UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da diferenciação osteoblástica *in vitro* sobre
superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos**

Olívia Cherubin Alves

Ribeirão Preto

2012

Olívia Cherubin Alves

**Análise da diferenciação osteoblástica *in vitro* sobre
superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto – USP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biologia Oral.

Orientador: Paulo Tambasco de Oliveira

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Olívia Cherubin

Análise da diferenciação osteoblástica *in vitro* sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos. Ribeirão Preto, 2012.

64p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: De Oliveira, Paulo Tambasco

1. Cultura de células. 2. Diferenciação celular. 3. Expressão gênica. 4. Osteoblastos. 5. Vidros bioativos. 6. Vitrocerâmicas bioativas.

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Olívia Cherubin Alves

Análise da diferenciação osteoblástica *in vitro* sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos.

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: ____ / ____ / 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adauto e Goreti, e irmãos, Natália e Victor, pelo apoio, amor incondicional, incentivo, compreensão e por tudo que fizeram por mim até hoje. Cheguei até aqui por vocês. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, representada pelo reitor Prof. Dr. João Grandino Rodas.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, representada pelo diretor Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado e auxílio à pesquisa concedidos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. PAULO TAMBASCO DE OLIVEIRA, pela orientação, a qual tive a imensa sorte de ter conseguido manter desde a iniciação científica, pela confiança, pela paciência, pela amizade e pela grande oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal que me proporcionou. Você é uma inspiração como pesquisador, cientista e mestre. Uma pessoa correta, simples e com um coração enorme que admiro muito! Muito obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por todo auxílio ao projeto, pela oportunidade de conviver e dividir conhecimentos, experiências e pela amizade. Foi uma honra tê-lo como co-orientador.

Aos colegas do curso de mestrado, tanto da turma da Biologia Oral quanto das de Reabilitação Oral e Cirurgia, pela oportunidade de conhecê-los, pela troca de experiências e amizade. Em especial à Gabriela, Cristiane e Juliana, pelo apoio, pelos momentos de alegria compartilhados e pela amizade especial que começamos. Sempre terão meu carinho, torço por vocês.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Células, Larissa Sverzut, Luciana Bastos, Willian, Tiago, Emanuella, Gabriela Rodrigues, Luciana Maia, Carolina, Samuel, Milla, Renan e Rogério, por todos os momentos que tornaram os dias de trabalho mais agradáveis.

Aos amigos queridos Larissa de Castro e Lucas Novaes. Não existem palavras para expressar o quanto sou grata por toda colaboração de vocês, em todos os sentidos. Vocês são parte do laboratório e indispensáveis para realização de todo nosso trabalho. Obrigada por toda atenção, por cada palavra de carinho nos momentos mais difíceis e pela amizade.

Ao querido amigo ROGER, por toda atenção, amizade e carinho. Agradeço por ter tido paciência e generosidade de me ensinar e ajudar a desenvolver o nosso trabalho. Mesmo nos momentos difíceis era muito bom saber que sempre podia confiar na sua ajuda. Sempre terá minha amizade e admiração. Obrigada por tudo!

À amiga Gabriela Alonso, por toda sua contribuição ao desenvolvimento do nosso trabalho, pela amizade e conhecimento compartilhado.

À querida amiga Fabíola Singaretti de Oliveira, pela orientação e ajuda indispensáveis na realização dos experimentos desse projeto. Obrigada pela paciência, pela amizade e carinho.

Aos queridos amigos, professores e alunos do Centro de Atendimento Especializado em Diagnóstico Oral (CAEDO), em especial à Profa. Dra. Suzie Aparecida de Lacerda e ao Prof. Dr. Luiz Guilherme Brentegani, que me deram a oportunidade desde a graduação até o treinamento no PAE, em contribuir com a minha formação como futura docente, permitindo consolidar minha realização como profissional e decisão quanto à prática da docência. Obrigada por toda disponibilidade, amizade e carinho. Sempre serei grata por todo apoio, incentivo e confiança. Sempre serão uma inspiração pra mim.

A toda minha família e ao Rafael, pelo amor e presença constante em minha vida.

RESUMO

ALVES, O.C. **Análise da diferenciação osteoblástica *in vitro* sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos.** 2012. 64p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos podem ser usados particulados ou como *scaffolds* em diferentes tratamentos de defeitos ósseos. Tratamentos térmicos que possibilitam o desenvolvimento de *scaffolds* a partir de composições de vidros bioativos introduzem fases cristalinas em sua estrutura amorfa com potencial impacto na bioatividade e biocompatibilidade do material. O objetivo do presente estudo foi avaliar, qualitativa e quantitativamente, o desenvolvimento do fenótipo osteogênico de culturas de células osteoblásticas sobre substratos vítreos e vitrocerâmicos bioativos. Células MC3T3-E1 foram cultivadas em condições osteogênicas por períodos de até 21 dias sobre superfícies de Bioglass® 45S5, de duas preparações de vitrocerâmica bioativa e altamente cristalina, Biosilicato® e Biosilicato® para *scaffold*, e de borossilicato (vidro bioinerte). Foram avaliados, nos períodos de 7, 12 e 21 dias, morfologia celular, formação de matriz mineralizada e expressão de genes relacionados à osteogênese. Os resultados mostraram confluência das culturas sobre as superfícies de vidros e vitrocerâmicas, com progressiva formação de multicamadas celulares. A quantificação de vermelho de Alizarina revelou aumento de mineralização para culturas sobre materiais bioativos, com os maiores valores para Biosilicato® para *scaffold*. Expressão diferencial de genes foi observada nos 3 períodos de culturas sobre os materiais vítreo e vitrocerâmicos bioativos em comparação ao vidro bioinerte e sobre as vitrocerâmicas em comparação ao vidro bioativo. Os resultados permitem concluir que modificações em aspectos químicos de materiais vítreos e vitrocerâmicos, com efeitos sobre sua bioatividade, resultam em alteração do potencial osteogênico e do perfil de expressão gênica de células osteoblásticas *in vitro*. A maior atividade osteogênica sobre o Biosilicato® para *scaffold* permite considerar esse material um potencial candidato para aplicações em defeitos ósseos.

Palavras-chave: cultura de células, diferenciação celular, expressão gênica, osteoblastos, vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativas.

ABSTRACT

ABSTRACT

ALVES, O.C. ***In vitro* osteoblastic differentiation on bioactive glass and glass-ceramic surfaces.** 2012. 64p. Thesis (Masters Degree) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Bioactive glasses and glass-ceramics have been used as bone substitutes in either particulate or scaffold forms. Various thermal treatments that allow the development of scaffolds from bioactive glasses may create varied proportions of new crystalline phases in the amorphous phase with a potential impact on the bioactivity and biocompatibility of the material. The aim of the present *in vitro* study was to qualitatively and quantitatively evaluate the development of the osteogenic phenotype in osteoblastic cell cultures grown on bioactive glass and glass-ceramic surfaces. MC3T3-E1 cells, subclone 14, were cultured under an osteogenic condition for periods of up to 21 days on the following disc surfaces: Bioglass® 45S5 (bioactive glass), Biosilicate® (bioactive glass-ceramic), Biosilicate® as the material for scaffold preparation (Bio-sc, bioactive glass-ceramic), and borosilicate (bioinert glass). At days 7, 12, and 21 post-plating, cell morphology, mineralized matrix formation and the expression profile of genes associated with osteogenesis were evaluated. Epifluorescence of actin cytoskeleton and DAPI DNA stain revealed confluent cell cultures at day 7 for all groups, with progressive cell multilayering formation. The quantitative analysis of Alizarin red-stained cultures at day 21 revealed significantly enhanced mineralization in cultures grown on bioactive materials compared with the ones on borosilicate and the highest absorbance intensities for the Bio-sc group. Differential gene expression profiles were detected at the three time points evaluated in cultures grown on the bioactive materials in comparison with borosilicate, and on the glass-ceramics in comparison with Bioglass® 45S5. From the results presented, it can be concluded that changes in chemical characteristics of glass and glass-ceramic that may have an impact on their bioactivity index can affect the osteogenic potential and the gene expression profile of osteoblastic cells *in vitro*. The highest osteogenic activity on Bio-sc renders this material a good candidate for bone defect applications.

Key-words: cell culture, cell differentiation, gene expression, osteoblast, bioactive glass, bioactive glass-ceramic.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 PROPOSIÇÃO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Preparação dos materiais.....	24
3.2 Linhagem de células osteoblásticas	25
3.3 Morfologia e localização de marcadores iniciais da diferenciação osteoblástica	26
3.4 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada).....	27
3.4.1 Análise estatística	28
3.5 Análise da expressão gênica por PCR Array	28
3.5.1 Método de extração de RNA e confecção de cDNA.....	28
3.5.2 Método de PCR Array	30
3.5.3 Análise dos resultados	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Morfologia celular, imunolocalização de BSP e atividade de fosfatase alcalina <i>in situ</i> (Fast red)	35
4.2 Mineralização	37
4.3 Análise da expressão gênica.....	38
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Diferentes aspectos das interações de células e tecidos biológicos com os biomateriais são determinados, em parte, pelas características físicas e químicas da superfície do material. O desenvolvimento de materiais para implantação que favoreçam um reparo ósseo rápido e controlado e que resulte em regeneração tecidual é o principal objetivo da pesquisa com os substitutos ósseos (BRUNSKI et al., 2000). A produção de biomateriais deve ser baseada na compreensão e quantificação das reações celulares em substratos naturais e artificiais. Esse princípio baseia-se em evidências de que a superfície do material se constitui em fator crítico na determinação de sua biocompatibilidade e no processo de integração com os tecidos biológicos (NANCI et al., 1998).

Nas últimas décadas, novos materiais, naturais e sintéticos, têm sido desenvolvidos com o objetivo de substituir o tecido ósseo (PULEO et al., 1991). Além de proporcionarem reduzida morbidade, esses biomateriais possuem como benefícios a facilidade para sua disponibilização e esterilização (MOORE et al., 2001). Entre os principais biomateriais para implantação em osso utilizados em Ortopedia e Odontologia estão os vidros e as cerâmicas de Ca e P (por exemplo, Bioglass® 45S5 e hidroxiapatita, respectivamente), os metais (titânio e aço cirúrgico) e os polímeros (poli (ácido lático) e polimetilmetacrilato). No espectro de biocompatibilidade, as cerâmicas de Ca e P e alguns vidros, como o Bioglass® 45S5, são considerados materiais bioativos (HENCH; WILSON, 1984).

O vidro Bioglass® 45S5, definido como *gold standard* para aplicação em procedimentos regenerativos ósseos, tem sido considerado o material que apresenta

o maior índice de bioatividade. Há evidências experimentais de aumento da formação de matriz mineralizada *in vitro* sobre Bioglass® 45S5, por meio de estimulação dos processos de diferenciação e proliferação de células da linhagem osteoblástica (XYNOS et al., 2000a; XYNOS et al., 2000b; LOSSDORFER et al., 2004; HATTAR et al., 2005), tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DUCHEYNE; QIU, 1999). De fato, pelo menos sete famílias de genes são ativadas quando osteoblastos humanos em culturas primárias são expostos aos produtos da dissolução iônica dos vidros bioativos, incluindo genes que codificam proteínas que estão associadas a esses processos (HENCH et al., 2000; XYNOS et al., 2001; LOTY et al., 2001; HENCH et al., 2002). Ainda que apresente características importantes que favoreçam o processo de reparo ósseo, a aplicação de materiais vítreos bioativos na engenharia de tecido é limitada por esses materiais apresentarem propriedades mecânicas inadequadas ao desenvolvimento de *scaffolds* (arcabouços) (CHEN et al., 2006).

Para contornar essa limitação, uma das estratégias tem sido o desenvolvimento de vitrocerâmicas, por meio de métodos para a cristalização controlada total ou parcial de vidros bioativos (JAMES et al., 1995; CHEN et al., 2006). Assim, vitrocerâmicas bioativas foram desenvolvidas com o intuito de melhorar as propriedades mecânicas dos materiais bioativos, incluindo Ceravital® e A/W® (BRÖMER et al., 1976; KOKUBO et al., 1985), ou para proporcionar outras propriedades importantes ao material, como é o caso da vitrocerâmica Bioverit®, usinável (HENCH; WILSON, 1993). Ainda que vitrocerâmicas apresentem propriedades mecânicas que podem ser superiores às dos vidros, a introdução de algumas fases cristalinas poderia diminuir acentuadamente sua bioatividade (BELLUCCI et al., 2010). O resultado é que os índices de bioatividade das

vitrocerâmicas disponíveis no mercado são substancialmente mais baixos do que os dos vidros bioativos (HENCH; WEST, 1996).

Neste contexto, o Laboratório de Materiais Vítreos do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LaMaV-DEMa-UFSCar) desenvolveu e patenteou uma nova vitrocerâmica pertencente ao sistema quaternário P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 , 100% cristalina, denominada Biosilicato[®] (patente WO 2004/074199; Fundação Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo, 2004), visando sua utilização em algumas especialidades médicas e odontológicas. A razão para o desenvolvimento desse novo material baseou-se no princípio de que a cristalinidade altera significativamente as características de fratura dos vidros. A cristalização progressiva do material tende a aumentar suas propriedades mecânicas (PEITL et al., 2012), além de favorecer a formação de partículas menos abrasivas e cortantes quando o material é triturado para a obtenção de pó, aspectos que poderiam ser considerados relevantes para aplicações clínicas específicas. Em estudo pioneiro de nosso grupo de pesquisa, Moura et al. (2007) demonstraram que a cristalização total do Biosilicato[®] promove o aumento de seu índice de bioatividade para níveis superiores aos de vitrocerâmicas comercializadas atualmente (HENCH; WEST, 1996). Além disso, experimentos *in vitro* mostraram que o Biosilicato[®] 100% cristalino promove aumento significativo do potencial osteogênico de células primárias derivadas de calvárias de ratos em comparação àquelas crescidas sobre materiais controles (Biosilicato[®] vítreo e Bioglass[®] 45S5), resultando na formação de áreas mais extensas de matriz mineralizada aos 14 dias. Em outro estudo, avaliando os efeitos do pré-tratamento de superfícies de Biosilicato[®] por 3 dias com meio de cultura, na presença ou não de soro fetal bovino, De Castro (2009) observou alterações em eventos iniciais de

interação célula-substrato de culturas primárias osteogênicas, com aumento significativo de viabilidade, proliferação e população celulares e maior expressão de Runx2, BSP e ALP nos 7 primeiros dias; áreas ainda mais extensas de matriz mineralizada foram observadas em culturas sobre superfícies de Biosilicato[®] condicionadas em meio com soro.

Associados a esses resultados *in vitro* favoráveis ao desenvolvimento do fenótipo osteogênico, estudos *in vivo* utilizando diferentes modelos animais demonstraram que a presença de partículas de Biosilicato[®] em defeitos ósseos permite a formação de matriz óssea mineralizada na interface com o biomaterial (GRANITO et al., 2009; RORIZ et al., 2010; GRANITO et al., 2011). Apesar disso, para a preparação de *scaffolds*, um dos objetivos originais para o desenvolvimento do Biosilicato[®], torna-se necessário um tratamento térmico complementar com temperaturas superiores a 800 °C, o que resulta na formação de uma fase cristalina secundária, constituída de fosfato de cálcio (CROVACE, 2009). *Scaffolds* de Biosilicato[®] estão em fase inicial de avaliações sobre sua biocompatibilidade e seus efeitos sobre o processo de diferenciação osteoblástica (RENNO et al., 2010).

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, qualitativamente, os aspectos morfológicos e, quantitativamente, a mineralização da matriz extracelular e a expressão de genes relacionados à osteogênese em fases distintas de culturas de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 crescidas sobre substratos vítreos e vitrocerâmicos bioativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação dos materiais

Discos de Biosilicato[®], de 2,5 mm de espessura x 12 mm de diâmetro, foram produzidos pelo LaMaV. A composição e o protocolo de tratamentos térmicos para obtenção do Biosilicato[®] estão descritos na patente WO 2004/074199. Sílica de alta pureza, carbonato de cálcio, carbonato de sódio e fosfato de sódio foram usados para obter a composição do vidro bioativo Bioglass[®] 45S5 e Biosilicato[®] vítreo. Os materiais foram pesados e misturados por 30 min em garrafa de polietileno. A fusão ocorreu em temperaturas entre 1250 e 1380 °C por 3 h em forno elétrico (Rapid Temp 1710 BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, EUA). As amostras foram colocadas em molde cilíndrico de grafite nas dimensões 12 mm x 30 mm e submetidas à fusão a 460 °C por 5 h. Para obtenção da vitrocerâmica totalmente cristalizada (Biosilicato[®]), os cilindros contendo Biosilicato[®] vítreo passaram por ciclo de tratamento térmico para promover sua cristalização. Os primeiros ciclos térmicos foram executados em baixas temperaturas para favorecer a nucleação volumétrica dos cristais. Posteriormente, as amostras nucleadas foram submetidas a tratamentos térmicos a uma temperatura superior à de transição do vidro para ocasionar a total cristalização do material. Para a obtenção de Biosilicato[®] para *scaffold*, foi realizado um tratamento térmico complementar, com temperaturas superiores a 800 °C. Os cilindros de Biosilicato[®], Biosilicato[®] para *scaffold*, Bioglass[®] 45S5 e vidro bioinerte (borossilicato, Pyrex[®], Corning Inc., Corning, NY, EUA) foram cortados em discos na espessura de 3 mm usando lâmina de diamante. Por fim, os discos, de 12 mm de diâmetro, foram polidos com lixas de carbeto de silício na gramatura de 400, imersos

em álcool isopropílico e limpos em ultra-som. Em seguida, os discos foram lavados e armazenados em álcool isopropílico, para evitar modificações na superfície causadas pela umidade do ar. Para os experimentos com cultura de células, os discos de Biosilicato[®], Biosilicato[®] para *scaffold*, Bioglass[®] 45S5 e borosilicato foram previamente esterilizados em calor seco a 180 °C em forno de Pasteur por 2 h. Para simplificar sua identificação, as siglas para os diferentes materiais definem-se assim:

- 1) Borosilicato – Boro;
- 2) Bioglass[®] 45S5 – 45S5;
- 3) Biosilicato[®] – Bio;
- 4) Biosilicato[®] para *scaffold* – Bio-sc.

3.2 Linhagem de células osteoblásticas

As células osteoblásticas MC3T3-E1, sub-clone 14, derivadas de camundongo (QUARLES et al., 1992; FRATZL-ZELMAN et al., 1998; MOFFATT et al., 2008; VETRONI et al., 2009), foram adquiridas junto à ATCC (na sigla em inglês para American Type Culture Collection; Manassas, VA, EUA). Inicialmente, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ (Corning Inc.) com 10 mL de meio de cultura α -MEM (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) e 2,2 mL de penicilina-estreptomicina (Sigma). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2-3 dias. Após confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA a 1 mM (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e tripsina a 0,25% (Gibco) e contadas em microscópio por meio de hemocítômetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA). As células foram plaqueadas sobre os diferentes substratos vítreos e

vitrocerâmicos contidos em placas de 24 poços, na densidade de 2×10^4 células/poço, e foram cultivadas em meio osteogênico por períodos de 7, 12 e 21 dias.

3.3 Morfologia e localização de marcadores iniciais da diferenciação osteoblástica

Nos tempos de 7, 12 e 21 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (DE OLIVEIRA; NANJI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2007; SCHWARTZ FO et al., 2007). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 min, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 min. Foi utilizado anticorpo primário para sialoproteína óssea (1:200, WVID1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank – DSHB, Iowa City, IA, EUA), seguido de anticorpo secundário conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes) em mesma solução de faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), usada para visualização do citoesqueleto de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 min em TA. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 min cada) em PB. Antes da montagem para observação microscópica, as amostras foram lavadas rapidamente com água destilada e os núcleos celulares, marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 min. Os discos foram montados diretamente em lâminas de vidros, e em seguida, após montagem de lamínula de vidro Fisherbrand 12 mm (Fisher Scientific) com meio de montagem anti-fade (Vectashield, Vector Labs, EUA) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas utilizando

microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera digital. As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1.

Nos mesmos períodos, foi realizado ensaio para visualização da atividade de fosfatase alcalina *in situ*. O meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução de Hanks (Hanks' Balanced Salts, Sigma) a 9,8 g/L e NaHCO₃ Hybrimax[®] (Sigma) a 350 mg/L, aquecida a 37 °C. Após esse procedimento foi incubado, em cada poço, 1 mL de solução tampão Tris (Sigma) a 120 mM, pH 8,4; contendo Fast red TR (Sigma) a 1,8 mM, naftol-ASMX-fosfato (Sigma) a 0,9 mM e dimetilformamida (Merck) 1:9, por 30 min em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Em seguida, a solução foi removida e os poços deixados a secar em TA. Imagens macroscópicas das culturas foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1.

3.4 Detecção de acúmulos de cálcio (formação de matriz mineralizada)

Em 21 dias, as culturas da linhagem celular MC3T3-E1 crescidas sobre os discos dos diferentes grupos foram lavadas em solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4 °C por 60 min e lavadas em PBS e água destilada sequencialmente. Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina (Alizarin Red S, Sigma) a 2%, pH 4,2, à TA por 15 min, lavadas com PBS e água destilada e deixadas a secar à TA. Imagens macroscópicas das culturas coradas com ARS foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel, 6.3 MP, com lente macro EF100 f/2.8) processadas com o programa Adobe Photoshop CS5.1.

Acúmulos de cálcio foram quantitativamente determinados pelo método de extração de ARS (GREGORY et al., 2004). Em cada poço contendo os discos dos diferentes materiais corados com ARS, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10% e a placa, deixada sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi, então, raspada com um raspador de células e a solução, transferida para tubos de 1,5 mL e agitada em vortex por 30 s. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85 °C por 10 min, resfriadas em gelo por 5 min e centrifugadas a 13000 g por 20 min. De cada grupo experimental, foram transferidos 100 µL de sobrenadante para placa de 96 poços e adicionados 40 µL de hidróxido de amônio a 10% em cada poço. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (µQuanti, BioTek Instruments), utilizando comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de ARS de 0,5 a 3 mM em acetato de amônio (ácido acético a 10% e NH₄OH a 5 M).

3.4.1 Análise estatística

Utilizou-se teste paramétrico para dados independentes (ANOVA *One-Way*), seguido do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. O nível de significância foi de 5%.

3.5 Análise da expressão gênica por PCR Array

3.5.1 Método de extração de RNA e confecção de cDNA

Nos tempos de 7, 12 e 21 dias, o meio de cultura foi removido de todos os poços contendo os discos dos diferentes materiais, os quais foram transferidos para uma nova placa para que apenas o RNA das células sobre os discos fosse extraído;

em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) no primeiro poço. Após intensa pipetagem, para promover lise das células, esta mistura foi transferida para o próximo poço de cultura celular sendo o mesmo procedimento realizado até o último poço. Ao final, foi possível obter quantidade suficiente de RNA total para realização de todos os experimentos envolvendo expressão gênica. As amostras foram mantidas à TA durante 15 min e armazenadas no freezer -20 °C por, no mínimo, 24 h. Decorrido este período, para cada 1 mL do reagente Trizol (Gibco) foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck). Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 s e mantidos no gelo durante 5 min. A seguir, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 min a 4 °C e a fase aquosa formada (superior), coletada em novos tubos de 2 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Em seguida, foram adicionados 250 µL de etanol a 96% (Merck) às amostras e as mesmas, centrifugadas em colunas de sílica gel presentes no kit de extração *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, EUA), no qual uma das etapas do processo de extração envolve o tratamento com DNase, de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante.

A concentração e pureza do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria em aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/µL e avaliar a contaminação por proteínas e fenol, respectivamente.

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o *kit RT² First Strand* (SuperArray, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados em tubo Eppendorf: 1 µg de RNA total e 2 µL do tampão GE (10X), para um volume final de 10 µL/reação. Essa amostra foi incubada em

termociclador *Master Cycler Gradiente* (Eppendorf AG) a 42 °C por 5 min e resfriada a 4 °C por 2 min. Em seguida foi adicionado um coquetel contendo: 4 µL do tampão BC3, 1 µL do *primer* P2, 2 µL da enzima RE3 e 3µL de água RNase *Free*. A amostra foi, novamente, incubada no termociclador a 42 °C por 15 min, 95 °C por 5 min, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Na sequência, foram adicionados 91 µL de água deionizada estéril e o cDNA diluído foi estocado em freezer -20 °C.

3.5.2 Método de PCR Array

A técnica *PCR Array* permite a análise simultânea de 84 genes envolvidos em vias específicas de sinalização, utilizando o aparelho CFX96 (BioRad, Hercules, CA, EUA). Uma das vantagens desta metodologia é a análise da expressão de vários genes em um único experimento. Para a reação de *PCR Array*, foram adicionados em um tubo Falcon: 1350 µL do tampão 2X *SuperArray RT² qPCR Master Mix*, 102 µL de reação de síntese de cDNA diluído 5,6 vezes e 1248 µL de água deionizada. Foram adicionados 25 µL desta mistura em cada poço da placa já contendo pares de *primers* liofilizados. Em seguida, a reação de *Real time* PCR foi executada no aparelho CFX96 e os cálculos, realizados pelo Software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* (*SuperArray*). Genes apresentando valores de ciclo *threshold* (Ct, na sigla em inglês) acima de 35 foram considerados não expressos. A Tabela 1 relaciona os genes presentes na placa de *PCR Array* para osteogênese de camundongo.

Tabela 1. Relação de genes para camundongo na placa de PCR Array (*SuperArray*)

Posição	Número/Acesso	Símbolo	Descrição
A01	NM_013465	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein
A02	NM_007431	Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
A03	NM_009664	Ambn	Ameloblastin
A04	NM_009673	Anxa5	Annexin A5
A05	NM_007542	Bgn	Biglycan
A06	NM_009755	Bmp1	Bone morphogenetic protein 1
A07	NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2
A08	NM_173404	Bmp3	Bone morphogenetic protein 3
A09	NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4
A10	NM_007555	Bmp5	Bone morphogenetic protein 5
A11	NM_007556	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6
A12	NM_009758	Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A
B01	NM_007560	Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B
B02	NM_007643	Cd36	CD36 antigen
B03	NM_009866	Cdh11	Cadherin 11
B04	NM_009925	Col10a1	Collagen, type X, alpha 1
B05	NM_007729	Col11a1	Collagen, type XI, alpha 1
B06	NM_007730	Col12a1	Collagen, type XII, alpha 1
B07	NM_181277	Col14a1	Collagen, type XIV, alpha 1
B08	NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1
B09	NM_007743	Col1a2	Collagen, type I, alpha 2
B10	NM_031163	Col2a1	Collagen, type II, alpha 1
B11	NM_009930	Col3a1	Collagen, type III, alpha 1
B12	NM_009931	Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1
C01	NM_009932	Col4a2	Collagen, type IV, alpha 2
C02	NM_015734	Col5a1	Collagen, type V, alpha 1
C03	NM_009933	Col6a1	Collagen, type VI, alpha 1
C04	NM_146007	Col6a2	Collagen, type VI, alpha 2
C05	NM_007738	Col7a1	Collagen, type VII, alpha 1
C06	NM_016685	Comp	Cartilage oligomeric matrix protein
C07	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
C08	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
C09	NM_007802	Ctsk	Cathepsin K
C10	NM_016779	Dmp1	Dentin matrix protein 1
C11	NM_010113	Egf	Epidermal growth factor
C12	NM_017468	Enam	Enamelin
D01	NM_010197	Fgf1	Fibroblast growth factor 1
D02	NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2
D03	NM_008007	Fgf3	Fibroblast growth factor 3
D04	NM_010206	Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1
D05	NM_010207	Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2
D06	NM_010228	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
D07	NM_010233	Fn1	Fibronectin 1
D08	NM_145741	Gdf10	Growth differentiation factor 10
D09	NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
D10	NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1
D11	NM_010513	Igf1r	Insulin-like growth factor I receptor
D12	NM_008396	Itga2	Integrin alpha 2
E01	NM_010575	Itga2b	Integrin alpha 2b

Posição	Número/Acesso	Símbolo	Descrição
E02	NM_013565	Itga3	Integrin alpha 3
E03	NM_008401	Itgam	Integrin alpha M
E04	NM_008402	Itgav	Integrin alpha V
E05	NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
E06	NM_019471	Mmp10	Matrix metalloproteinase 10
E07	NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2
E08	NM_008611	Mmp8	Matrix metalloproteinase 8
E09	NM_013599	Mmp9	Matrix metalloproteinase 9
E10	NM_010835	Msx1	Homeobox, msh-like 1
E11	NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105
E12	NM_008808	Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha
F01	NM_011077	Phex	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome (hypophosphatemia, vitamin D resistant rickets)
F02	NM_009820	Runx2	Runt related transcription factor 2
F03	NM_016741	Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1
F04	NM_009825	Serpinh1	Serine (cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1
F05	NM_008539	Smad1	MAD homolog 1 (Drosophila)
F06	NM_010754	Smad2	MAD homolog 2 (Drosophila)
F07	NM_016769	Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)
F08	NM_008540	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)
F09	NM_024449	Sost	Sclerostin
F10	NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9
F11	NM_018783	Tfip11	Tuftelin interacting protein 11
F12	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
G01	NM_009367	Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2
G02	NM_009368	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3
G03	NM_009370	Tgfbr1	Transforming growth factor, beta receptor I
G04	NM_009371	Tgfbr2	Transforming growth factor, beta receptor II
G05	NM_011578	Tgfbr3	Transforming growth factor, beta receptor III
G06	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
G07	NM_011656	Tuft1	Tuftelin 1
G08	NM_011658	Twist1	Twist homolog 1 (Drosophila)
G09	NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
G10	NM_009504	Vdr	Vitamin D receptor
G11	NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
G12	NM_011697	Vegfb	Vascular endothelial growth factor B
H01	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H02	NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
H03	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 α (cytosolic), class B member 1
H04	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	NM_007393	Actb	Actin, beta
H06	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Usando esse método, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada pelo gene endógeno de camundongo beta-actina (*ACTB*) e relativa ao controle bioinerte (Boro) ou ao bioativo (45S5).

3.5.3 Análise dos resultados

A significância estatística das diferenças de expressão gênica foi obtida por meio do Software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (SuperArray). Valores de Ct (Ciclo Threshold) foram fornecidos ao software para o cálculo da regulação da expressão gênica, assim como a obtenção dos valores estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$). O software realizou o teste t entre o grupo controle (bioinerte ou bioativo) e cada grupo experimental, sendo os valores posteriormente submetidos ao teste de correção de Benjamini-Hochberg. Os experimentos foram realizados em triplicata. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia celular, imunolocalização de BSP e atividade de fosfatase alcalina *in situ* (Fast red)

As marcações por fluorescência direta do citoesqueleto de actina e núcleo revelaram confluência das culturas de células MC3T3-E1 sobre as superfícies de vidros e vitrocerâmicas em 7, 12 e 21 dias, com progressiva formação de multicamadas celulares (Figura 1). Aumento mais evidente na densidade de núcleos celulares ocorria entre o 7º e o 12º dia (Figura 1, fluorescência azul; comparem-se E-H com A-D). Para todas as culturas e nos 3 tempos, predominava o padrão de marcação de actina de fibras de estresse, distribuídas em diferentes direções e por todo o citoplasma; exceção para as células sobre os materiais bioativos em 7 dias, que exibiam áreas circulares destituídas de marcação, por vezes bem delimitadas, correspondentes a acúmulos sobre as células de material resultante das superfícies reativas (dados não mostrados). Esse fenômeno era mais pronunciado sobre as duas preparações de Biosilicato® (Figura 1, fluorescência verde; comparem-se C e D com B). Divisões mitóticas foram observadas em todos os grupos e nos 3 tempos, predominantes em 7 dias.

A marcação para BSP mostrou padrão puntiforme discreto por toda a cultura, por vezes visivelmente citoplasmática, adjacente ao núcleo, tendendo a uma maior intensidade nos materiais bioativos e nos tempos de 12 e 21 dias (Figura 1, fluorescência vermelha).

Imagens macroscópicas das culturas marcadas com Fast red revelaram, para os 4 materiais avaliados, progressivo aumento de atividade de fosfatase alcalina *in situ*, de 7 para 21 dias (Figura 1A-L, destaques).

Figura 1. Epifluorescência de culturas de células MC3T3-E1 crescidas sobre borosilicato (Boro, A,E,I), Bioglass® 45S5 (45S5, B,F,J), Biosilicato® (Bio, C,G,K) e Biosilicato® para *scaffold* (Bio-sc, D,H,L), em 7 (A-D), 12 (E-H) e 21 (I-L) dias. Destaques em A-L representam imagens macroscópicas das culturas marcadas com Fast red. (A-L) Fluorescências verde, vermelha e azul revelam, respectivamente, citoesqueleto de actina, localização de BSP e núcleos celulares. Notem-se culturas confluentes já em 7 dias (A-D), com áreas de ausência de marcação para actina nas células MC3T3-E1 sobre os materiais bioativos. O aumento da população celular é mais evidente de 7 para 12 dias sobre todos os materiais (comparem-se E-H com A-D). Marcação por Fast red é progressivamente mais intensa para todos os grupos de 7 a 21 dias (comparem-se destaques em I-L com destaques em E-H e A-D). A barra de escala representa para A-L 100 μ m e para os destaques em A-L, 6 mm.

4.2 Mineralização

Em 21 dias, macroscopicamente, a coloração com ARS revelou culturas mais intensamente coradas sobre os materiais bioativos. A quantificação de ARS mostrou significância estatística para os valores de absorbância ($p < 0,01$), com Boro < 45S5 < Bio < Bio-sc (Figura 2).

Figura 2. Aspectos macroscópicos de culturas de células MC3T3-E1 sobre borosilicato (Boro), Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para *scaffold* (Bio-sc), coradas com vermelho de Alizarina (ARS), e quantificação de ARS, indicando o maior potencial osteogênico de culturas sobre Bio-sc. Barras com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

4.3 Análise da expressão gênica

Os resultados mostraram expressão diferencial de genes relacionados à osteogênese para os 3 tempos de progressão das culturas de células MC3T3-E1 sobre os materiais vítreo (45S5) e vitrocerâmicos (Bio e Bio-sc) bioativos em comparação ao Boro, bioinerte (Tabelas 2 a 5), e sobre os materiais vitrocerâmicos em comparação ao 45S5 (Tabelas 6 a 9).

Na comparação com o borosilicato, enquanto que células MC3T3-E1 sobre 45S5 mostraram maior número de genes dos diferentes grupos sobre-expressos em 7 e 21 dias e reprimidos em 12 dias, células sobre Bio e Bio-sc exibiam maior número de genes sobre-expressos em 12 e 21 dias e reprimidos em 7 dias (Tabela 5).

Quando se compararam as duas preparações de Biosilicato[®] ao 45S5, notou-se que a sobre-expressão de genes ocorria, predominantemente, aos 12 dias, e apenas aos 21 dias para o Bio-sc. A repressão de genes predominou em 7 dias, em maior número para o Bio (Tabela 9).

Tabela 2. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 7 dias sobre borosilicato, Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioinerte borosilicato. Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) – 7dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea				
<i>Alpl</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	-	-	-1,82
<i>Bgn</i>	<i>Biglycan</i>	1,62	1,87	-
<i>Dmp1</i>	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>	29,09	9,54	6,94
<i>Fn1</i>	<i>Fibronectin 1</i>	2,08	2,84	2,19
<i>Ahsg</i>	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	5,51	-	2,06
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas				
<i>Bmp1</i>	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	-	-1,70	-1,53
<i>Bmp2</i>	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>	-	-	-
<i>Bmp3</i>	<i>Bone morphogenetic protein 3</i>	-	1,78	-
<i>Bmp4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	1,69	-	-
<i>Bmp5</i>	<i>Bone morphogenetic protein 5</i>	2,19	2,35	-
<i>Bmp6</i>	<i>Bone morphogenetic protein 6</i>	-	-	-
<i>Gdf10</i>	<i>Growth differentiation factor 10</i>	2,05	1,93	-
<i>Tgfb1</i>	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>	-	1,94	-
<i>Tgfb2</i>	<i>Transforming growth factor, beta 2</i>	1,62	-	-
<i>Tgfb3</i>	<i>Transforming growth factor, beta 3</i>	1,65	1,85	-
Receptores				
<i>Cd36</i>	<i>CD36 molecule</i>	-	-	-
<i>Cdh11</i>	<i>Cadherin 11</i>	2,12	-3,46	1,97
<i>Fgfr1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	2,19	-	-
<i>Fgfr2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>	-	-2,37	-
<i>Flt1</i>	<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>	-	-	-
<i>Icam1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	2,32	-	-
<i>Scarb1</i>	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>	-	1,71	-
<i>Tgfr1</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor I</i>	2,17	1,52	-
<i>Tgfr2</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor II</i>	1,68	4,04	1,52
<i>Tgfr3</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor III</i>	2,96	1,73	-
<i>Vcam1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	2,55	-	-
<i>Vdr</i>	<i>Vitamin D receptor</i>	-1,71	-6,49	-1,61
<i>Igf1r</i>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>	-	-	-1,55
<i>Phex</i>	<i>Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>	11,46	2,59	5,64
<i>Bmpr1a</i>	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1A</i>	4,30	-	1,88
<i>Bmpr1b</i>	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1B</i>	2,02	-	-
Fatores de crescimento				
<i>Egf</i>	<i>Epidermal growth factor</i>	3,03	-	-
<i>Fgf1</i>	<i>Fibroblast growth factor 1</i>	-	-	-
<i>Fgf2</i>	<i>Fibroblast growth factor 2</i>	2,80	-	-
<i>Fgf3</i>	<i>Fibroblast growth factor 3</i>	2,32	-	-
<i>Igf1</i>	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	-	-3,20	-
<i>Pdgfa</i>	<i>Platelet derived growth factor, alpha</i>	-	-1,87	-1,94
<i>Vegfa</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	-	-	-
<i>Vegfb</i>	<i>Vascular endothelial growth factor B</i>	1,80	2,76	-
<i>Csf2</i>	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>	-	-	-
<i>Csf3</i>	<i>Colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>	-	-	-
Receptores de integrina				

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) – 7dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	1,75	-	-
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-	-	-
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	2,24	3,83	-
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	1,56	1,69	-
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	2,71	-	-
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	1,91	1,57	-
Colágeno				
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	8,63	4,89	3,78
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	-	-7,19	-
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	1,54	-1,56	-
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	1,53	2,21	-
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-	1,86	-
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	-	-3,61	-1,70
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	-2,75	-4,26	-3,12
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	-	-2,06	-1,80
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	5,40	5,79	5,75
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	2,20	2,01	1,66
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	-	-	-
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	-	-	-
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-	1,85	-
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	1,70	1,61	-
Genes relacionados à cartilagem				
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	2,29	-	-
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	-	-1,62	-
Metaloproteinases				
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	-	-1,52	-1,63
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	2,09	-	-
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	-2,06	-	-
Fatores de Transcrição				
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	-	-5,43	-
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	-	-	-
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	-	-	-
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	-	-3,92	-
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	1,57	-2,09	-
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	-	1,68	-
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	-	-	-
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	1,50	-1,60	-
Outros genes				
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	-	-	-
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	1,94	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	-	-	-
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-	-1,74	-
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	-	2,19	-
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	1,52	-	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	1,95	-	-1,64
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-	-	-

Tabela 3. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 12 dias sobre borossilicato, Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioinerte borossilicato. Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 12 dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea				
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-	-	-
Bgn	Biglycan	-1,70	-	-
Dmp1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	2,62	2,30	5,34
Fn1	Fibronectin 1	-1,88	3,00	-
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	-	7,11	7,10
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas				
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	-2,07	-	-
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	-	-	-
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-	1,56	-
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	-	-	-
Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	1,63	-	1,97
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	-	-	-
Gdf10	Growth differentiation factor 10	-	1,98	1,81
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-	-	-
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	-1,92	1,78	-
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	-	-	-
Receptores				
Cd36	CD36 molecule	-	-1,86	-
Cdh11	Cadherin 11	-	1,50	2,31
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	-	2,06	2,00
Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	-1,63	-	-
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1	-	1,78	-
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	-	-	-
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-	-	-
Tgfr1	Transforming growth factor, beta receptor I	-	1,69	-
Tgfr2	Transforming growth factor, beta receptor II	-	2,30	1,59
Tgfr3	Transforming growth factor, beta receptor III	-	1,97	-
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	-	1,72	1,88
Vdr	Vitamin D receptor	-2,50	-	-
Igf1r	Insulin-like growth factor 1 receptor	-	2,15	-
Phex	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	-3,69	-	-
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	-2,73	-	-
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-	1,93	-
Fatores de crescimento				
Egf	Epidermal growth factor	-	2,45	-
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-	-	1,59
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	-	2,64	-
Fgf3	Fibroblast growth factor 3	-	1,50	1,72
Igf1	Insulin-like growth factor 1	-1,91	-	-
Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha	-	1,62	1,81
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	-4,25	-1,57	-2,74
Vegfb	Vascular endothelial growth factor B	-	1,53	-
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	1,69	1,50	2,52
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	-	-	-
Receptores de integrina				

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 12 dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	-	2,65	-
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-	-	4,90
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	-	2,16	1,55
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	-	-	1,93
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	-3,08	1,50	-1,70
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	-	-	1,63
Colágeno				
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	2,70	3,03	20,59
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	-4,33	-	-
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	-2,27	3,02	-1,52
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	-	-	1,74
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-2,07	1,59	-1,98
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	-3,34	-	-1,51
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	-2,71	-	-
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	-1,99	1,98	-
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	-	3,85	1,79
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	1,76	2,26	2,33
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	-2,37	-	-1,72
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	-	1,91	1,93
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-	1,67	-
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	-	-	-
Genes relacionados à cartilagem				
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	-2,45	-	-
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	-1,86	-	-
Metaloproteinases				
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	-	1,91	1,51
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	-	1,90	-
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	-	2,44	2,55
Fatores de Transcrição				
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	-2,42	-	-
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	-1,52	-	-
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	-1,56	2,24	-
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	-	-	1,67
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	-	1,70	1,61
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	-	1,62	-
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	-	-	2,32
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	-	-	2,02
Outros genes				
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	-	-	2,74
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	-	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	-	-	-
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-	-	2,58
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	-	-	2,29
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	-1,88	1,84	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	-	1,73	-
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-	-	-

Tabela 4. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 21 dias sobre borosilicato, Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioinerte borosilicato. Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 21 dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea				
<i>Alpl</i>	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	-	-	-
<i>Bgn</i>	<i>Biglycan</i>	-	-	-
<i>Dmp1</i>	<i>Dentin matrix acidic phosphoprotein 1</i>	8,65	7,17	2,58
<i>Fn1</i>	<i>Fibronectin 1</i>	2,15	1,90	1,88
<i>Ahsg</i>	<i>Alpha-2-HS-glycoprotein</i>	-	-	-
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas				
<i>Bmp1</i>	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	-	-	1,64
<i>Bmp2</i>	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>	-	-	-
<i>Bmp3</i>	<i>Bone morphogenetic protein 3</i>	1,98	-	-
<i>Bmp4</i>	<i>Bone morphogenetic protein 4</i>	1,71	-	1,73
<i>Bmp5</i>	<i>Bone morphogenetic protein 5</i>	2,13	1,71	-
<i>Bmp6</i>	<i>Bone morphogenetic protein 6</i>	-	-	-
<i>Gdf10</i>	<i>Growth differentiation factor 10</i>	1,53	-	-
<i>Tgfb1</i>	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>	-	-	-
<i>Tgfb2</i>	<i>Transforming growth factor, beta 2</i>	1,78	1,88	2,53
<i>Tgfb3</i>	<i>Transforming growth factor, beta 3</i>	1,57	-	-
Receptores				
<i>Cd36</i>	<i>CD36 molecule</i>	-	-	-
<i>Cdh11</i>	<i>Cadherin 11</i>	3,00	2,58	6,18
<i>Fgfr1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	2,30	2,26	3,12
<i>Fgfr2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>	1,72	-	2,88
<i>Flt1</i>	<i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>	1,50	-	-
<i>Icam1</i>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>	1,67	-	-
<i>Scarb1</i>	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>	-	-	-
<i>Tgfr1</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor I</i>	2,14	1,52	1,87
<i>Tgfr2</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor II</i>	1,62	-	-
<i>Tgfr3</i>	<i>Transforming growth factor, beta receptor III</i>	2,11	1,68	1,85
<i>Vcam1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>	3,19	2,73	4,58
<i>Vdr</i>	<i>Vitamin D receptor</i>	-	-	2,37
<i>Igf1r</i>	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>	1,94	-	1,72
<i>Phex</i>	<i>Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked</i>	-	-	1,50
<i>Bmpr1a</i>	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1A</i>	3,16	2,19	4,75
<i>Bmpr1b</i>	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1B</i>	1,85	-	-
Fatores de crescimento				
<i>Egf</i>	<i>Epidermal growth factor</i>	2,14	-	-
<i>Fgf1</i>	<i>Fibroblast growth factor 1</i>	1,54	-	2,83
<i>Fgf2</i>	<i>Fibroblast growth factor 2</i>	1,94	2,75	2,75
<i>Fgf3</i>	<i>Fibroblast growth factor 3</i>	1,83	-	-
<i>Igf1</i>	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	-	-	-
<i>Pdgfa</i>	<i>Platelet derived growth factor, alpha</i>	-	1,60	1,56
<i>Vegfa</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	-	-	-
<i>Vegfb</i>	<i>Vascular endothelial growth factor B</i>	1,65	-	-
<i>Csf2</i>	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>	1,77	-	-
<i>Csf3</i>	<i>Colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>	-	-	-
Receptores de integrina				

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 21 dias		
		45S5	Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	2,19	1,62	1,77
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-	-	2,49
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	1,88	-	1,72
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	1,59	-	-
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	2,48	1,76	3,29
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	2,08	1,65	2,12
Colágeno				
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	115,36	99,11	13,40
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	1,50	-	3,24
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	1,87	1,64	1,81
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	1,97	-	-
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-	-1,50	-
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	-	-	1,77
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	1,80	-	1,60
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	1,75	1,57	2,58
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	4,48	4,38	3,70
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	2,71	2,38	2,78
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	1,54	-	1,73
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	1,94	2,07	2,38
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-	-	-
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	-	-	-
Genes relacionados à cartilagem				
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	-	-	-
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	1,63	1,65	1,62
Metaloproteinasas				
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	1,55	1,50	2,37
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	1,73	-	-
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	-	-	2,72
Fatores de Transcrição				
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	1,70	-	4,13
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	2,38	1,96	2,47
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	-	-	1,82
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	1,57	1,68	3,98
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	2,34	2,02	3,14
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	1,76	-	1,98
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	1,79	1,65	1,80
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	2,13	1,72	3,05
Outros genes				
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	2,42	2,15	2,76
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	-	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	1,87	-	1,56
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-	-	1,98
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	1,54	1,65	-
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	-	-1,65	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	1,78	-	-
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-	-	-

Tabela 5. Proporções de genes sobre-expressos e reprimidos, por grupos de genes, de culturas de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) crescidas sobre Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para *scaffold* (Bio-sc) por períodos de 7, 12 e 21 dias, em comparação àquelas sobre borossilicato. Marcações com tons escuros representam sobre-expressão (verde) ou repressão (vermelho) de uma proporção maior ou igual a 50% dos genes avaliados em cada grupo, enquanto que aquelas em tons claros, inferior a 50%

Período/Grupos de genes	7 dias			12 dias			21 dias		
	45S5	Bio	Bio-sc	45S5	Bio	Bio-sc	45S5	Bio	Bio-sc
Sobre-expressos									
Proteínas da matriz óssea	4/5	3/5	3/5	1/5	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5
Superfamília das BMPs	5/10	5/10	0/10	1/10	3/10	2/10	6/10	2/10	3/10
Receptores	10/16	5/16	4/16	0/16	9/16	4/16	12/16	6/16	10/16
Fatores de crescimento	4/10	1/10	0/10	1/10	6/10	4/10	6/10	2/10	3/10
Receptores de integrina	5/6	3/6	0/6	0/6	3/6	4/6	5/6	3/6	5/6
Colágeno	6/14	7/14	3/14	2/14	8/14	5/14	10/14	6/14	10/14
Relacionados à cartilagem	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2	1/2	1/2
Metaloproteinases	1/4	0/4	0/4	0/4	3/4	2/4	2/4	1/4	2/4
Fatores de transcrição	2/8	1/8	0/8	0/8	3/8	4/8	7/8	5/8	8/8
Outros genes	2/9	2/9	0/9	0/9	2/9	3/9	4/9	2/9	3/9
Reprimidos									
Proteínas da matriz óssea	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Superfamília das BMPs	0/10	1/10	1/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Receptores	1/16	3/16	2/16	4/16	1/16	0/16	0/16	0/16	0/16
Fatores de crescimento	0/10	2/10	1/10	2/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10
Receptores de integrina	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
Colágeno	1/14	5/14	3/14	7/14	0/14	4/14	0/14	1/14	0/14
Relacionados à cartilagem	0/2	1/2	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Metaloproteinases	1/4	1/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Fatores de transcrição	0/8	4/8	0/8	3/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Outros genes	0/9	1/9	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9

Tabela 6. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 7 dias sobre Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioativo Bioglass® 45S5 (45S5). Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 7 dias	
		Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea			
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-3,54	-2,01
Bgn	Biglycan	-2,45	-1,64
Dmp1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	-8,63	-4,01
Fn1	Fibronectin 1	-2,08	-
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	-	-2,55
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas			
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	-4,55	-
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	-	-
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-	-
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	-5,01	-1,64
Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	-2,64	-2,42
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	-	-
Gdf10	Growth differentiation factor 10	-3,00	-2,06
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-	-
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	-4,38	-1,72
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	-2,53	-
Receptores			
Cd36	CD36 molecule	-	-
Cdh11	Cadherin 11	-20,73	-
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	-5,52	-1,55
Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	-9,50	-1,56
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1	-3,91	-
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	-	-
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-1,79	-
Tgfr1	Transforming growth factor, beta receptor I	-4,03	-1,66
Tgfr2	Transforming growth factor, beta receptor II	-	-
Tgfr3	Transforming growth factor, beta receptor III	-4,84	-2,72
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	-7,83	-1,80
Vdr	Vitamin D receptor	-10,70	-
Igf1r	Insulin-like growth factor 1 receptor	-	-2,04
Phex	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	-12,53	-1,94
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	-16,94	-2,19
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-4,26	-2,06
Fatores de crescimento			
Egf	Epidermal growth factor	-7,20	-2,49
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-	-
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	-	-
Fgf3	Fibroblast growth factor 3	-6,58	-2,07
Igf1	Insulin-like growth factor 1	-10,46	-
Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha	-3,74	-
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	-3,26	-
Vegfb	Vascular endothelial growth factor B	-1,84	-1,54
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-2,90	-1,50
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	-	-
Receptores de integrina			

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 7 dias	
		Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	-	-
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-3,63	-
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	-1,66	-
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	-2,61	-
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	-10,45	-2,58
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	-3,43	-1,56
Colágeno			
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	-4,99	-2,18
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	-18,47	-
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	-6,78	-
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	-1,95	-1,58
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-	-
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	-7,39	-
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	-4,38	-
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	-5,07	-1,50
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	-2,64	-
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	-3,10	-
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	-1,90	-
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	-3,42	-
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-	1,56
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	-2,98	-1,62
Genes relacionados à cartilagem			
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	-6,79	-2,43
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	-3,20	-
Metaloproteinases			
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	-4,03	-
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	-5,80	-2,11
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	-1,80	-
Fatores de Transcrição			
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	-17,40	-
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	-4,29	-1,89
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	-3,11	-
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	-11,96	-
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	-9,26	-1,53
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	-1,84	-
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	-2,66	-
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	-6,80	-
Outros genes			
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	-4,60	-
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	-	-
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-4,58	-
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	-1,80	-
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	-3,29	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	-4,57	-3,07
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-	-

Tabela 7. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 12 dias sobre Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioativo Bioglass® 45S5 (45S5). Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 12 dias	
		Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea			
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-	-
Bgn	Biglycan	2,34	-
Dmp1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	-	2,04
Fn1	Fibronectin 1	5,63	-
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	-	-
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas			
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	2,04	2,94
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	-3,25	-
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-	-
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	1,62	1,85
Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	-	-
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	-2,91	-
Gdf10	Growth differentiation factor 10	-	-
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-	-
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	3,42	2,26
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	-	-
Receptores			
Cd36	CD36 molecule	-4,09	-
Cdh11	Cadherin 11	1,86	2,88
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	2,32	2,26
Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	2,16	1,96
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1	2,46	-
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	2,12	-
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-	-
Tgfr1	Transforming growth factor, beta receptor I	2,29	-
Tgfr2	Transforming growth factor, beta receptor II	1,56	-
Tgfr3	Transforming growth factor, beta receptor III	2,23	-
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	2,05	2,22
Vdr	Vitamin D receptor	1,97	2,37
Igf1r	Insulin-like growth factor 1 receptor	3,62	-
Phex	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	4,15	4,09
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	3,51	2,48
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	1,61	-
Fatores de crescimento			
Egf	Epidermal growth factor	2,42	-
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	1,98	2,22
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	2,09	-
Fgf3	Fibroblast growth factor 3	1,66	1,90
Igf1	Insulin-like growth factor 1	2,34	2,73
Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha	1,62	1,81
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	2,70	1,55
Vegfb	Vascular endothelial growth factor B	1,56	-
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-	-
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	-2,25	-
Receptores de integrina			

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 12 dias	
		Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	1,66	-
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-	3,72
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	2,07	-
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	-	1,78
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	4,61	1,81
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	1,64	2,30
Colágeno			
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	-	7,64
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	5,64	3,14
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	6,84	-
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	-	-
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	3,29	-
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	3,51	2,21
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	2,35	2,46
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	3,94	1,93
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	2,92	-
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	-	-
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	3,52	-
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	1,89	1,92
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	1,93	1,64
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	-	-
Genes relacionados à cartilagem			
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	2,02	2,13
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	2,66	-
Metaloproteinases			
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	2,81	2,22
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	2,23	1,59
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	2,77	2,89
Fatores de Transcrição			
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	1,89	3,74
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	2,01	1,87
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	3,49	-
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	-	1,84
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	2,09	1,97
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	2,19	-
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	-	2,05
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	1,52	2,76
Outros genes			
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	1,86	3,59
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	-1,72	-
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-	2,22
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	-	1,79
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	3,47	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	1,76	-
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-2,69	-

Tabela 8. Expressão gênica por PCR Array de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) cultivadas por 21 dias sobre Bioglass® 45S5 (45S5), Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para scaffold (Bio-sc). Os valores de expressão relativa foram normalizados pelo gene constitutivo beta-actina (*ACTB*) e calibrados em relação ao controle bioativo Bioglass® 45S5 (45S5). Com *cut-off* de 1,5 e $p < 0,05$ utilizando a correção de Benjamin-Hochberg, valores positivos indicam aumento e valores negativos, diminuição da expressão de cada gene avaliado. O traço indica que não houve alteração na expressão gênica

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 21 dias	
		Bio	Bio-sc
Proteínas não colágenas da matriz óssea			
Alpl	Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	-	-
Bgn	Biglycan	-	-
Dmp1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	-	-3,35
Fn1	Fibronectin 1	-	-
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	-	-
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas			
Bmp1	Bone morphogenetic protein 1	-	1,88
Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	-	-
Bmp3	Bone morphogenetic protein 3	-	-
Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	-	-
Bmp5	Bone morphogenetic protein 5	-	-
Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	-	-
Gdf10	Growth differentiation factor 10	-	-
Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	-	-
Tgfb2	Transforming growth factor, beta 2	-	-
Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	-1,62	-
Receptores			
Cd36	CD36 molecule	-	-
Cdh11	Cadherin 11	-	2,06
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1	-	-
Fgfr2	Fibroblast growth factor receptor 2	-	1,67
Flt1	Fms-like tyrosine kinase 1	-	-
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	-	-
Scarb1	Scavenger receptor class B, member 1	-	-
Tgfr1	Transforming growth factor, beta receptor I	-	-
Tgfr2	Transforming growth factor, beta receptor II	-	-
Tgfr3	Transforming growth factor, beta receptor III	-	-
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	-	-
Vdr	Vitamin D receptor	-	2,97
Igf1r	Insulin-like growth factor 1 receptor	-	-
Phex	Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked	-1,84	-
Bmpr1a	Bone morphogenetic protein receptor, type 1A	-	1,50
Bmpr1b	Bone morphogenetic protein receptor, type 1B	-1,67	-1,56
Fatores de crescimento			
Egf	Epidermal growth factor	-	-1,52
Fgf1	Fibroblast growth factor 1	-	-
Fgf2	Fibroblast growth factor 2	-	-
Fgf3	Fibroblast growth factor 3	-	-
Igf1	Insulin-like growth factor 1	-	1,92
Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha	-	-
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	-	-
Vegfb	Vascular endothelial growth factor B	-	-
Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	-	-
Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	-	-
Receptores de integrina			

Símbolo	Descrição	Expressão Relativa (fold) - 21 dias	
		Bio	Bio-sc
<i>Itga2</i>	<i>Integrin alpha 2</i>	-	-
<i>Itga2b</i>	<i>Integrin alpha 2b</i>	-1,69	1,70
<i>Itga3</i>	<i>Integrin alpha 3</i>	-	-
<i>Itgam</i>	<i>Integrin alpha M</i>	-	-
<i>Itgav</i>	<i>Integrin alpha V</i>	-	-
<i>Itgb1</i>	<i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>	-	-
Colágeno			
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen, type X, alpha 1</i>	-	-8,61
<i>Col11a1</i>	<i>Collagen, type XI, alpha 1</i>	-	2,16
<i>Col12a1</i>	<i>Collagen, type XII, alpha 1</i>	-	-
<i>Col14a1</i>	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>	-	-1,68
<i>Col1a1</i>	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-	-
<i>Col1a2</i>	<i>Collagen, type I, alpha 2</i>	-	1,88
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	-	-
<i>Col3a1</i>	<i>Collagen, type III, alpha 1</i>	-	-
<i>Col4a1</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 1</i>	-	-
<i>Col4a2</i>	<i>Collagen, type IV, alpha 2</i>	-	-
<i>Col5a1</i>	<i>Collagen, type V, alpha 1</i>	-	-
<i>Col6a1</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 1</i>	-	-
<i>Col6a2</i>	<i>Collagen, type VI, alpha 2</i>	-	-
<i>Col7a1</i>	<i>Collagen, type VII, alpha 1</i>	-	-
Genes relacionados à cartilagem			
<i>Comp</i>	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>	-	-
<i>Sox9</i>	<i>SRY – box containing gene 9</i>	-	-
Metaloproteinases			
<i>Mmp10</i>	<i>Matrix metalloproteinase 10</i>	-	-
<i>Mmp2</i>	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	-	1,53
<i>Mmp8</i>	<i>Matrix metalloproteinase 8</i>	-	-
<i>Mmp9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	-	2,23
Fatores de Transcrição			
<i>Msx1</i>	<i>Homeobox, msh-like 1</i>	-	2,42
<i>Nfkb1</i>	<i>Nuclear factor of kappa in B-cells 1, p105</i>	-	-
<i>Runx2</i>	<i>Runt related transcription factor 2</i>	-	-
<i>Smad1</i>	<i>MAD homolog 1 (Drosophila)</i>	-	2,53
<i>Smad2</i>	<i>MAD homolog 2 (Drosophila)</i>	-	-
<i>Smad3</i>	<i>MAD homolog 3 (Drosophila)</i>	-	-
<i>Smad4</i>	<i>MAD homolog 4 (Drosophila)</i>	-	-
<i>Twist1</i>	<i>Twist homolog 1 (Drosophila)</i>	-	-
Outros genes			
<i>Ctsk</i>	<i>Cathepsin K</i>	-	-
<i>Serpinh1</i>	<i>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1</i>	-	-
<i>Tuft1</i>	<i>Tuftelin 1</i>	-	-
<i>Tfip11</i>	<i>Tuftelin interacting protein 11</i>	-	-
<i>Anxa5</i>	<i>Annexin A5</i>	-	-
<i>Ambn</i>	<i>Ameloblastin</i>	-1,78	-
<i>Enam</i>	<i>Enamelin</i>	-	-
<i>Sost</i>	<i>Sclerostin</i>	-	-
<i>Tnf</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>	-	-

Tabela 9. Proporções de genes sobre-expressos e reprimidos, por grupos de genes, de culturas de células MC3T3-E1 (sub-clone 14) crescidas sobre Biosilicato® (Bio) e Biosilicato® para *scaffold* (Bio-sc) por períodos de 7, 12 e 21 dias, em comparação àquelas sobre Bioglass® 45S5 (45S5). Marcações com tons escuros representam sobre-expressão (verde) ou repressão (vermelho) de uma proporção maior ou igual a 50% dos genes avaliados em cada grupo, enquanto que aquelas em tons claros, inferior a 50%

Período/Grupos de genes	7 dias		12 dias		21 dias	
	Bio	Bio-sc	Bio	Bio-sc	Bio	Bio-sc
Sobre-expressos						
Proteínas da matriz óssea	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
Superfamília das BMPs	0/10	0/10	3/10	3/10	0/10	1/10
Receptores	0/16	0/16	14/16	7/16	0/16	4/16
Fatores de crescimento	0/10	0/10	8/10	5/10	0/10	1/10
Receptores de integrina	0/6	0/6	4/6	4/6	0/6	1/6
Colágeno	0/16	1/16	10/16	7/16	0/16	2/16
Relacionados à cartilagem	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	0/2
Metaloproteinases	0/4	0/4	3/4	3/4	0/4	2/4
Fatores de transcrição	0/8	0/8	6/8	6/8	0/8	2/8
Outros genes	0/9	0/9	3/9	3/9	0/9	0/9
Reprimidos						
Proteínas da matriz óssea	4/5	4/5	0/5	0/5	0/5	1/5
Superfamília das BMPs	6/10	4/10	2/10	0/10	1/10	0/10
Receptores	12/16	9/16	1/16	0/16	2/16	1/16
Fatores de crescimento	7/10	4/10	1/10	0/10	0/10	1/10
Receptores de integrina	5/6	2/6	0/6	0/6	1/6	0/6
Colágeno	12/16	4/16	0/16	0/16	0/16	2/16
Relacionados à cartilagem	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Metaloproteinases	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Fatores de transcrição	8/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Outros genes	5/9	1/9	2/9	0/9	1/9	0/9

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente estudo *in vitro* avaliou-se o desenvolvimento do fenótipo osteogênico de células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, bem como o perfil de expressão de genes relacionados à osteogênese em momentos distintos da progressão dessas culturas sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos. Os resultados mostraram diferenças significantes no potencial osteogênico das células MC3T3-E1 sobre os diferentes substratos, maior para os materiais bioativos, que correspondem a uma expressão diferencial de genes durante as fases 1) proliferativa, 2) de diferenciação osteoblástica e de síntese e maturação da matriz extracelular e 3) de mineralização da matriz extracelular. Entre os materiais bioativos testados, maior mineralização foi observada em culturas sobre Bio-sc, as quais exibem maiores proporções de inibição de genes dos diferentes grupos em 7 dias e de sobre-expressão, em 12 e 21 dias, em um perfil que as distingue das culturas sobre 45S5 e Bio.

Materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas para diferentes aplicações nas áreas médicas e odontológicas, o que inclui Bioglass® 45S5 (Biogran® e Perioglas®), A/W® (apatita-wolastonita) e Biosilicato® (BELLUCCI et al., 2010). Dependendo do tipo de defeito ósseo a ser tratado, devem, idealmente, ser preparados como partículas de diferentes dimensões ou *scaffolds*. Quando exposta a fluidos biológicos, a superfície desses materiais, diferentemente da de vidros bioinertes como o borossilicato, exibem modificações químicas e topográficas que resultam na formação de uma camada de hidroxycarbonatoapatita (HCA) sobre sílica-gel (HENCH; WILSON, 1984; ANDRADE;

DOMINGUES, 2006). Apesar de conceitos clássicos de bioatividade estarem relacionados à velocidade com que essas reações ocorrem em fluido corporal simulado (SBF, na sigla em inglês), com formação mais rápida de HCA correspondendo à maior bioatividade, e à habilidade do material de se ligar à matriz óssea, aspectos favoráveis de interação de células com os substratos reativos e de formação tecidual na região interfacial podem não estar associados exclusivamente aos materiais mais bioativos (revisado por Bellucci et al., 2010). Assim, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* devem considerar avaliações de um amplo espectro de parâmetros para uma maior compreensão dos efeitos biológicos sobre células e tecidos na dependência do nível de bioatividade do material vítreo ou vitrocerâmico.

As vitrocerâmicas são desenvolvidas a partir da cristalização controlada de vidros por diferentes protocolos de tratamento térmico (PEITL et al., 2001; CROVACE, 2009; PEITL et al., 2012). Apesar de estudos mostrarem a redução da bioatividade de vidros bioativos por adição de novas fases cristalinas ao material vítreo (revisado por Bellucci et al., 2010), alta bioatividade foi observada para o Biosilicato[®] em comparação ao vidro que lhe deu origem (Biosilicato[®] vítreo) e ao Bioglass[®] 45S5, *gold standard* pertencente ao mesmo sistema quaternário, determinada pelos resultados de exposição ao SBF e de maior potencial osteogênico de culturas primárias de células osteoblásticas (MOURA et al., 2007). Apesar de esses resultados *in vitro* sugerirem efeitos positivos do Biosilicato[®] sobre o processo de reparo ósseo, confirmado por Granito et al. (2009, 2011) utilizando material particulado em defeitos ósseos de ratos, o desenvolvimento de *scaffolds* desse material dependeria de modificações no protocolo de tratamento térmico visando à formação de estruturas tridimensionais com poros interconectados. Em sua aplicação clínica, essas estruturas deveriam permitir, idealmente, o carreamento

de células e/ou fatores de crescimento, bem como o estímulo e o direcionamento da neoformação óssea durante o processo de reparação tecidual (ROSA et al., 2008). Neste contexto, Crovace (2009), por meio de sinterização controlada do Biosilicato®, obteve *scaffolds* com bioatividade comparável à do Bioglass® 45S5, mesmo com a adição de nova fase cristalina, de fosfato de cálcio, de alta reatividade, na proporção da ordem de 5%, e com porosidade que variava na dependência da técnica utilizada para a síntese dos *scaffolds*, se por réplica ou por adição de agentes porogênicos. Os resultados de nosso estudo *in vitro*, utilizando esta preparação de Biosilicato® estruturada em discos destituídos de poros, indicam que o Bio-sc favorece, diferencialmente em relação aos demais materiais avaliados, o desenvolvimento do fenótipo osteogênico, o que, provavelmente, corresponderia ao estímulo à formação óssea *in vivo* com a implantação de *scaffolds* de Bio-sc em defeitos ósseos. Além disso, o Bio-sc poderia ser também utilizado como material particulado com vantagens, substituindo a preparação original de Biosilicato®, cujas avaliações *in vitro* e *in vivo* já indicavam benefícios aos processos de diferenciação osteoblástica e de reparação do tecido ósseo, respectivamente (MOURA et al., 2007; GRANITO et al., 2009; GRANITO et al., 2011).

O modelo experimental utilizado neste trabalho para avaliar a diferenciação osteoblástica sobre materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos foi o de células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, de camundongo, cujos eventos sequenciais de aquisição do fenótipo osteoblástico maduro assemelham-se aos de osteoblastos durante a formação do tecido ósseo *in vivo* (QUARLES et al., 1992). Essas características das culturas de células MC3T3-E1 permitiram avaliar se os efeitos do crescimento dessas células sobre os diferentes materiais na expressão de genes relacionados ao tecido ósseo seriam diferentes em momentos distintos da

cultura, representando as fases proliferativa (1-9 dias), de diferenciação osteoblástica e de síntese e maturação da matriz extracelular (9-16 dias) e de mineralização da matriz extracelular (16-21 dias). Assim, a opção pelos tempos de avaliação de 7, 12 e 21 dias resultou na observação de aspectos diferenciais no perfil de expressão gênica entre os materiais bioativos em comparação ao controle bionerte (Boro), entre as duas preparações de Biosilicato® quando comparadas ao controle bioativo (45S5) e entre os tempos experimentais. Isso poderia ser devido a diferenças na dinâmica das reações de superfície dos materiais bioativos, ausentes no borosilicato, cujos produtos de dissolução iônica podem afetar a expressão gênica em células osteoblásticas (HENCH et al., 2000; XYNOS et al., 2001; LOTY et al., 2001; HENCH et al., 2002; ANDRADE; DOMINGUES, 2006). Além disso, o processo complexo de adsorção de proteínas do soro sobre os substratos reativos poderia ser afetado, temporalmente, pelas modificações sequenciais na composição química e energia de superfície, com efeitos sobre a sinalização celular via transdução de sinais; diferenças na cristalinidade dos materiais provavelmente não afetariam a adsorção de proteínas (BAHNIUK et al., 2012).

Com base nestes aspectos e nos resultados deste estudo *in vitro*, seria relevante avaliar em estudos futuros o Bio-sc em relação às características de superfície deste material, quando exposto a fluidos biológicos, que sejam fatores determinantes para os efeitos de maior diferenciação e atividade osteoblástica na região interfacial. Adicionalmente, para potenciais aplicações clínicas do Bio-sc, seria essencial a confirmação do estímulo à formação óssea em modelos experimentais *in vivo* de defeitos ósseos.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- 1) células MC3T3-E1 cultivadas sobre as superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos exibiram aumentos progressivos da população celular e da diferenciação osteoblástica, que resultaram em diferenças significativas na intensidade de mineralização da matriz extracelular entre os materiais, na seguinte ordem crescente: Boro < 45S5 < Bio < Bio-sc;
- 2) houve expressão diferencial de genes em fases distintas da progressão de células MC3T3-E1 para as comparações entre os materiais bioativos e o bioinerte e entre as duas preparações de Biosilicato® e o Bioglass® 45S5;
- 3) dentre os materiais avaliados, o Biosilicato® para *scaffold* favorece o maior potencial osteogênico de células MC3T3-E1, cujas maiores proporções de inibição de genes dos diferentes grupos ocorre em 7 dias, e de sobre-expressão, em 12 e 14 dias, em um perfil que as distingue das culturas sobre Biosilicato® e Bioglass® 45S5.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE AL, DOMINGUES RZ. Cerâmicas bioativas – estado da arte. Quim Nova 2006; 29:100-104.
- BELLUCCI D, CANNILLO V, SOLA A. An overview of the effects of thermal processing on bioactive glasses. Sci Sinter 2010; 42:307-320.
- BAHNIUK MS, PIRAYESH H, SINGH HD, NYCHKA JA, UNSWORTH LD. Bioactive glass 45S5 powders: effect of synthesis route and resultant surface chemistry and crystallinity on protein adsorption from human plasma. Biointerphases 2012;7:41.
- BRÖMER H, KAES HH, PFEIL E (to Ernst Leitz GmbH). Biocompatible glass ceramic material. US Patent Documents No. 3,981,736, 21 Sep. 1976. Int. C. A61F001/00.
- BRUNSKI JB, PULEO DA, NINCI A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. Int J Oral Maxillofac Implants 2000; 15:15-46.
- CHEN QZ, THOMPSON ID, BOCCACCINI AR. 45S5 Bioglass ((R))-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 2006; 27:2414-2425.
- CROVACE MC. Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato®. 2009. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- DE CASTRO LMS. Osteogênese *in vitro* sobre vitrocerâmica 100% cristalina e altamente bioativa (Biosilicato®): efeitos do condicionamento de superfície e dos produtos de dissolução iônica. 2009. 98 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- DE OLIVEIRA PT, NINCI A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials 2004; 25:403-413.
- DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, BELOTI MM, ROSA AL, NINCI A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. J Biomed Mater Res A 2007; 80:554-564.

- DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, IRIE K, NANJI A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:633-641.
- DUCHEYNE P, QIU Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999; 20:2287-2303.
- FRATZL-ZELMAN N, FRATZL P, HÖRANDNER H, GRABNER B, VARGA F, ELLINGER A, KLAUSHOFER K. Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse. *Bone* 1998; 23:511-520.
- GRANITO RN, RIBEIRO DA, RENNÓ AC, RAVAGNANI C, BOSSINI PS, PEITL-FILHO O, ZANOTTO ED, PARIZOTTO NA, OISHI J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Mater Sci Mater Med* 2009; 20:2521-2526.
- HATTAR S, ASSELIN A, GREENSPAN D, OBOEUF M, BERDAL A, SAUTIER JM. Potential of biomimetic surfaces to promote *in vitro* osteoblast-like cell differentiation. *Biomaterials* 2005; 26:839-848.
- HENCH LL, POLAK JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295:1014-1017.
- HENCH LL, POLAK JM, XYNOS ID, BUTTERY LDK. Bioactive materials to control cell cycle. *Mat Res Innovat* 2000; 3:313-323.
- HENCH LL, WEST JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Reports* 1996; 13:187-241.
- HENCH LL, WILSON J. An introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific, 1993. 386 p.
- HENCH LL, WILSON J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984; 226:630-636.
- IRIE K, ZALZAL S, OZAWA H, MCKEE MD, NANJI A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec* 1998; 252:554-567.
- JAMES PF. Glass ceramics: new compositions and uses. *J Non-Cryst Solids* 1995; 181:1-15.

- KOKUBO T, ITO S, SHIGEMATSU M, YAMAMURO T. Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass-ceramic for prosthetic application. *J Mater Sci* 1985; 20:2001-2004.
- LIVAK KL, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 22DDCT method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- LOSSDORFER S, SCHWARTZ Z, WANG L, LOHMANN CH, TURNER JD, WIELAND M, COCHRAN DL, BOYAN BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70:361-369.
- LOTY C, SAUTIER JM, TAN MT, OBOEUF M, JALLOT E, BOULEKBACHE H, GREENSPAN D, FOREST N. Bioactive glass stimulates *in vitro* osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *J Bone Miner Res* 2001; 16:231-239.
- MOFFATT P, GAUMOND MH, SALOIS P, SELLIN K, BESSETTE MC, GODIN E, DE OLIVEIRA PT, ATKINS GJ, NINCI A, THOMAS G. Bril: a novel bone-specific modulator of mineralization. *J Bone Miner Res* 2008; 23:1497-1508.
- MOORE WR, GRAVES SE, BAIN GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71:354-361.
- MOURA J, TEIXEIRA LN, RAVAGNANI C, PEITL O, ZANOTTO ED, BELOTI MM, PANZERI H, ROSA AL, DE OLIVEIRA PT. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). *J Biomed Mater Res A* 2007; 82:545-557.
- NINCI A, MCKEE MD, ZALZAL S, SAKKAL S. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of the tissue response to metal implants in the rat tibia. *In: DAVIDOVITCH, Z.; MAH, J. eds. Biological mechanisms of tooth eruption, resorption and replacement by implants.* Boston: Harvard Society for the Advancement of Orthodontics, 1998; 487-500.
- NINCI A, ZALZAL S, GOTOH Y, MCKEE MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996; 33:214-231.
- PEITL O, ZANOTTO ED, HENCH LL. Highly bioactive P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 glass-ceramics. *J Non-Cryst Solids* 2001; 292:115-126.

- PEITL O, ZANOTTO ED, SERBENA FC, HENCH LL. Compositional and microstructural design of highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics. *Acta Biomater* 2012; 8:321-332.
- PULEO DA, HOLLERAN LA, DOREMUS RH, BIZIOS R. Osteoblast responses to orthopedic implant material *in vitro*. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:711-723.
- QUARLES LD, YOHAY DA, LEVER LW, CATON R, WENSTRUP RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; 7:683-692.
- ROSA AL, DE OLIVEIRA PT, BELOTI MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 2008; 5:719-728.
- RENNO AC, MCDONNELL PA, CROVACE MC, ZANOTTO ED, LAAKSO L. Effect of 830 nm laser phototherapy on osteoblasts grown *in vitro* on Biosilicate scaffolds. *Photomed Laser Surg* 2010; 28:131-133.
- RORIZ VM, ROSA AL, PEITL O, ZANOTTO ED, PANZERI H, DE OLIVEIRA PT. Efficacy of a bioactive glass-ceramic (Biosilicate) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21:148-155.
- SCHWARTZ FO HO, NOVAES AB JR, DE CASTRO LMS, ROSA AL, DE OLIVEIRA PT. *In vitro* osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. *Clin Oral Implants Res* 2007; 18:333-344.
- VETRONE F, VARIOLA F, TAMBASCO DE OLIVEIRA P, ZALZAL SF, YI JH, SAM J, BOMBONATO-PRADO KF, SARKISSIAN A, PEREPICHKA DF, WUEST JD, ROSEI F, NANJI A. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano Lett* 2009; 9:659-665.
- XYNOS ID, EDGAR AJ, BUTTERY LD, HENCH LL, POLAK JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:461-465.
- XYNOS ID, EDGAR AJ, BUTTERY LD, HENCH LL, POLAK JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res* 2001; 55:151-157.