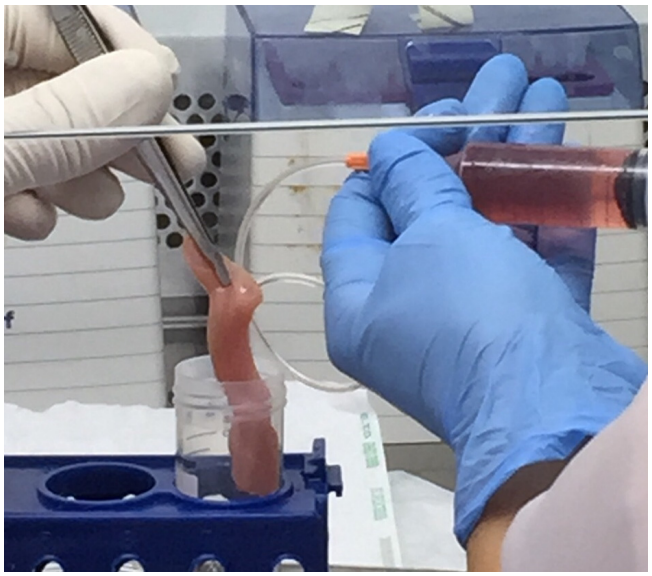

Figura 5. Lavagem da veia do cordão com cânula e meio essencial mínimo para posterior centrifugação e plaqueamento.

As células foram cultivadas dois tipos de meio:

- Meio osteogênico (MTS): composto por meio essencial mínimo, modificação α, com L-glutamina (α-MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 7 mM de β-glicerofosfato (Sigma, St Louis, MO, EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen), 5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) e vancomicina(Sigma, St Louis, MO, EUA)

- Meio não osteogênico (MEM): composto por meio essencial mínimo, modificação α, com L-glutamina (α-MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen) e vancomicina (Sigma, St Louis, MO, EUA)

Ambas as culturas ficaram a 37 ºC em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 e 95 % de ar atmosférico e o meio de cultura trocado a cada 3 dias.

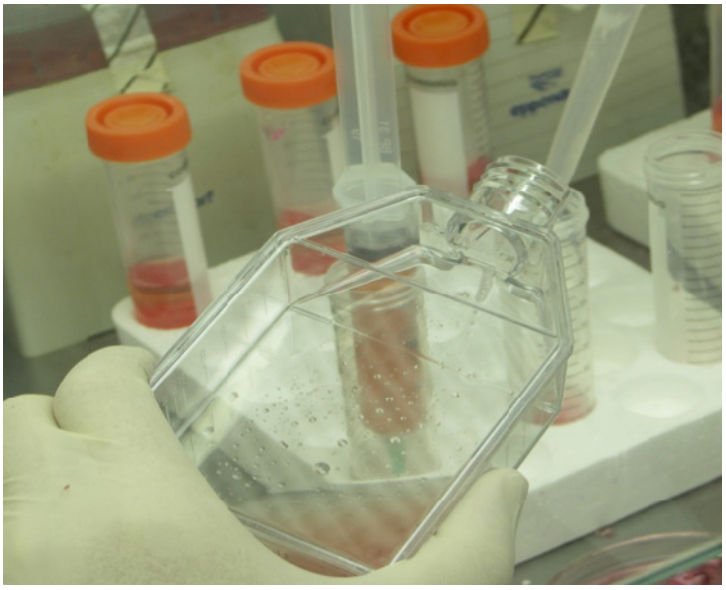

Figura 6. Células da veia do cordão umbilical sendo semeadas em garrafas de cultura para expansão e futuro plaqueamento.

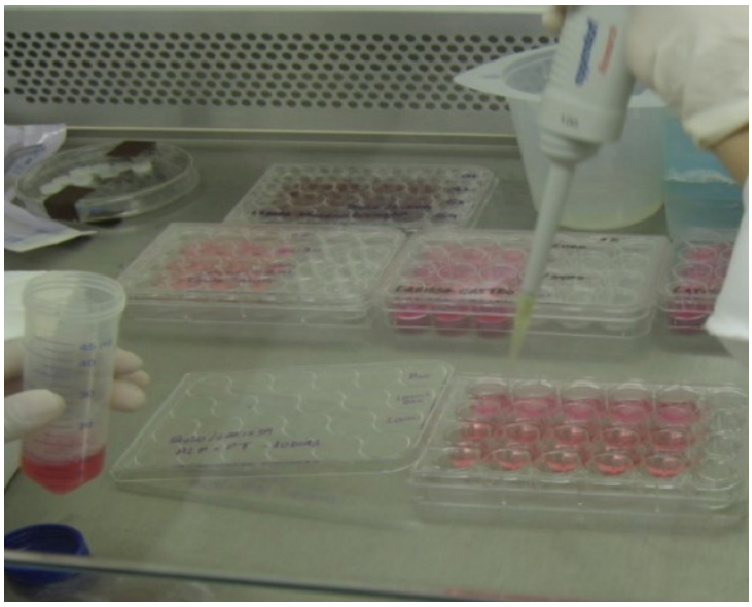

Figura 7. Plaqueamento das células da veia do cordão umbilical sobre os discos de titânio controle e nanotexturizado.

Os grupos experimentais foram divididos em: células do cordão umbilical humano cultivadas sobre os discos de titânio polido em meio não osteogênico (Ti-controle/MEM); células cultivadas sobre discos de titânio nanotexturizado em meio não osteogênico (Ti-nano/MEM); células cultivadas sobre discos de titânio polido em meio osteogênico (Ti-controle/MTS) e células cultivadas sobre disco de titânio nanotexturizado em meio osteogênico (Ti-nano/MTS).

4.3 Métodos de Avaliação Celular

As células foram plaqueadas em uma concentração de 2 x 10^4 células por poço em placas de 24 poços (n=5). Os parâmetros avaliados estão descritos abaixo:

4.3.1 Viabilidade celular

Ao final de 7, 14 e 17 dias em cultura, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). As células foram

incubadas com 10% de MTT (5 mg/mL) em meio de cultura a 37 ºC por 4 horas. O meio foi então aspirado do poço e 250µL de isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) foi adicionado a cada poço. As placas foram colocadas em um agitador por 5 minutos e 200µL desta solução foi transferida a uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 570 nm.

4.3.2 Conteúdo de Proteína total e Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

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

4.3.2.1 Proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada seguindo o método de Lowry (Lowry e cols., 1951). Para isso, 500µL da amostra contida em cada poço da placa de cultura foi transferida ao respectivo tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 500µL do reagente de Lowry (Sigma). Os tubos foram agitados vigorosamente e deixados em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, uma alíquota de 250µL da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocaulteau (Sigma) foi adicionada aos tubos de ensaio, os quais foram submetidos à agitação e deixados em repouso à temperatura ambiente, por 30 minutos, para desenvolvimento da coloração azul. Após 30 minutos, a absorbância de cada tubo foi

determinada em um espectrofotômetro (CE3021-Cecil, UK), em comprimento de onda de 680nm. O conteúdo de proteína total de cada poço foi calculado aos 7, 14 e 17 dias, com base na construção de uma curva padrão a partir de albumina bovina (Sigma). Os resultados não são apresentados pois foram utilizados somente para normalização da atividade de fosfatase alcalina.

4.3.2.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da ALP foi determinada através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando o Kit comercial (Labtest Diagnostica SA, Brazil) e seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados tubos de ensaio devidamente identificados para os grupos teste, padrão e branco. Em todos os tubos foram adicionados 0,05mL de substrato e 0,5mL de solução tampão. Somente no tubo padrão, foi acrescentado 0,05mL da solução padrão. Posteriormente, todos os tubos foram colocados em banho de água a 37ºC, para a realização do experimento. Alíquotas de 0,05mL das amostras foram adicionadas aos respectivos tubos teste, etapa que foi realizada em um intervalo máximo de 10 minutos. Decorridos 10 minutos, foram adicionados aos tubos testes, padrão e branco, 2mL do reagente de cor e em seguida a absorbância foi determinada em espectrofotômetro (CE3021- Cecil), no comprimento de 590nm. A atividade de ALP foi determinada aos 7, 14 e 17 dias e os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total.

4.3.3 Formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecida a 37º C, preenchidos

com 2mL de formalina 10% e mantidos a 4°C. Decorridas 24 horas, após remoção da formalina, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em séries crescentes de álcoois (30ºGL, 50ºGL, 70ºGL e 100ºGL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica, foi de 60 minutos. Após a secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, foram evidenciadas pela coloração vermelha.

4.3.4 PCR em tempo real

4.3.4.1 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Após cada período experimental, foi realizada a extração do RNA total através do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260; 280; 230; 320 ηm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Reino Unido). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese microfluídica RNA 6000 nano chips fornecidos pela Agilent Technologies® (Santa Clara, CA, EUA) utilizando o aparelho Agilent 2100 Bioanalyser.

Todos os reagentes, que até o momento estavam armazenados em freezer, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando 550 µl do RNA 600 Nano Gel em uma coluna com filtro e centrifugou-se por 10 minutos a 1.500 x g a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 µl foi colocada num tubo eppendorf de 0,5 ml e adicionou-se 1 µl de RNA 6000 *Nano Dye* e após agitação por 10 segundos, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 x g a temperatura ambiente. Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano Chip o qual foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos. Primeiramente pipetou-se 9 µl da mistura gel/dye na região G indicada no

chip e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, pipetou-se 9 µl das misturas nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se 1 µl do marcador na posição indicada e 5 µl do RNA 6000 *Nano Marker* em cada posição relacionada as amostras assim como na posição do marcador. Por ultimo, 1 µl de cada amostra (100-150 ng de RNA total) foi adicionado nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um aparelho tipo vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, China) agitou-se o chip horizontalmente por 1 minuto a 2200 rpm antes da leitura. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroferograma e densitometria dos géis). A caracterização de um RNA mensageiro (RNAm) de boa qualidade foi verificada pela visualização de duas subunidades ribossômicas características nos eucariotos (18S e 28S). Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/ reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25 ºC por 10 minutos, 37 ºC por 120 minutos, 85 ºC por 5 segundos, seguido pelo resfriamento a 4 ºC. Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA estocado em freezer −20°C.

4.3.4.2 Reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas TaqMan

A expressão quantitativa dos genes, ALP, BMP2, ITGA1, ITGA2, FN1, Runx2 e CASP 7 foi analisada após 7 e 10 dias de cultura através de reações de Real time PCR. As reações de PCR em tempo real realizadas pelo sistema de sondas TaqMan foram preparadas

para um volume final de 10µl por reação. Para cada reação, foram adicionados 5µl de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5µl das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 11,25 ηg de cDNA. As reações consistirão em 2 minutos a 50 ºC, 10 minutos a 95 ºC, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 ºC e 1 minuto a 60 ºC. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva beta-actina (ACTB). Os níveis de expressão do gene constitutivo foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de 2-ΔΔCT (Livak e cols., 2001). Usando o método de 2-ΔΔCT, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo. A significância estatística das mudanças de expressão gênica foi avaliada pelo teste t entre o grupos propostos. Os experimentos foram realizados em triplicata. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados representaram os valores da média ± desvio padrão, da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo, normalizado pela expressão de beta-actina.

Sonda TaqMan	Identificação	Pb
ALP	Hs01029144_m1	79
Runx2	Hs00231692_m1	116
BMP2	Hs00154192_m1	60
ITGA1	Hs00235006_m1	87
CASP7	Hs00169152_m1	76
FN1	Hs00365052_m1	82
ACTB	4352935E	171

Figura 8. Identificação das sondas do sistema Taqman para genes ALP, Runx2, BMP2, ITGA1, CASP7, FN1 e constitutivo ACTB.

4.4 Forma de análise dos resultados

Os dados foram analisados através de teste estatístico apropriado após aplicação de testes de normalidade e homogeneidade. Foi utilizado o software estatístico SigmaPlot (Systat Software, Witzenhausen, HE, Germany) e a significância foi fixada em 5% com a realização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Morfologia Celular

As células da veia do cordão umbilical cultivadas em meio não osteogênico apresentaram morfologia alongada com aspecto fusiforme e proliferação celular rápida, atingindo subconfluência após 7 dias de cultura, como pode ser visto na Figura 9. Já as células cultivadas em meio osteogênico apresentaram uma morfologia menos alongada e mais poligonal e em menor quantidade no campo evidenciado pela Figura 10 após o mesmo período de cultura. As imagens das células em contato com os discos não foram mostradas pelo fato da presença do disco de titânio impedir a visualização das mesmas.

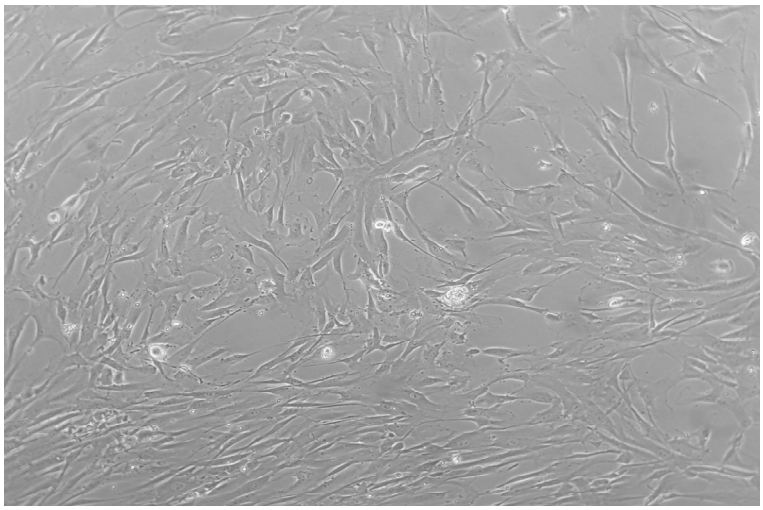

Figura 9. Células da veia do cordão umbilical cultivadas em meio não osteogênico após 7 dias. Microscópio de contraste de fase, objetiva de 10x.

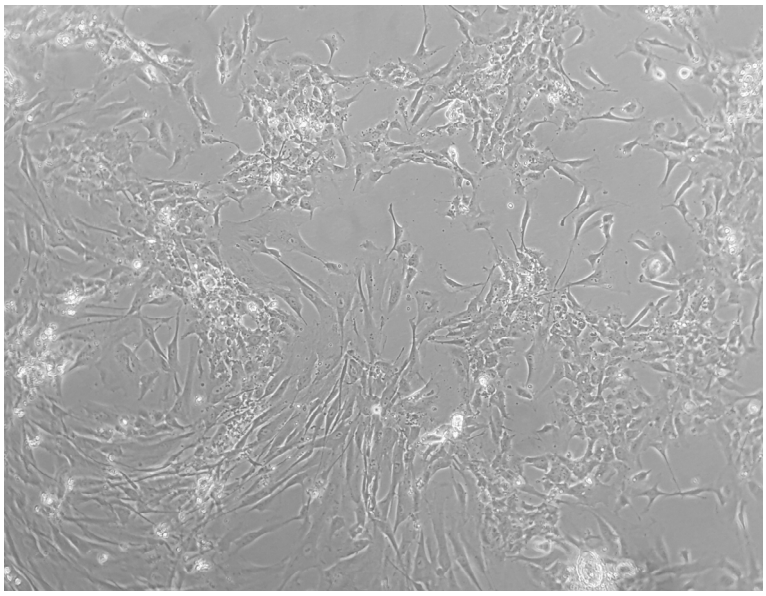

Figura 10. Células da veia do cordão umbilical cultivadas em meio osteogênico após 7 dias. Microscópio de contraste de fase, objetiva de 10x.

5.2 Ensaios Bioquímicos

5.2.1 Viabilidade celular (MTT)

Na figura 11 pode ser observado que a viabilidade celular foi similar nos grupos controle e Ti-nano cultivados em MEM, não havendo diferença significativa entre eles, exceto para o grupo de 14 dias. Já nos grupos cultivados em meio osteogênico (MTS), as células sobre a superfície condicionada mostraram menor viabilidade quando comparado ao grupo sobre a Ti-controle aos 7 e 14 dias; já aos 17 dias, a viabilidade no grupo Ti-nano foi significativamente maior ($p<0,05$).

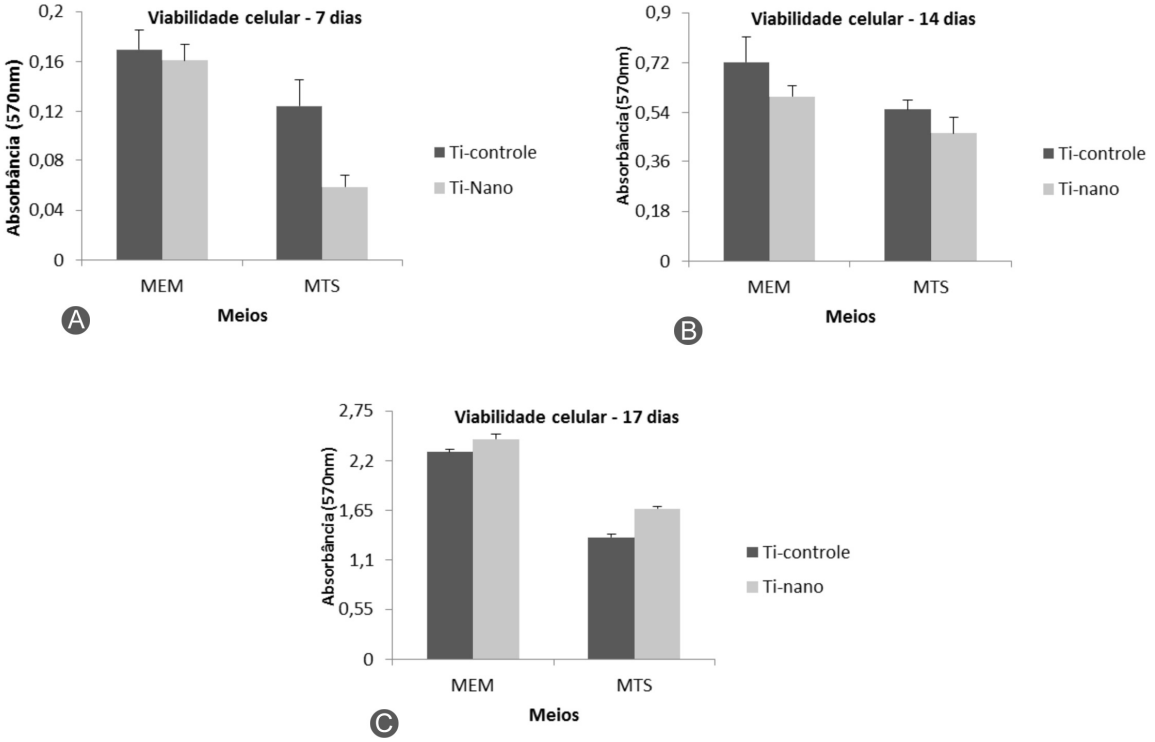

Figura 11. Viabilidade de células da veia do cordão umbilical humano sobre superfícies de discos de titânio polido (Ti-controle) e nanotexturizado (Ti-nano) expostas a meio de cultura não osteogênico (MEM) e osteogênico (MTS) em 7 (A),14 (B) e 17 (C) dias. Valores apresentados como média ± desvio padrão.

5.2.2 Atividade de fosfatase alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi maior no grupo de células cultivadas em Ti-nano e em meio osteogênico após 7 dias de cultura, com significância de $p<0,05$. Já no grupo de células cultivadas em meio não osteogênico, as cultivadas sobre Ti-nano também apresentaram maior atividade de ALP mas sem significância estatística. Aos 14 dias de cultura, não houveram diferenças entre os grupos; já após 21 dias, não houveram diferenças significativas entre as superfícies polidas e nanotexturizadas, mas os dois grupos cultivados

em meio osteogênico apresentaram aumento significativo de atividade de ALP quando comparado aos grupos cultivados em MEM (Figura 12).

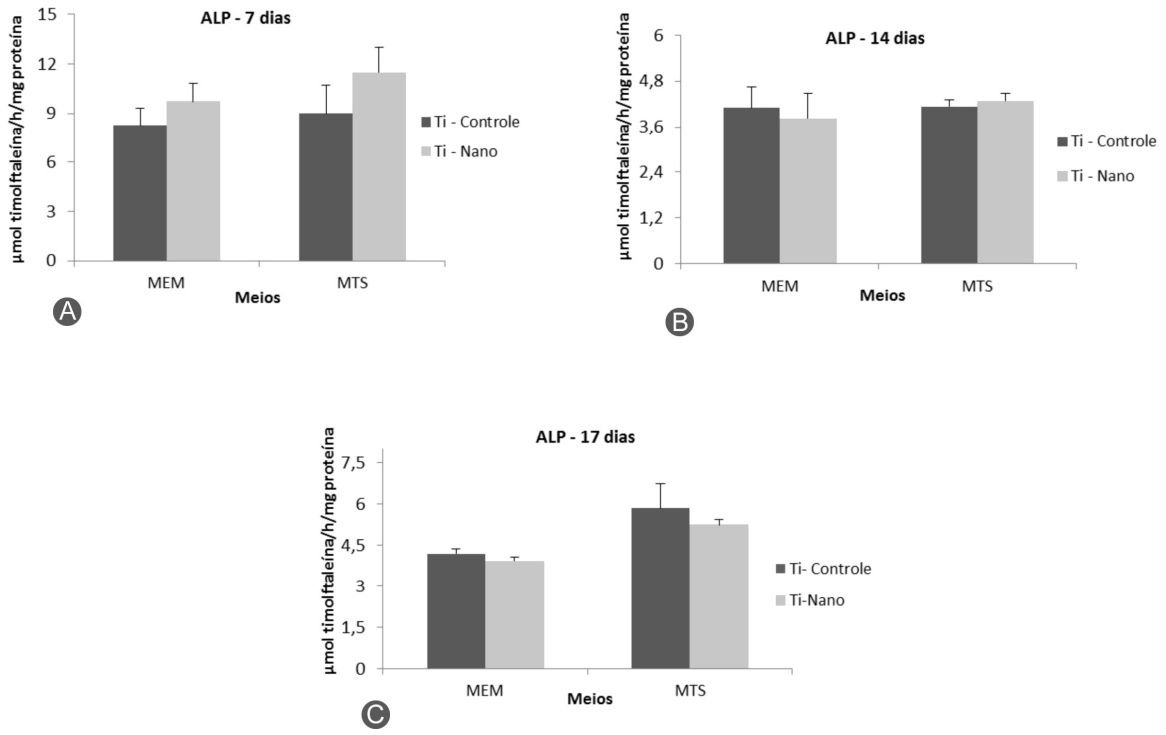

Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina em células do cordão umbilical humano cultivadas sobre discos de titânio polido (Ti-controle) e nanotexturizados (Ti-nano) expostas a meio de cultura não osteogênico (MEM) e osteogênico (MTS) em 7 (A),14 (B) e 17 (C) dias. Valores apresentados como média ± desvio padrão

5.2.3 Detecção de nódulos de mineralização

O aspecto macroscópico da marcação por vermelho de alizarina revelou áreas difusas desprovidas de nódulos de matriz mineralizada nos grupos cultivados em meio não osteogênico (Figura 13). Já nos grupos cultivados em meio osteogênico, foi observada a presença de nódulos mineralizados em maior quantidade nos discos de titânio

nanotexturizado. Os nódulos neste grupo se apresentaram bem delimitados e distribuídos por toda a área do disco.

Figura 13. Aspecto macroscópico da cultura de células do cordão umbilical humano cultivadas sobre discos de titânio polidos (Ti- controle) (A) e nanotexturizados (Ti-nano) (B) em meio não osteogênico (MEM); discos de titânio polidos (Ti-controle)(C) e nanotexturizados (Ti- nano) (D) cultivadas em meio osteogênico (MTS) coradas por vermelho de alizarina aos 17 dias de cultura.

5.3 Avaliação da integridade do RNA total

A qualidade das amostras de RNA total dos quatro grupos experimentais (Ti-controle e Ti-nano) em meio osteogênico e não osteogênico foi avaliada pelo *Bioanalyzer 2100* da *Agilent* (Figura 14).

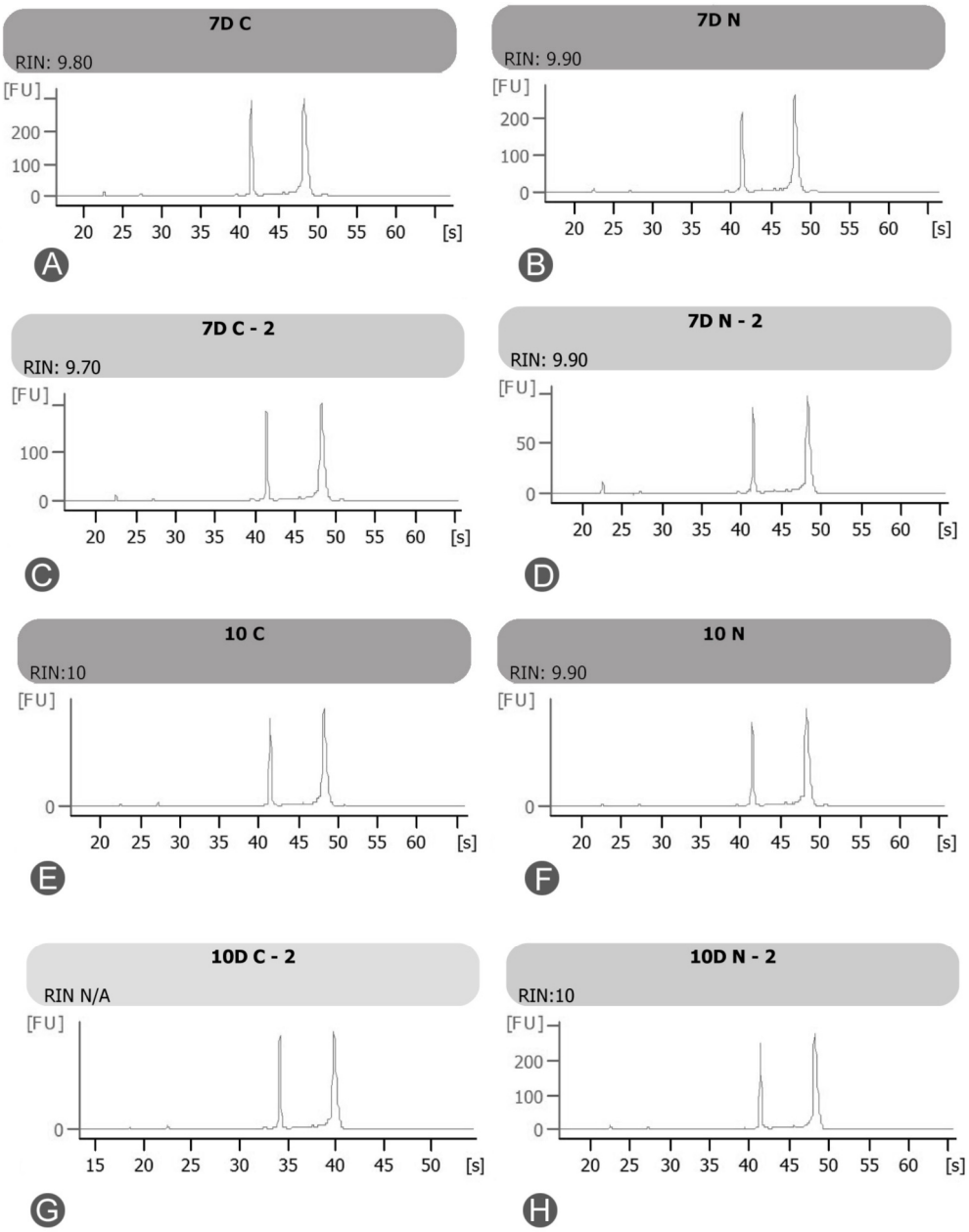

Figura 14. Avaliação da integridade das amostras de RNA das células da veia do cordão umbilical humano aos 7 dias: A discos de titânio polidos (Ti-controle) e B. discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM); C. discos de titânio polidos (Ti-controle) e D.discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio osteogênico (MTS). Aos 10 dias: E. discos de titânio polidos (Ti-controle) e F. discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM); G. discos de titânio polidos (Ti-controle) e H discos nanotexturizados (Ti-nano) em meio osteogênico (MTS).

5.4 Expressão gênica quantitativa

Aos 7 dias de cultura, a expressão do gene ALP foi menor nas células cultivadas sobre Ti-nano quando comparado à superfície polida em meio não osteogênico; já em MTS, as superfícies não influenciaram a expressão deste gene, não apresentando diferença estatística. Aos 10 dias não houveram diferenças estatisticamente significantes. A expressão do gene BMP2 foi estatisticamente maior no grupo cultivado sobre Ti-nano em meio não-osteogênico aos 7 dias de cultura. Já em meio osteogênico, a expressão foi maior na superfície controle tanto aos 7 como aos 10 dias de cultura.

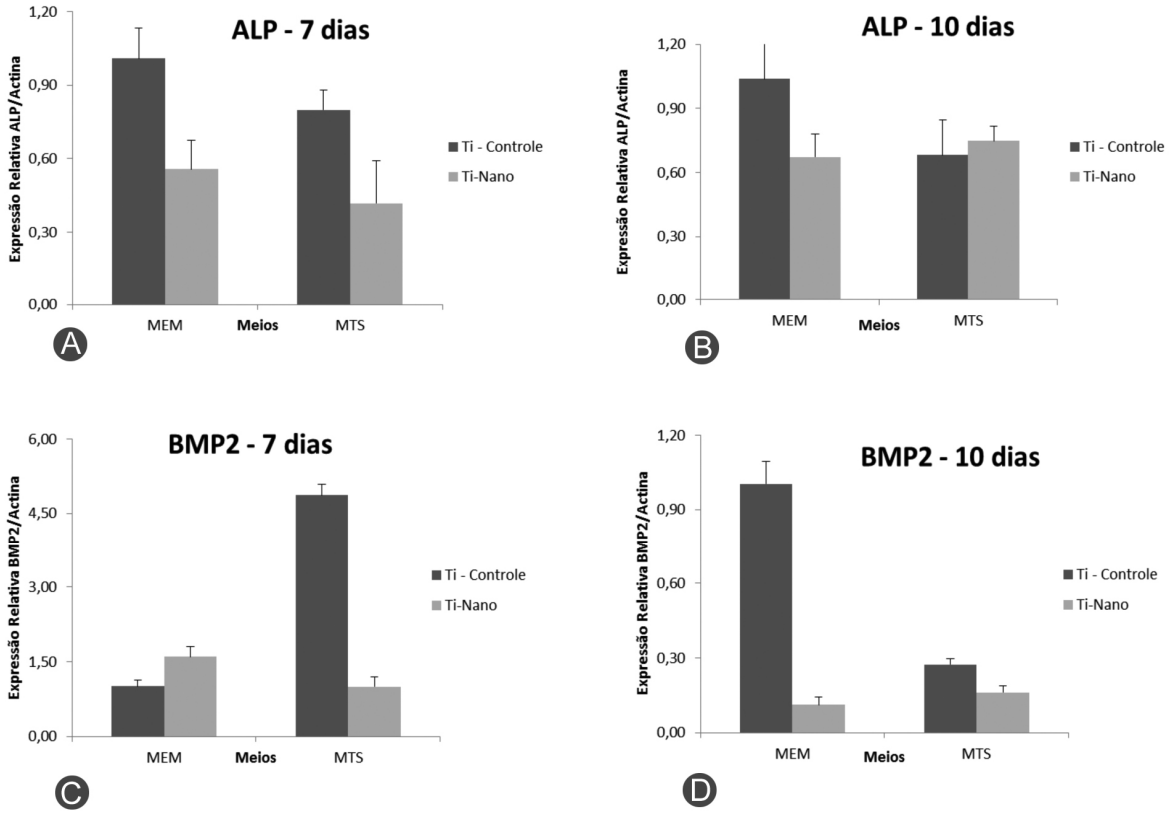

Figura 15. Expressão relativa de RNAm para os genes ALP (A; B), BMP2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células da veia do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo).

A expressão dos genes ITG1 e ITGA2 foi significativamente maior nas células cultivadas sobre Ti-nano em meio não-osteogênico aos 7 dias de cultura, com diferença estatisticamente significante ($p<0.05$). Aos 10 dias, a expressão destes genes foi menor nas células em contato com a superfície texturizada na presença do mesmo meio. Já quando foi utilizado um meio diferenciador, foi observado um aumento significativo da expressão do ITG1 e do ITGA2 nas células cultivadas sobre superfícies nanotexturizadas após 10 dias de cultura. Neste mesmo período, os referidos genes apresentaram menor expressão na presença do meio indiferenciado.

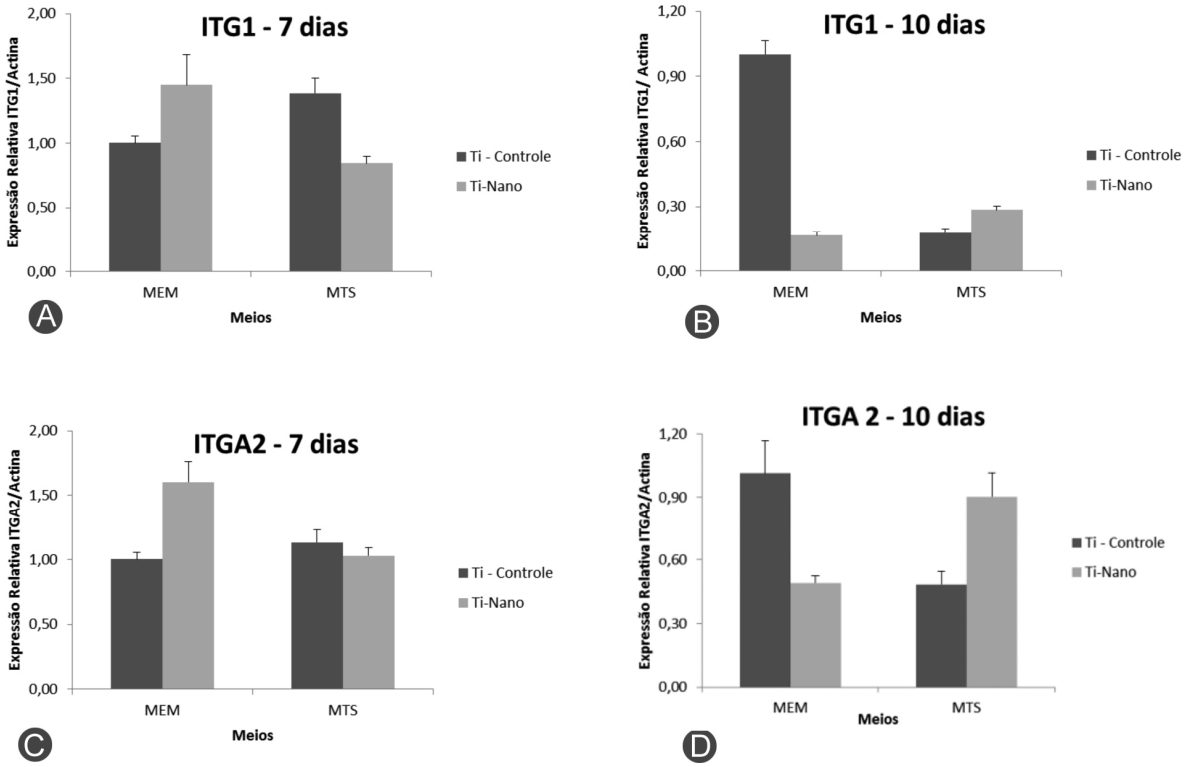

Figura 16. Expressão relativa de RNAm para os genes ITGA1 (A; B) e ITGA2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células da veia do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo).

A expressão do gene FN1 foi significativamente menor aos 7 dias de cultura das células em meio osteogênico em superfície nanotexturizada de titânio. Por outro lado, aos 10 dias foi observada uma inversão, com aumento da expressão deste gene nas condições citadas anteriormente. Em relação ao gene Runx2, foi possível observar que a superfície condicionada favoreceu a sua expressão aos 7 dias em meio não osteogênico e aos 10 dias em meio osteogênico.

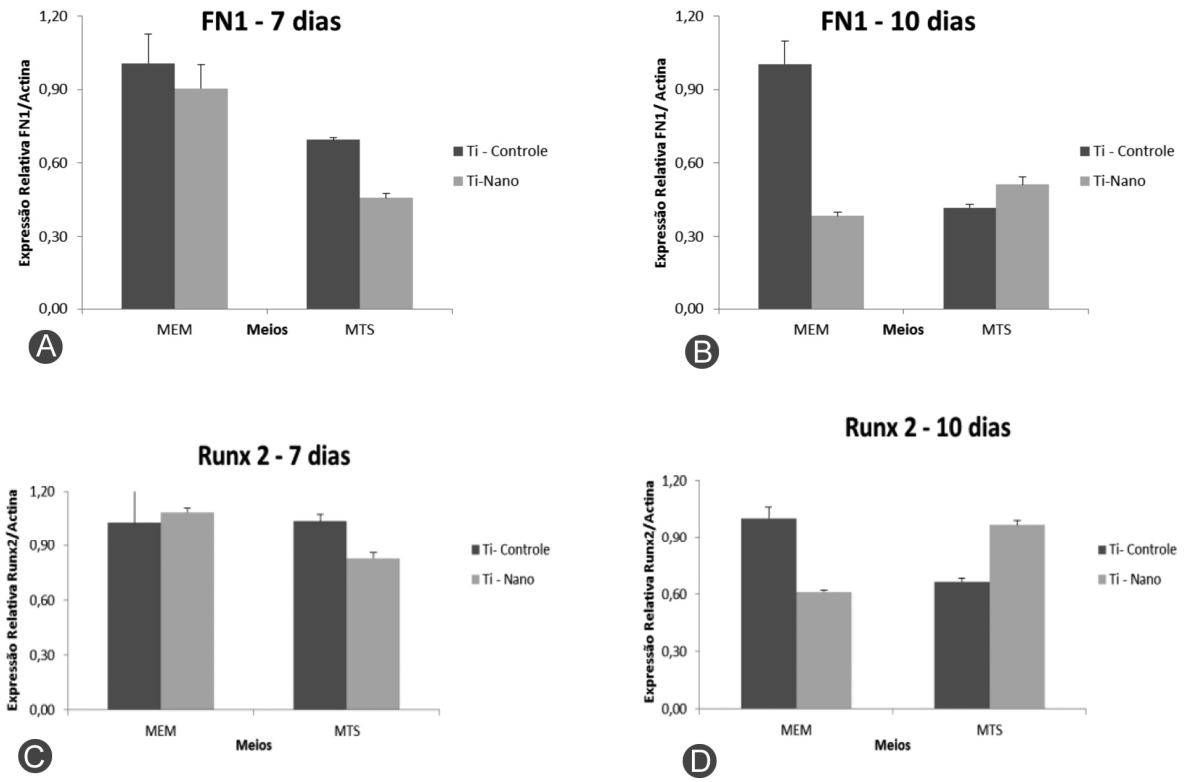

Figura 17. Expressão relativa de RNAm para os genes FN1(A; B) e Runx2 (C; D) aos 7 e 10 dias de células do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo).

A expressão do gene CASP7 também seguiu a mesma tendência dos genes anteriormente citados. Aos 7 dias a superfície nanotexturizada promoveu um aumento

significativo da expressão do CASP7 em meio indiferenciado, assim como aos 10 dias em meio osteogênico. Houve uma diminuição significativa na sua expressão aos 10 dias no grupo Ti-nano em meio não-osteogênico.

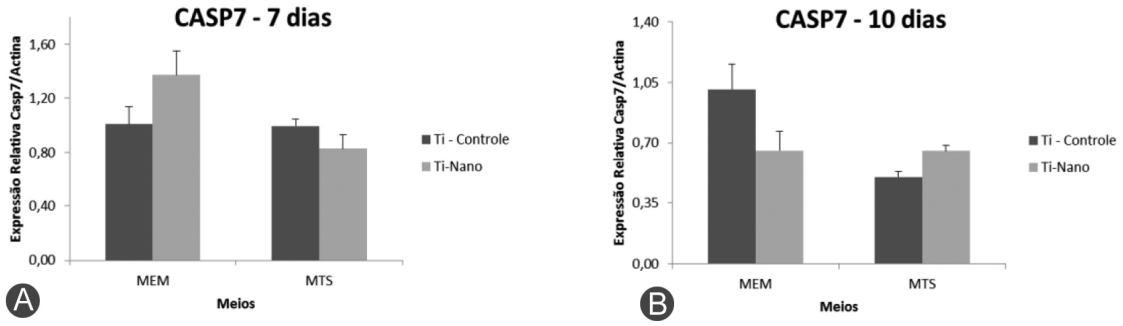

Figura 18. Expressão relativa de RNAm para o gene CASP7 aos 7 (A) e 10 (B) dias de células do cordão umbilical humano crescidas sobre discos de titânio polidos (Ti- Controle) e tratado (Ti-nano) em meio não osteogênico (MEM) e meio osteogênico (MTS).Valores apresentados como média ± desvio padrão. Teste estatístico de Kruskal-Wallis (tabelas de comparações na Seção Anexo).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Muitos estudos mostram que as pesquisas envolvendo células-tronco mesenquimais vem despertando interesse na odontologia e medicina, trazendo avanços na área de implantodontia e reabilitação oral. Portanto, a utilização de células mesenquimais do cordão umbilical pode ter implicações terapêuticas, devido à sua facilidade de obtenção e armazenamento (Ende, 1999), além de apresentarem-se em grande quantidade e potencial proliferativo (Petsa e cols., 2009). O potencial de diferenciação celular é variado, podendo ser induzidas a se diferenciarem em adipócitos, células ósseas, musculares, cartilaginosas, endoteliais ou neuronais (Weiss e cols., 2008; Fan e cols., 2011). As células-tronco do cordão umbilical podem ser isoladas do sangue, da geléia de Wharton, ao redor dos vasos e da camada subendotelial da veia (Weiss cols., 2008). O isolamento das células indiferenciadas a partir da veia do cordão umbilical foi descrita primeiramente por Romanov e cols. (2003); a partir deste estudo, vários autores demonstraram que a população de células isoladas da veia do cordão umbilical era similar àquela isolada da medula óssea na morfologia, capacidade de diferenciação e marcadores imunofenotípicos (Covas e cols., 2003; Kim e cols., 2004; Kadivar e cols., 2006; Ishige e cols., 2009). Por estas razões, essa fonte de células-tronco passou a ser pesquisada buscando sua aplicação clínica em terapias celulares.

A terapia celular para promover a regeneração óssea é um exemplo de que é possível regenerar osso sem a utilização de enxertos ósseos, com a utilização de um biomaterial. Desde que se iniciou o interesse pela bioengenharia tecidual, a literatura tem se enriquecido com vários estudos sobre uso de biomateriais associados com células e biomoléculas na indução da osteogênese (Ozec e cols., 2006; Gastaldi e cols., 2009). O titânio é um biomaterial que apresenta boas propriedades mecânicas e biocompatibilidade (Lavenus e cols., 2011), porém ainda é um desafio para o sucesso da implantodontia a osseointegração. Para tanto,

tratamentos sobre a superfície do titânio têm sido feitos a fim de melhorar a diferenciação e adesão celular (Alves e cols., 2005; Kaivosoja e cols., 2013).

Diferentes estudos tem mostrado variados padrões de topografia e que nanosuperfícies podem modular a resposta osteoblástica da adesão celular e formação de matriz extracelular mineralizada. (Hori e cols., 2011; Oh e cols., 2009; Vetrone e cols., 2009; De Oliveira e cols., 2007). Além disso, a superfície de titânio favorece a diferenciação osteoblástica em células crescidas sobre condições osteogênicas e não osteogênicas. (De Oliveira & Nanci, 2004).

Honsawek e cols. (2006) estudaram a proliferação de células provenientes do cordão umbilical, comprovando sua diferenciação osteogênica a partir de estímulos químicos no meio. As células do cordão umbilical cultivadas sobre a superfície nanotexturizada em meio osteogênico e não-osteogênico apresentaram redução em sua viabilidade aos 7 e 14 dias; aos 17 dias a proliferação foi significativamente maior. A partir destas observações, sugere-se que no nosso estudo, o tipo de meio não interfere na viabilidade, mas sim a superfície onde foram cultivadas as células.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi maior nos grupos cultivados sobre a superfície nanotexturizada do titânio em meio osteogênico e não osteogênico, principalmente aos 7 dias. Já aos 14 dias, não houveram diferenças significativas. Existem trabalhos mostrando que nenhuma diferença estatisticamente significante pode ser observada na expressão da ALP com a alteração química ou aumento da rugosidade superfície do titânio (Deligianni e cols., 2001; Mustafa e cols., 2001; Xavier e cols., 2003). Porém, Rosa & Belotti (2003) mostraram que a atividade de ALP pode ser afetada pela composição química do titânio, sugerindo que o titânio puro otimizaria a diferenciação osteoblástica de células da medula óssea de rato. Honsawek e cols. (2006) demonstraram que o meio osteogênico tem maior potencial estimulatório sobre a atividade de fosfatase alcalina. A detecção de nódulos

mineralizados foi maior nas culturas de células osteoblásticas cultivadas sobre as superfícies nanotexturizadas. Xavier e cols. (2003) demonstraram que a formação de nódulos de cálcio foi maior nas superfícies de titânio usinadas sem nenhum tipo de tratamento de superfície. Porém, Rosa e cols., (2003) observaram que a composição química do titânio em culturas de células de medula óssea de ratos não afeta a formação de nódulos calcificados.

O estudo dos genes associados ao metabolismo celular também revelou diferenças na sua expressão quantitativa analisada por meio de PCR em tempo real. O gene que codifica a proteína fosfatase alcalina (ALP) mostrou uma menor expressão no grupo de células cultivadas sobre a superfície nanotexturizada em ambos os meios utilizados. Já aos 10 dias, houve uma tendência ao aumento da expressão deste gene no grupo de células cultivados sobre o titânio nanotexturizado em meio osteogênico. A fosfatase alcalina é uma proteína associada com o processo de mineralização e um elevado nível desta proteína está associado com a remodelação óssea. Artigos na literatura demonstram o favorecimento da expressão deste gene em células osteoblásticas derivadas do sangue do cordão umbilical quando cultivadas em meio osteogênico sobre biomateriais como polímeros (Mekala e cols., 2013).

As proteínas morfogenéticas (BMPs) desempenham uma função importante no crescimento e diferenciação de alguns tipos de células, incluindo osteoblastos (Fromigué e cols., 1998; Kessler e cols., 2000). Devido a seus resultados benéficos na diferenciação de células ósseas, as BMPs são empregadas para acelerar a cicatrização ao redor dos implantes ósseos (Asahia e cols, 1997; Kirker-Head, 2000; Ong e cols, 1999). O gene BMP2 codifica uma proteína originalmente nomeada devido a suas propriedades osteocondutivas, sendo que sua concentração pode influenciar a miogênese, adipogênese, condrogênese e osteogênese (Rogers e cols, 2015). No presente estudo foi observada uma maior expressão quantitativa deste gene nas células indiferenciadas cultivadas sobre o titânio nanotexturizado em meio não osteogênico, sugerindo que a ausência do estímulo químico não influenciou na expressão

deste gene. A expressão dos genes ITGA1 e ITGA2 foi significativamente maior aos 7 dias nas células indiferenciadas cultivadas sobre a nanotextura em meio não osteogênico; já aos 10 dias, estes resultados foram significativos e observados nas células cultivadas em Ti-nano sobre meio osteogênico. Estes genes codificam proteínas essenciais para a adesão celular à matriz, além de terem papéis significativos na proliferação, divisão, diferenciação e apoptose.

O gene FN1 codifica uma proteína essencial para promoção da adesão e espraiamento celular denominada fibronectina. Relatos recentes observaram o efeito sinérgico desta proteína em culturas de células osteoblásticas sobre biomateriais como hidroxiapatita (Hindié e cols., 2014). Neste estudo pode ser notado que somente no período de 10 dias houve um aumento da expressão quantitativa de FN1 no grupo de células cultivadas sobre Ti-nano em meio osteogênico quando comparado aos outros grupos. Já o gene Runx2 codifica uma proteína que promove a diferenciação de células mesenquimais em pré-osteoblastos capazes de expressar marcadores iniciais da osteogênese, como a ALP (Vimalraj e cols., 2015). No presente estudo, a expressão deste gene apresentou uma tendência à um aumento no grupo de células cultivadas sobre Ti-nano em meio não osteogênico aos 7 dias; já aos 10 dias, pode ser observado um aumento significativo desta expressão no grupo cultivado sobre Ti-nano em meio osteogênico.

Finalmente, foi analisada a expressão do gene CASP7 que codifica uma proteína da família das caspases, que agem como moléculas efetoras da morte celular (Utz & Anderson, 2000). Ao todo, 11 caspases humanas com diferentes especificidades foram identificadas, envolvidas principalmente na sinalização da apoptose e também no processamento de citocinas (Debatin & Krammer, 2004). Nossos dados mostram que no meio não osteogênico, as células cultivadas sobre Ti-nano apresentaram uma diminuição significativa na expressão de Casp7 aos 10 dias, enquanto que nas células cultivadas com meio osteogênico apresentaram uma diminuição desta expressão aos 7 dias e subsequente aumento em 10 dias.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, pode ser concluído que:

- A modificação da superfície do titânio por meio de condicionamento ácido pode alterar o metabolismo de células provenientes do cordão umbilical humano, assim como o tipo de meio (osteogênico e não-osteogênico) onde as células foram cultivadas;

- O contato de células do cordão umbilical humano com a superfície nantexturizada do titânio pode influenciar a expressão de genes associados ao metabolismo celular;

- Estudos posteriores devem ser realizados para explorar o potencial osteogênico das células do cordão umbilical humano na engenharia tecidual associada com biomateriais que possam ser modificados para uma melhor osseointegração.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Aigner J, Eblenkamp M, Wintermantel E. Techniques for functional tissue and organ replacement using postnatal stem cells. Chirurg. 2005;76:435–44.

2. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: part 1 review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. Int J Prosthodont 2004;17:536-543.

3. Alkindi, S.; Dennison, D. Umbilical cord blood banking and transplantation: a shot review. SQU Medical Journal. 2011;11 (4): 455-461.

4. Alves Jr C, Guerra Neto CLB, Morais GHS,Silva CF da, Hajek V. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. Surface and Coatings Technology. 2005;2(3):196-202.

5. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, Van Den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. J Bone Joint Surg Am 2003;85-A:1927–1935.

6. Asahina I., Watanabe M., Sakurai N., Mori M., Enomoto S.Repair of bone defect in primate mandible using a bone morphogenetic protein (BMP)-hydroxyapatite-collagen composite. J Med Dent Sci, 1997; 44: 63–70

7. Bahl A, Bakhshi S. Umbilical cord blood transplant for malignancies: a hope or hype. Indian J Pediatr. 2013;80(8):675-80.

8. Baxter LC, Frauchiger V, Textor M, Gwynn I, Richards RG. Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. Eur Cell Mater 2002,4:1-17.

9. Bhola R, Su F, Krull CE. Functionalization of titanium based metallic biomaterials for implant applications. J Mater Sci Mater Med. 2011 J Mater Sci Mater Med.;22(5):1147-59.

10. Bieback K, Kern S, Klu¨ter H et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells. 2004;22: 625– 634.

11. Bieback K, Kluter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood, Curr Stem. Cell Res Ther. 2007;2:310-23.

12. Bombonato-Prado KF, Rosa AL, Oliveira PT, Dernowsek JA, Fontana V, Evangelista AF, Passos GA. Transcriptome Analysis During Normal Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. Transcriptomics in Health and Disease. 2014; 6:109-121.

13. Bonfante EA, Granato R, Marin C, Suzuki M, Oliveira SR, Giro G, Coelho PG. Early bone healing and biomechanical fixation of dual acid-etched and as-machined implants with healing chambers: an experimental study in dogs. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011; 26(1): 75-82.

14. Bozzini B, Carlino P, D'Urzo L, Pepe V, Mele C, Venturo F. An electrochemical impedance investigation of the behaviour of anodically oxidised titanium in human plasma and cognate fluids,relevant to dental applications. J Mater Sci Mater Med. 2008;19:3443–53.

15. Braceras I, Maeztu MADe, Alava JI, Gay-Escoda C. In vivo low-density bne appostion on diferente implant surfasse materials. Int J of Oral and Maxiofacial Surgery. 2009; 38 (3): 274-8.

16. Bruder SP, Kurth AA, Shea M et al. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1998;16:155–162.

17. 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.

18. Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. Tissue Eng Part B Reviews. 2009; 16:219–55.

19. Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. Int J Oral Maxillofac Implants. 1998;13:163-174.

20. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Rs. 2003; 36:1179-1183.

21. Debatin KM; Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. Oncogene. 2004; 23: 2950–2966.

22. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Human Bone Marrow Cell Adhesion, Proliferation, Differentiation and Detachment Strength. Biomaterials. 2001; 22:87–96.

23. 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.

24. 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.

25. De Robertis E.D.P., De Robertis E.M.F. Bases da Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2006;4ª ed.

26. Dimitrievska S, Bureau MN, Antoniou J, Mwale F,Petit A, Lima RS, Marple BR. . Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation.*J Biomed Mater Res A* 2011; 98:576–588.

27. Divya Rani VV, Manzoor K,Menon D, Selvamurugan N, Nair SV. The design of novel nanostructures on titanium by solution chemistry for an improved osteoblast response.*Nanotechnology.* 2009; 20:195101–195111

28. Eblenkamp M, Aigner J, Hintermair J, et al. Umbilical cord stromal cells (UCSC). Cells featuring osteogenic differentiation potential. Orthopade. 2004; 33:1338–45.

29. Ellingsen e col. Improved retention and bone implant contact with fluoride modified titanium implant. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19: 659-66

30. Ende N, Lu S, Mack R, Ponzio NM. The feasibility of using blood bank-stored (4 degrees C) cord blood, unmatched for HLA, for marrow transplantation. Am J Clin Pathol. 1999; 111:773–781

31. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. II. Etiopathogenesis. Eur J Oral Sci. 1998; 106:721–64.

32. Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic Potentials of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord. Stem Cell Rev Rep. 2011;7:195–207.

33. Fritz V, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: an emerging tool for cancer targeting and therapy. Curr Stem Cell Res Ther. 2008;3:32-42

34. Fromigue O, Marie PJ, Lomri A. Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. J Cell Biochem. 1998;68:411-26.

35. Fu YS, Cheng YC, Lin MY et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: Potential therapeutic application for Parkinsonism. Stem Cells. 2006;24:115–124.

36. Gastaldi G, Asti A, Scaffino MF, Visai L, Saino E, Cometa AM, Benazzo F. Human adiose-derived stem cells (hASCs) proliferate and differentiate in osteoblast-like cells on trabecular titanium scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2010; 94 (3):790-799,

37. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A,Anderson DM, McLachlan T, Stephan I, Geis-Gerstorfer J, Sandhage KH,Fedorov AG, Rupp F,Boyan BD, 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: 6268–6277.

38. Gu J, Liu N, Yang X, Feng Z, Qi F. Adiposed-derived stem cells seeded on PLCL/P123 eletrospun nanofibrous scaffold enhance wound healing. Biomed Mater. 2014;9(3):03512.

39. Hindié M, Camand E, Agniel R, Carreiras F, Pauthe E, Van Tassel P. Effects of human fibronectin and human serum albumin sequential adsorption on preosteoblastic cell adhesion. Biointerphases. 2014 ;9(2):029008.

40. Honsawek S, Dhitiseith D, Phupong V. Effects of demineralized bone matrix on proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. J Med Assoc Tha. 2006;3:189-95.

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

42. Ishige, I Nagamura – Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R,Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A. Comparison of mesenchymal stem cell derived from arterial, venous, and Wharton´s jelly explants of human umbial cord. Int J Hematol. 2009; 90(2):261-9

43. Johnssen SP, Sorensen HT, Lucht U, Soballe K, Overgaard S, Pedersen AB. Patientrelated predictors of implant failure after primary total hip replacement in the initial,short and longterms. A nationwide Danish follow-up study including 36,984 patients. J Bone Joint Surg Br.2006; 88 (10):1303–8.

44. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghinkhni M,Soleimani M: In vitro cardiomyogenic potencial of human umbilical vein –derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys res Commun. 2006; 340:639-647.

45. Kaivosoja E, Myllymaa S, Takakubo Y, Korhonen H, Myllymaa K, Konttinen YT, Lappalainen R, Takagi M. Osteogenesis of human mesenchymal stem cells on micro-patterned surfaces. J Biomater Appl. 2013; 27 (7):862-71.

46. Kannan S, Wu M. Respiratory stem cells and progenitors: overview, derivation, differentiation, carcinogenesis, regeneration and therapeutic application. Curr Stem Cell Res Ther. 2008;1:37-46.

47. Kessler S., Kastler S., Mayr-Wohlfart U., Puhl W.,. Günther K.P. Stimulation primärer Osteoblastenkulturen mit rh-TGF-β, rh-bFGF, rh-BMP 2 und rx-BMP 4 in einem In vitro-Modell [Stimulation of primary osteoblast cultures with rh-TGF-beta, rh-bFGF, rh-BMP 2 and rx-BMP 4 in an in vitro model. Orthopade. 2000; 29: 107–111

48. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, Kyurkchiev S. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biol Int. 2008;32(7):724-32

49. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM,Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. Ann Hematol. 2004;83:733-8.

50. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins.Adv Drug Deliv Rev. 2000;43(1):65-92.

51. Ko¨gler G, Sensken S, Airey JA et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med. 2004;200:123–135.

52. Kubies D, Himmlová L, Riedel T, Chánová E, Balík K, Douděrová M, Bártová J, Pešáková V. The interaction of osteoblasts with bone-implant materials: 1. The effect of physicochemical surface properties of implant materials. Physiol Res. 2011; 60(1):95-111.

53. Kriparamanan R, Aswath P, Zhou A, Tang L, Nguyen KT. Nanotopography: cellular responses to nanostructured materials. J Nanosci Nanotechnol. 2006;6(7):1905-19.

54. Lavenus S, Berreur M,Trichet V, Pilet P, Louan G, Layrolle P. Adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on titanium nanopores. Eur Cell Mater. 2011; 22:84-96.

55. Lima, JHC, Elias, CN, Meireles, LA. Cap 16: Osseointegração em diferentes tipos de suerficie dos implantes osseointegraveis. In: Odontologia: arte e conhecimento. Rielson Jose Alves Cardoso e Manoel Eduardp de Lima Machado editores. São Paulo: Editora Artes Médicas Ltda. 2003: 353-65.

56. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.Methods. 2001;25(4):402-8.

57. Liu XD, Liu B, Li XS. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from perfusion of human umbilical cord vein. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2007;5:1019-22.

58. Lowry OH, RoseBrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-75.

59. Marconi Gonzaga Tavares, Paulo Tambasco de Oliveira Antonio, Nanci Ana Carolina Hawthorne, Adalberto Luiz Rosa Samuel Porfírio Xavier. Treatment of a commercial, machined surface titanium implant with H2SO4/ H2O2 enhances contact osteogenesis. Clin. Oral Impl. Res. 2007; 18 : 452–458.

60. Mareschi K, Biastin L, Piacibello W et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. Haematologica 2001;86:1099 –1100.

61. Martin J. Y, Schwartz Z., Hummert T. W. et al.Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). Journal of Biomedical Materials Research.1995; 29(3): 389–401.

62. Mekala NK, Baadhe RR, Parcha SR. Study on osteoblast like behavior of umbilical cord blood cells on various combinations of PLGA scaffolds prepared by salt fusion. Curr Stem Cell Res Ther. 2013;8(3):253-9.

63. Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. 2010. The combination of micron and nanotopography by H(2)SO(4)/H(2)O(2) treatment and its effects on osteoblast-specific gene expression of hMSCs. *J Biomed Mater Res A* . 2010; 94:169–179.

64. Menon D, Divyarani VV,Lakshmanan VK, Anitha VC, Koyakutty M, Nair SV. Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. *Acta Biomater.* 2012; 8 (5): 1976- 89.

65. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003;21:50–60.

66. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. Adv Dental Res. 2011; 23(3): 275–9.

67. Montanaro L, Arciola CR, Campoccia D, Cervellati M. In vitro effects on MG63 osteoblast-like cells following contact with two roughness-differing fluorohydroxyapatite-coated titanium alloys. Biomaterials. 2002; 23: 3651–3659.

68. Mustafa K., Wennerberg A., Wroblewski J., Hultenby K., Lopez B.S., Arvidson K. Determining optimal surface roughness of TiO_2 blasted titanium implant material for attachment, proliferation and differentiation of cells derived from human mandibular alveolar bone. Clin. Oral Implants Res. 2001;12:515–525.

69. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, et al. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. Placenta. 1997; 18:53–64.

70. Nascimento GC, Bighetti RL, Passos GA, Bombonato-Prado KF. . Behavior of mesenchymal stem cells from human umbilical cord vein during osteoblastic differentiation. Braz Dental Science 2014;17 (3): 31- 38

71. Nimura T, Muneta T, Koga H. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: Comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. Arthritis Rheum. 2008, 31:501-10.

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

73. Ong J.L., Bess E.G, Bessho K.Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelopeptide type I collagen in vitro. J Oral Implantol. 1999; 25 (2): 95–100.

74. Ozeç Y, Oztürk M, Kýlýç E, Yeler H, Göze F, Gümüs C. effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on mandibular distraction ostogenesis. J Craniofac Surg 2006.17 (1): 80-3.

75. Palaiologou A, Stoute D, Fan Y, Lallier T. Altered Cell Motility and Attachmentwith Titanium Surface Modifications. J Periodontology. 2012; 83 (1): 90-100.

76. Popa MV, Vasilescu E, Drob P, Vasilescu C, Demetrescu I,Ionita D. Long-term assessment of the implant titanium material—artificial saliva interface. J Mater Sci Mater Med. 2008; 19:1–9.

77. Qu Z, Rausch-Fan X, Wieland M, Matejka M, Schedle A. The initial attachment and subsequent behavior regulation of osteoblasts by dental implant surface modification. J Biomed. Mater. Res. 2007; 82 (3): 658-68.

78. Rausch-fan X, Qu Z, Wieland M, Matejka M, Schedle A. Differentiation and cytokine synthesis of human alveolar osteoblasts compared to osteoblast-like cells (MG63) in response to titanium surfaces. Dental Materials.2008; 24: 102-110.

79. Rogers MB, Shah TA, Shaikh NN. Turning bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on and off in mesenchymal cells. J Cell Biochem. 2015.

80. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 2003;21:105–10.

81. Rosa AL, Beloti MM. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. Clin oral Implants Res. 2003; 14 (1):43-8.

82. Rubinstein P, Rosenfeld RE, Adamson JW et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. Blood 1993;81:1679 –1690.

83. Sandrini E, Chiesa R, Rondelli G, Santin M, Cigada A. A novel biomimetic treatment for an improved osteointegration of titanium. J Appl Biomat Biomech. 2003;1:33-42.

84. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. Stem Cells. 2005;23:220-9.

85. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. Methods Cell Biol. 2008;86:101–19.

86. Schuler M, Trentin D, Textor M, Tosatti SG. Biomedical interfaces: titanium surface technology for implants and cell carriers. Nanomed 2006;1:449-463.

87. Teixeira ER. In: Polido W, Dinato C. Implantes Osseointegrados: Cirurgia e Prótese. São Paulo: Artes Médicas, 2001; 63-80,

88. Vandamme K, Holy X, Bensidhoum M, Logeart-Avramoglou D, Naert IE, Duyck JA,Petite H. In vivo molecular evidence of delayed titanium implant osseointegration in compromised bone. Biomaterials. 2011; 32(14):3547-54.

89. 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.

90. Vetrone F, Variola F, de Oliveira PT, Zalzal SF, Yi JI, Sam J, Bombonato-Prado KF,Sarkissian A, Perepichka DF, Wuest JD, Rosei F, and Nanci A. Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate. Nano Lett., 2009; 9 (2): 659-665.

91. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation.Int J Biol Macromol. 2015; 13;78:202-208.

92. Utz PJ, Gensler TJ, Anderson P. Death, autoantigen modifications, and tolerance. Arthritis Res. 2000;2(2):101-14.

93. Wang HS, Hung SC, Peng ST et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells. 2004;22: 1330–1337.

94. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. Stem Cells. 2008; 26:2865–74

95. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord blood and mobilized adult blood are not. Br J Haematol. 2003;121:368 – 374

96. Xavier SP, Carvalho PSP, Beloti MM, Rosa AL. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. J Dent. 2003; 31:173–180.

97. 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.

98. Ziegel, E.; Cranley, M. S. Enfermagem obstétrica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1985;8:696.

99. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells Mol Biol Cell. 2002; 13(12):4279-95.

ANEXOS

ANEXOS

Tabela 1. Comparações entre as amostras para viabilidade celular pelo pós-teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Controle MEM x Nano MTS	<0,001	S
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MEM	0,381	NS
Nano MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MEM x Controle MTS	0,002	S
Controle MTS x Nano MTS	<0,001	S
Comparações	**P**	**14 dias**
Controle MEM vs. Nano MTS	<0,001	S
Controle MEM x. Controle MTS	0,001	S
Controle MEM x Nano MEM	0,005	S
Nano MEM x Nano MTS	0,007	S
Nano MEM x Controle MTS	0,231	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,032	S
Comparações	**P**	**17 dias**
Nano MEM x Controle MTS	<0,001	S
Nano MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MEM x Controle MEM	0,236	NS
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MTS x Controle MTS	0,017	S

Tabela 2. Comparações entre as amostras de ALP pelo pós-teste de Student- Neuman- Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Nano MTS x Controle MEM	0,009	S
Nano MTS x Controle MTS	0,027	S
Nano MTS x Nano MEM	0,058	NS
Nano MEM x Controle MEM	0,25	NS
Nano MEM x Controle MTS	0,41	N
Controle MTS x Controle MEM	0,428	NS
Comparações	**P**	**14 dias**
Controle MTS x Nano MEM	0,06	NS
Controle MTS x Controle MEM	0,06	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,06	NS
Nano MTS x Nano MEM	0,06	NS
Nano MTS x Controle MEM	0,06	NS
Controle MEM x Nano MEM	0,06	NS
Comparações	**P**	**17 dias**
Controle MTS x Nano MEM	<0,001	S
Controle MTS x Controle MEM	<0,001	S
Controle MTS x Nano MTS	0,061	NS
Nano MTS x Nano MEM	0,001	S
Nano MTS x Controle MEM	0,003	S
Controle MEM x Nano MEM	0,394	NS

Tabela 3. Comparações entre as amostras para parâmetro de expressão do gene ALP pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**p**	**7 dias**
Controle MEM x Nano MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MEM	0,003	S
Controle MEM x Controle MTS	0,069	S
Controle MTS x Nano MTS	0,009	S
Controle MTS x Nano MEM	0,041	S
Nano MEM x Nano MTS	0,213	NS
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Nano MTS	0,05	NS
Controle MEM x Nano MEM	0,05	NS
Controle MEM x Controle MTS	0,05	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,05	NS
Controle MTS x Nano MEM	0,05	NS
Nano MEM x Nano MTS	0,05	NS

Tabela 4. Comparações entre as amostras do gene BMP2 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Controle MTS x Nano MTS	<0,001	S
Controle MTS x Controle MEM	<0,001	S
Controle MTS x Nano MEM	<0,001	S
Nano MEM x Nano MTS	0,006	S
Nano MEM x Controle MEM	0,003	S
Controle MEM x Nano MTS	0,975	NS
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Nano MEM	<0,001	S
Controle MEM x Nano MTS	<0,001	S
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MTS x Nano MEM	0,005	S
Controle MTS x Nano MTS	0,018	S
Nano MTS x Nano MEM	0,254	NS

Tabela 5. Comparações entre as amostras do gene ITG1 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Nano MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MEM x Controle MEM	0,005	S
Nano MEM x Controle MTS	0,57	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,001	S
Controle MTS x Controle MEM	0,005	S
Nano MEM x Nano MTS	0,184	NS
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Nano MEM	<0,001	S
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MTS x Nano MEM	0,004	S
Nano MTS x Controle MTS	0,003	S
Controle MTS x Nano MEM	0,662	NS

Tabela 6. Comparações entre as amostras do gene ITGA2 2 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Nano MEM x Controle MEM	<0,001	S
Nano MEM x Nano MTS	<0,001	S
Nano MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MTS x Controle MEM	0,295	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,236	NS
Nano MTS x Controle MEM	0,752	NS
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MEM	<0,001	S
Controle MEM x Nano MTS	0,211	NS
Nano MTS x Controle MTS	<0,001	S
Nano MTS x Nano MEM	<0,001	S
Nano MEM x Controle MTS	0,923	NS

Tabela 7. Comparações entre as amostras do gene FN1 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Controle MEM x Nano MTS	0,02	S
Controle MEM x Controle MTS	0,02	S
Controle MEM x Nano MEM	0,05	NS
Nano MEM x Nano MTS	0,02	S
Nano MEM x Controle MTS	0,02	S
Controle MTS x Nano MTS	0,02	S
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Nano MEM	0,01	S
Controle MEM x Controle MTS	0,02	S
Controle MEM x Nano MTS	0,02	S
Nano MTS x Nano MEM	0,02	S
Nano MTS x Controle MTS	0,02	S
Controle MTS x Nano MEM	0,02	S

Tabela 8. Comparações entre as amostras do gene RUNX 2 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Nano MEM x Nano MTS	0,02	S
Nano MEM x Controle MEM	0,05	NS
Nano MEM x Controle MTS	0,05	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,02	S
Controle MTS x Controle MEM	0,05	NS
Controle MEM x Nano MTS	0,01	S
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Nano MEM	<0,001	Yes
Controle MEM x Controle MTS	<0,001	Yes
Controle MEM x Nano MTS	0,234	No
Nano MTS x Nano MEM	<0,001	Yes
Nano MTS x Controle MTS	<0,001	Yes
Controle MTS x Nano MEM	0,076	No

Tabela 9. Comparações entre as amostras do gene CASP7 pelo pós teste de Student-Neuman-Keuls. S=significante; NS=não significante. Os valores de p indicados correspondem aos obtidos no teste de Kruskal-Wallis.

Comparações	**P**	**7 dias**
Nano MEM x Nano MTS	0,001	S
Nano MEM x Controle MTS	0,008	S
Nano MEM x Controle MEM	0,004	S
Controle MEM x Nano MTS	0,222	NS
Controle MEM x Controle MTS	0,884	NS
Controle MTS x Nano MTS	0,132	NS
Comparações	**P**	**10 dias**
Controle MEM x Contole MTS	<0,001	S
Controle MEM x Nano MTS	0,002	S
Controle MEM x Nano MEM	<0,001	S
Nano MEM x Controle MTS	0,141	NS
Nano MEM x Nano MTS	0,972	NS
Nano MTS x Controle MTS	0,066	NS