

CRISTIANE MACHADO MENGATTO

Cirurgiã-Dentista

**INFLUÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D
NOS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA
DURANTE A OSSEOINTEGRAÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Clínica Odontológica – Área de Prótese Dental.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

**PIRACICABA
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

M524i Mengatto, Cristiane Machado.
Influência da deficiência de vitamina D nos padrões de expressão gênica durante a osseointegração. / Cristiane Machado Mengatto. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Titânio. 2. Genética. 3. Biologia molecular. 4. Implantes dentários. I. Rizzatti-Barbosa, Célia Marisa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Influence of vitamin D deficiency in gene expression profiles during osseointegration

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Titanium. 2. Genetics. 3. Molecular biology. 4.

Dental implants

Área de Concentração: Prótese Dental

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jacks Jorge Junior, Francisco Gorgonio da Nóbrega, Leonardo Marchini

Data da Defesa: 26-03-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica

Folha de aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 26 de Março de 2009, considerou a candidata CRISTIANE MACHADO MENGATTO aprovada.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Celia Marisa Rizzatti Barbosa".

PROFa. DRa. CELIA MARISA RIZZATTI BARBOSA

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Leonardo Marchini".

PROF. DR. LEONARDO MARCHINI

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Francisco Gorgônio da Nóbrega".

PROF. DR. FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Jacks Jorge Junior".

PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Altair Antoninha Del Bel Cury".

PROFa. DRa. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY

Dedicatória

Dedico este trabalho a

Deus, Grande Pai;

meu pai **Edson** (*in memorium*), exemplo de vida;

minha querida mãe **Janete**, essencial alicerce;

minha querida irmã **Luciene**, amiga inseparável;

meu amado marido **Fábio**, porto seguro.

A vocês, todo meu amor e gratidão.

Agradecimentos Especiais

À orientadora e amiga, **Profª. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa**, pelos valiosos ensinamentos, apoio e paciência nas horas decisivas. Que Deus a abençoe e ilumine sempre.

À **Profª. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, pelo carinho, amizade, encorajamento e grandes ensinamentos acadêmicos e de profissionalismo.

Ao **Prof. Dr. Ichiro Nishimura**, um exemplo de conduta profissional a ser seguido, pela atenciosa orientação na realização deste trabalho, motivação e acolhimento em seu laboratório na Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA).

Ao **Prof. Dr. Federico Mussano**, da Universidade de Torino, Itália, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pela valiosa amizade edificada.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, CAPES, pelo suporte financeiro durante a execução deste trabalho, na forma de Bolsa de PDEE, processo 3876-07-1.

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador dos Cursos de Pós-Graduação em Odontologia da FOP/UNICAMP, pela receptividade, integridade e presteza.

À **Prof^a Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, responsabilidade com que exerce seu cargo.

Ao **Prof. Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega**, professor titular aposentado da Universidade de São Paulo e professor colaborador da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pelos valiosos ensinamentos e paciência durante minha introdução às técnicas e conceitos da Biologia Molecular e constante incentivo ao desenvolvimento científico.

Aos eficientes funcionários do Programa de Pós-graduação e do Departamento de Prótese e Periodontia, **Érica A. Pinho Sinhoretti, Raquel Q. Marcondes Cesar Sacchi, Emílio Carlos Salles, Eliete Aparecida Ferreira Lima e Joselena Casati Loti** pela imensa bondade, educação e solicitude. Meus sinceros agradecimentos.

À querida **família Mengatto**, pela amizade, carinho e acolhimento.

À **Dra. Audrey Lin, Dra. Supaningar Ruansri, e Sra. Joyce Schumann**, pelo carinho, amizade, e assistência durante os procedimentos cirúrgicos e histológicos.

Aos queridos amigos **Elisabete Ting, Thaisângela Gomes, Daniela de Toledo, Wander José da Silva, Fabio Joia, Daniel de Angelis, Leonardo Marchini, Persio A. Faber, Danilo Roberto, Tatiana Zupekan, Gizelle Cruz,** expresso minha eterna admiração por suas integridades profissional, ética e moral; e minha gratidão por participarem dos desafios e alegrias conquistados durante minha caminhada acadêmica com sincero companheirismo, compreensão, amizade e carinho.

“ ... a ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas. A ciência, para mim, é baseada em fato, conhecimento e experimentação.

Concordo que a fé é essencial para o sucesso na vida (sucesso de qualquer tipo). Na minha opinião, o que é necessário para ter fé é a crença de que fazendo o melhor possível chegaremos mais próximo do sucesso e de que vale a pena buscar o sucesso em nossos objetivos (o melhoramento, presente e futuro, da humanidade).”

Rosalind Franklin, em uma carta para seu pai, em 1940.

RESUMO

A deficiência de vitamina D pode representar um fator de risco para a perda de implantes. Os objetivos deste estudo foram: (a) investigar a influência da deficiência de vitamina D nos padrões de expressão gênica durante a osseointegração *in vivo*, e (b) avaliar a influência da vitamina D e do titânio na expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo *in vitro*. Para atingir o primeiro objetivo, dezesseis ratos foram distribuídos em quatro grupos segundo o tipo de dieta recebida e à inserção ou não de implante em seus fêmures: OSTV+ (dieta padrão/ osteotomia), OSTV- (dieta deficiente de vitamina D/ osteotomia), NTV+ (dieta padrão/ inserção de implante) e NTV- (dieta deficiente de vitamina D/ inserção de implante). Duas semanas após a cirurgia, o RNA foi isolado a partir do tecido ósseo, e as expressões de aproximadamente 41.000 transcritos foram determinadas pela tecnologia de microarray. A comparação entre os grupos foi realizada através de ANOVA bifatorial (correção de Benjamini-Hochberg, $p \leq 0,05$). Investigou-se a provável co-regulação e função dos genes alterados através da aplicação de algoritmos de clusterização (hierárquico e PAM) e comparação com os bancos de dados da KEGG e Ontologia Gênica. Para abordar o segundo objetivo, células multipotentes de medula óssea foram cultivadas sobre superfícies plásticas ou discos de titânio, com meio de cultura suplementado ou não com vitamina D. O RNA foi extraído das células após um, três, sete e quatorze dias de cultura e as expressões dos genes de colágeno tipos I, II e X, osteocalcina, osteopontina, osteonectina, RUNX2 e SOX9 foram medidas por RT-PCR. Os resultados mostraram que a expressão de 1.668 transcritos foi alterada *in vivo*. Esta alteração foi atribuída à inserção do implante em 1.661 transcritos, à deficiência de vitamina D em 13 transcritos (entre eles: NPAS2, Per2, GILZ, IGFBP3, Fra1, B29 e RGD1564491); e à interação entre os dois fatores em 7 transcritos (entre eles: EPO, Cyp2b15, Pole e CTTNBP2). Os genes agruparam-se em dois padrões alterados de expressão onde a inserção de implante induziu

(1.080 transcritos) ou suprimiu (588 transcritos) a expressão gênica, e a deficiência de vitamina D atenuou a expressão. Estes genes participaram de cinco processos durante a osseointegração: formação de matriz extracelular, controle do metabolismo ósseo, angiogênese, proliferação celular e resolução da inflamação e resposta imune. Os genes integrantes de matriz extracelular mais afetados pela inserção do implante *in vivo* foram colágeno tipos II e X. A clusterização hierárquica mostrou que o gene NPAS2 localizou-se no cluster do colágeno tipos II e X, enquanto o Per2 localizou-se no cluster do TSC22, B29 e RGD1564491. *In vitro*, a expressão do colágeno tipos II e X foi induzida após um dia quando as células foram cultivadas sobre discos de titânio, mas não foi afetada pela vitamina D. Concluiu-se que a deficiência de vitamina D afetou a expressão gênica após durante a osseointegração; a expressão dos colágenos II e X aumentou quando da presença de titânio (*in vivo* e *in vitro*), e reduziu quando da deficiência de vitamina D (*in vivo*, mas não *in vitro*).

Palavras-chave: Deficiência de vitaminas, Titânio, Genética, Biologia Molecular, Implante dentário

ABSTRACT

Vitamin-D deficiency has been considered as systemic risk factor for impaired osseointegration. Our aims were: (a) to verify the influence of vitamin D deficiency in gene expression profiles during osseointegration *in vivo*, and (b) to evaluate the effect of vitamin D supplementation and titanium on the expression of genes related to bone metabolism *in vitro*. For the first experiment, sixteen rats were allocated into 4 groups according to the diet type and surgical procedures in their fêmers: OSTV+ (standard diet/ osteotomy), OSTV- (vitamin D deficient diet/ osteotomy), NTV+ (standard diet/ insertion of implant), and NTV- (vitamin D deficient diet/ insertion of implant). RNA was isolated after two weeks of healing and Agilent-Microarray was used to screen 41,000 genes. Two-way ANOVA (Benjamini-Hochberg correction, $p \leq 0.05$) was used to compare expression among the groups. Hierarchical and PAM clusterization, statistical analysis of KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) and GO (Gene Ontology) were used to investigate the putative co-regulation and function of differently expressed genes. For the *in vitro* experiment, femoral bone marrow multipotent precursors were cultured on plastic dishes or titanium disks, with or without vitamin D supplementation. RNA was isolated after 1, 3, 7 and 14 days of culture and the expression of collagen types II and X was measured by RTPCR. We found a total of 1,668 differently expressed transcripts among which 1,661 transcripts were differently expressed due to insertion of implant effect; 13 were due to vitamin D deficiency effect (such as: NPAS2, Per2, GILZ, IGFBP3, Fra1, B29 and RGD1564491); and 7 due to the interaction effect between these two factors (such as: EPO, Cyp2b15, Pole and CTTNBP2). From PAM clusterization, the differently expressed genes were grouped into two expression profiles, in which implant was the main inducer of over-expression (1,080 genes) or under-expression (588 genes), while the vitamin-D deficiency attenuated the expression of these genes during osseointegration. From 16 KEGG pathways over-represented by our gene-list, we could summarize five main processes occurring at two-week

osseointegration: formation of extracellular matrix and cell-interaction; angiogenesis; resolution of inflammation and immune response; control of bone metabolism; and cell proliferation. Hierarchical clusterization showed that Per2 co-localized with TSC22, B29 and RGD1564491, while NPAS2 co-localized with collagen types II and X. GO analysis demonstrated that collagen types II and X were the most affected extracellular matrix genes by the vitamin D deficiency. The expression of collagen types II and X was significantly increased at an early stage (day 1) when cells were cultured on titanium disks regardless the vitamin D condition in the media. We concluded that vitamin D deficiency negatively affected gene expression after 2-week osseointegration; and the expression of collagen types II and X increased when titanium was present (*in vivo* and *in vitro*) and decreased under the vitamin D deficiency (*in vivo*, but not *in vitro*).

Keywords: Vitamin deficiency, Titanium, Genetics, Molecular Biology, Dental Implant

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP2	Proteína morfogenética de osso 2
cDNA	DNA complementar (ácido desoxirribonucléico)
Col1a2	Colágeno tipo I, alfa 2
Col10a1	Colágeno tipo X, alfa 1
Col2a1	Colágeno tipo II, alfa 1
Col5a1	Colágeno tipo V, alfa 1
Col9a3	Colágeno tipo IX, alfa 1
CTTNBP2	Proteína de ligação da cortactina 2
CYP2b15	Citocromo P450, família 2, subfamília b, polipeptídeo 12
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
ECM	Matriz extracelular
EPO	Eritropoietina
FBS	Soro fetal bovino
FDR	Taxa de falsas descobertas
FRA1	Fos-like antígeno 1
GAPDH	Gliceraldeído desidrogenase 3
GILZ	Zíper de leucina induzido por glucorticóide
GO	Ontologia Gênica
HIF1	Fator induzível por hipóxia-1
HIF1 α	Fator induzível por hipóxia-1, subunidade alfa
HIF1 β	Fator induzível por hipóxia-1, subunidade beta
HPLP	Proteína de ligação de hialurano e proteoglicano
IGF1	Fator de crescimento da insulina-1
IGFBP3	Proteína 3 de ligação do fator de crescimento da insulina
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
NPAS2	Domínio 2 neuronal Per-Arnt-Sim
OSC	Osteocalcina (Proteína Gla da matriz-óssea)
OSN	Osteonectina (SPARC)
OSP	Osteopontina (BSP1, SSP1)
P4H	Prolil hidroxilase 4
PAM	Particionamento sobre medóides (Partitioning Around Medoids)
Per2	Homólogo do Período 2 (<i>Drosophila</i>)
PPAR	Receptor ativador da proliferação de peroxissomo
PS	Penicilina-estreptomina
RA	Ácido retinóico
RANKL	Ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa B
RGD1564491	Similar ao fator de Von Willebrand 5B
RNA	Ácido ribonucléico

RTPCR	Reação de polimerase em cadeia em tempo real
Runx2	Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2
Ti	Titânio
TSC22d3	Clone 22 estimulado pelo TGFB domínio 3
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VD	Vitamina D

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	05
PROPOSIÇÃO.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES.....	91
ANEXOS.....	93

1. INTRODUÇÃO

A vitamina D é um hormônio esteroide essencial que participa de variadas reações fisiológicas incluindo o metabolismo ósseo (Slominski & Wortsman, 2000; Lin & White, 2004). Suas fontes, funções e metabolismo encontram-se descritos extensivamente na literatura (Reginster, 2005; Wolpowitz & Gilcrest, 2006; Lips, 2007; Misra *et al.*, 2008; St-Arnaud, 2008). A forma inativa circulante da vitamina D, colecalciferol (25(OH)D), é a precursora direta do calcitriol (1,25(OH)₂D), hormônio que é capaz de ativar efetivamente o receptor da vitamina D (VDR) e regular diretamente a expressão gênica (Wang *et al.*, 2005). A deficiência severa de vitamina, geralmente associada à concentração sorológica de 25(OH)D abaixo de 25nmol/L (média de 25-40 nmol/L) em humanos e 50 nmol/L em roedores (Fleet *et al.*, 2008), pode levar à condição clínica de osteomalácia em adultos (Bar-Shavit *et al.*, 1983) ou raquitismo em crianças (Wolpowitz & Gilcrest, 2006; Misra *et al.*, 2008). Embora não exista um consenso definitivo sobre a concentração sorológica de 25(OH)D que represente a condição de insuficiência, os baixos níveis de vitamina D constituem um problema atual da população mundial (Lips, 2001). Estes quadros são mais prevalentes entre os idosos (Reginster, 2005; Wolpowitz & Gilcrest, 2006; Hypponen *et al.*, 2008), as pessoas institucionalizadas (Fardellone *et al.*, 1995), os pacientes com osteoporose (Holick, 2004; Meier *et al.*, 2004), e as mulheres em pós-menopausa (Bhattoa *et al.*, 2004; Sahota *et al.*, 2004; Need *et al.*, 2007). Entretanto, outros estudos afirmam que isto parece ser independente da estação do ano (Romagnoli *et al.*, 1999; Armas *et al.*, 2008), da latitude geográfica (van der Wielen *et al.*, 1995), da idade (Misra *et al.*, 2008), raça ou estado de saúde do indivíduo (Harris *et al.*, 2000). A deficiência de vitamina D foi considerada um fator sistêmico de risco para doenças ósseas metabólicas (Bar-Shavit *et al.*, 1983; Heaney & Weaver, 2003; Reginster, 2005). Níveis reduzidos de vitamina D também foram associados ao hiperparatireoidismo secundário, aceleração da remodelação e

reabsorção óssea, bem como o risco aumentado de fraturas (Need *et al.*, 2004; Sahota *et al.*, 2004; Fleet *et al.*, 2008; Reginster, 2005).

A falha precoce na osseointegração de implantes pode ser descrita como a incapacidade de se estabelecer um contato íntimo entre osso e implante (Esposito *et al.*, 1998a; 1998b; Quirynen *et al.*, 2002), de forma que a cicatrização óssea após a inserção do implante torna-se prejudicada (Alsaadi *et al.*, 2007). Falhas precoces na osseointegração podem ser causadas por fatores locais, genéticos e sistêmicos (Esposito *et al.*, 1998a; 1998b; Alsaadi *et al.*, 2007; Alsaadi *et al.*, 2008; Alvim-Pereira *et al.*, 2008a; Holahan *et al.*, 2008). Embora as falhas no processo de osseointegração sejam raras, a ocorrência alta de perda precoce de implantes foi reportada em paciente portador de raquitismo hipofosfatêmico dominante ligado ao cromossomo X. O relato literário deste caso sugeriu que sucesso da osseointegração de implantes pode ser dependente de processos biológicos importantes, que se encontrem alterados nos pacientes portadores de raquitismo (Lekholm, 2003). Um estudo recente também investigou a hipovitaminose D como uma possível causa de perda precoce de implantes, e encontrou que os valores do teste de tração a que foram submetidos as peças de implante estavam reduzidos significativamente quando as mesmas foram inseridas em fêmures de ratos deficientes de vitamina D (Kelly *et al.*, 2009).

Considerando a alta incidência de níveis inadequados de vitamina D entre a população mundial, associada aos outros estudos relacionando a vitamina D aos insucessos ligados à instalação de implantes (Lekholm, 2003; Kelly *et al.*, 2009), decidiu-se investigar as possíveis alterações dos padrões de expressão gênica do tecido ósseo peri-implantar induzidas pela deficiência de vitamina D. Assim, os objetivos do presente estudo foram determinar, *in vivo*, os padrões de expressão gênica durante a osseointegração em ratos suficientes e deficientes de vitamina D, e avaliar, *in vitro*, o efeito da vitamina D e do titânio na expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo ósseo. As

seguintes hipóteses foram formuladas: a deficiência de vitamina D afeta negativamente a expressão gênica durante a osseointegração de implantes *in vivo*, e a vitamina D e o titânio podem modular a expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vitamina D e hipovitaminose D

A vitamina D, erroneamente chamada de “vitamina”, é um hormônio esteroideal que pode modular a expressão gênica em células de diversos tecidos em organismos eucarióticos, através da ligação ao seu receptor. Vasta literatura (Slominski & Wortsman, 2000; Lips, 2001; Heaney & Weaver, 2003; Lin & White, 2004; Reginster, 2005; Wolpowitz & Gilcrest, 2006; Lips, 2007; Misra *et al.*, 2008; St-Arnaud, 2008) já discorreu sobre o metabolismo e funções das duas principais formas de vitamina D: a vitamina D₂ (ergocalciferol) e a D₃ (colecalciferol). A vitamina D₂ provém de fontes vegetais, levedura e centeio, e também encontra-se disponibilizada comercialmente sob a forma de suplemento vitamínico; já a vitamina D₃ provém de fontes animais presentes na dieta, principalmente na gema de ovo, óleo de fígado de bacalhau e peixes como o salmão, atum e sardinha; mas sua maior fonte é a pele. As glândulas sebáceas presentes na derme atuam na conversão da pró-vitamina 7-deidrocolesterol em vitamina D₃ quando da exposição à radiação ultravioleta B (UVB) e calor. Uma vez absorvida no intestino (D₂) ou formada na pele (D₃), a vitamina D é transportada para o fígado onde sofre sua primeira hidroxilação, tornando-se 25-hidroxi-vitamina D (25(OH)D), que pode se acumular nos tecidos ou permanecer circulante no sangue quando associada à proteína de ligação da vitamina D (DBP). No entanto, para a vitamina D exercer as funções fisiológicas nas células-alvo, a 25(OH)D precisa ser convertida em sua forma ativa, também chamada de calcitriol (1,25 dihidroxi-vitamina D (1,25(OH)₂D)), através da segunda hidroxilação ocorrida no rim.

Dentre as funções principais exercidas pela vitamina D no organismo, encontram-se: a manutenção do equilíbrio de cálcio e fósforo (Broadus *et al.*, 1984); o controle do transporte de cálcio nos rins e intestino, através dos canais de cálcio TRPV5 e TRPV6 (Hoenderop *et al.*, 2002; den Dekker *et al.*, 2003); a

formação, ativação e sobrevivência de osteoclastos, através da modulação da produção de RANKL (Lacey *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 1999; Pike *et al.*, 2007a; Pike *et al.*, 2007b); e a modulação de processos imunológicos, através da ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação de células-T, produção de anticorpos específicos e regulação do sistema imune (Moro *et al.*, 2008).

A hipovitaminose D foi considerada um problema mundial de saúde pública (Gannage-Yared *et al.*, 2001; Lips *et al.*, 2001). O estudo de Farias (2003) demonstrou que a prevalência da deficiência de vitamina D no Brasil foi semelhante a que ocorre nos Estados Unidos e maior do que a que ocorre no Canadá e nos países Escandinavos (Lips *et al.*, 2001). Farias (2003) avaliou 627 mulheres com idade acima de 50 anos (média de $63,9 \pm 8,3$ anos), tempo de menopausa de $16,2 \pm 8,6$ anos, entre os anos de 1999 e 2000. O autor encontrou que a prevalência de deficiência de vitamina D foi de 8% considerando valores de 25(OH)D abaixo de 15 ng/ml, 24% para valores abaixo de 20 ng/ml, e 43% para valores abaixo de 25 ng/ml. Ainda, demonstrou-se que a prevalência de deficiência de vitamina D aumentou com a idade, sendo encontrada em 30% das mulheres entre 50 e 60 anos e em mais de 80% das pacientes entre 80 e 89 anos. O autor também afirmou que a presença abundante de luz solar, como ocorre no Brasil, não preveniu a deficiência de vitamina D em mulheres pós-menopausa, e concluíram que, embora a condição severa de hipovitaminose D fosse rara no Brasil, sua deficiência assintomática subclínica foi freqüente, podendo resultar em reduzida densidade óssea, aceleração da remodelação óssea e aumento do risco às fraturas.

Gannage-Yared *et al.* (2001) e Lips (2006) mencionaram que a hipovitaminose D pode ser consequência do nascimento de crianças prematuras, da maior pigmentação da pele, da obesidade, da má absorção de vitamina D pelo intestino em pessoas com idade avançada, da baixa quantidade de vitamina D obtida através da dieta e da exposição solar insuficiente ligada à vida urbana moderna, ao alto grau de poluição das cidades, e ao uso de bloqueadores solares

e roupas tradicionais. Holick *et al.* (2007) também afirmaram que a deficiência de vitamina D estava relacionada principalmente à redução de exposição solar, e à subsequente diminuição da produção de vitamina D pela pele durante o inverno.

Os trabalhos de Dawson-Hughes *et al.* (2005) e Lips (2007) concordaram que a concentração sorológica de 25(OH)D maior que 50-80 nM representava a condição de suficiência de vitamina D. Embora ainda não se tenha um consenso na literatura, vários autores caracterizaram a deficiência de vitamina D como a condição aonde a concentração sorológica de 25(OH)D estava abaixo de 25nmol/L (média 25-40 nmol/L) em humanos, e 50 nmol/L em roedores (Lips *et al.*, 2001; Heaney, 2003; Heaney & Weaver, 2003; Wolpowitz & Gilcrest, 2006). Lips (2006, 2007) e Need *et al.* (2007) descreveram que níveis de 25(OH)D abaixo de 75nmol/L foram suficientes para elevar o PTH e alterar o processo de mineralização óssea. Os mesmos autores concordaram que a deficiência severa de vitamina D podia causar raquitismo (riquétisia) em crianças ou osteomalácia em adultos, prejudicando a adequada mineralização do osteóide durante a remodelação óssea. Também relataram que a deficiência menos severa de vitamina D podia levar a um aumento sorológico do hormônio paratireoideano (PTH) e, conseqüentemente, à osteoporose, reabsorção óssea e fraturas. Para estes autores,

Diferentes estudos observaram que a ocorrência de baixos níveis de vitamina D era independente da estação do ano (Romagnoli *et al.*, 1999; Armas *et al.*, 2008), da latitude geográfica (van der Wielen *et al.*, 1995), da idade (Misra *et al.*, 2008) e da raça ou estado de saúde do indivíduo (Harris *et al.*, 2000). Entretanto, outros estudos confirmaram que a hipovitaminose D era altamente prevalente entre os idosos (Reginster, 2005; Wolpowitz & Gilcrest, 2006; Hypponen *et al.*, 2008) e as pessoas institucionalizadas (Fardellone *et al.*, 1995), bem entre pacientes com osteoporose (Meier *et al.*, 2004) e mulheres em pós-menopausa (Bhattoa *et al.*, 2004; Need *et al.*, 2004; Sahota *et al.*, 2004; Armas *et al.*, 2008). Níveis reduzidos de vitamina D também foram associados ao

hiperparatireoidismo secundário, e, conseqüentemente, ao aumento da remodelação e perda óssea (Jesudason *et al.*, 2002; Need *et al.*, 2004; Sahota *et al.*, 2004; Fleet *et al.*, 2008), com maior reabsorção e risco de fraturas (Reginster, 2005).

2.2. Suplementação com vitamina D

Segundo o Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes (1997) a recomendação de suplementação via oral com vitamina D₂ (400-800 UI/dia) para pacientes entre 51 e 70 anos pode controlar os níveis de PTH, aumentar a densidade óssea e reduzir o risco à fraturas,. No entanto, como a vitamina D é um hormônio, torna-se difícil estabelecer qual a dose necessária de suplementação para se obter uma adequada concentração de sua forma ativa. Outra dificuldade encontra-se ligada à estimativa da quantidade de vitamina D que existe naturalmente nos alimentos. Holick *et al.* (2007) mencionaram que poucos alimentos contêm vitamina D naturalmente, e os que contêm possuem uma quantidade muito variável, sendo difícil sua precisa indicação como suplementação. Assim, Reginster (2005) descreveu que o tratamento via oral com suplementação de vitamina D (calcitriol) ou com os análogos da vitamina D apresentava uma pequena diferença entre as doses de eficácia clínica e toxicidade. Embora a toxicidade não ocorra pela exposição solar excessiva, a ingestão excessiva de suplementos pode levar à hipercalcúria e perda de densidade óssea (Wolpowitz & Gilcrest, 2006)

Reid *et al.* (1986) relataram que a exposição solar regular poderia ser um método profilático contra a deficiência de vitamina D. No entanto, além da rotina da vida moderna e o uso de bloqueadores solar interferirem com a adequada exposição solar para obtenção de níveis adequados de vitamina D, o processo de envelhecimento também contribui para que a exposição solar não seja um método eficaz para profilaxia contra a deficiência de vitamina D (Holick, 2004). Durante o processo de envelhecimento, há uma diminuição na produção de

7-deidrocolesterol pela pele. Sendo assim, um idoso de 70 anos que se expõe à mesma quantidade de raios UVB que um jovem, produz 80% menos vitamina D (Holick, 2004).

2.3. Vitamina D no controle da expressão gênica

Lips (2006) descreveu que o metabólito ativo da vitamina D (1,25(OH)₂D) pode entrar na célula, ligar-se ao receptor de vitamina D (VDR) no núcleo e este conjunto pode ligar-se a um gene que responde à vitamina D, como a proteína ligante de cálcio, para modular sua expressão diretamente.

Owen *et al.* (1991) e Sooy *et al.* (2005) cultivaram pré-osteoblastos em fase inicial e tardia de crescimento, respectivamente, e trataram as culturas com vitamina D. Verificaram que a vitamina D inibiu a expressão do colágeno tipo I e fosfatase alcalina em pré-osteoblastos de fase inicial; entretanto, quando em culturas em estágio avançado, a expressão destes dois genes foi estimulada pela vitamina D. Sendo assim, concluíram que a 1,25(OH)₂D podia regular positiva e negativamente a expressão de marcadores do fenótipo de osteoblastos, e que a resposta celular à vitamina D foi diferente, dependendo do estágio de crescimento e maturação das células. Para estágios precoces de osteoblastogênese, a vitamina D inibiu a diferenciação celular, e sua ausência levou ao aumento da diferenciação. No entanto, a vitamina D aumentou a diferenciação em osteoblastos em fase avançada de crescimento.

Schwartz *et al.* (1995) cultivaram condrócitos em dois estágios de diferenciação, obtidos a partir de tecido cartilaginoso costochondral de costela de ratos. Através deste modelo, avaliaram a influência da vitamina D na expressão gênica de condrócitos originados da zona de cartilagem hipertrófica ou de crescimento. Os autores verificaram que, na zona hipertrófica, 1,25(OH)₂D inibiu a proliferação mas estimulou a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de proteoglicanos e colágeno; enquanto, na zona de crescimento, a vitamina D estimulou o metabolismo de ácido aracdônico e a atividade da Proteinase K. Foi

concluído que a resposta dos condrócitos à vitamina D dependia da zona de maturação da qual as células se originaram.

Farach-Carson & Xu (2002) trataram osteoblastos ROS 17/2.8 com 1,25(OH)₂D durante 3 e 24 horas e utilizaram a tecnologia de microarray para detectar diferenças na expressão gênica dos efeitos calcêmicos e não-calcêmicos da vitamina D. Nas primeiras 3 horas, o tratamento com 1,25(OH)₂D promoveu a entrada de cálcio nas células e este é responsável por iniciar respostas rápidas da membrana extracelular e modulação gênica. No entanto, após este efeito inicial, os efeitos prolongados da 1,25(OH)₂D (após 24 horas) estão relacionados com a ativação do receptor da vitamina D (VDR) no núcleo e à modulação da expressão gênica. Sendo assim, os autores identificaram um conjunto de genes com expressão alterada após o tratamento com 1,25(OH)₂D. Entre os genes relacionados com a rápida resposta à vitamina D, estavam proteína-kinases e fosfatases, genes de sinalização de Ca²⁺, adesão celular. A resposta a longo prazo envolveu a ativação da fosforilação da osteopontina. Ainda, verificaram que a expressão dos genes da osteocalcina, osteopontina, calbidina, 24-hidroxilase foi estimulada pela 1,25(OH)₂D enquanto os genes das interleucinas 2 e 12, e proteína do receptor paratireoideano (PTHrP) foram inibidos pela 1,25(OH)₂D.

2.4. Processos biológicos e expressão gênica na osseointegração

Branemark (1983) definiu o termo osseointegração como o contato íntimo entre osso e implante. A interpretação dos processos celulares e moleculares envolvidos na osseointegração nos permite melhor compreensão deste processo, e, conseqüentemente, o desenvolvimento de superfícies de implante ou técnicas que possam acelerar e aperfeiçoar o estabelecimento da osseointegração.

Davies (2003) propôs a divisão do processo de osseointegração em três fases. Na primeira fase de cicatrização (osteocondução), ocorre o

recrutamento e migração de células osteogênicas em diferenciação para a superfície do implante, através da rede de fibrina formada pelo processo de coagulação ao redor do implante. O processo de osseointegração apresenta neoformação óssea característica, aonde novo osso é formado sobre a superfície do implante por células osteogênicas em diferenciação (osteogênese de contato). O processo de osteogênese de contato envolve o recrutamento e migração de células osteogênicas em diferenciação que são atraídas para a superfície do implante. A iniciação da ativação plaquetária, que resulta na migração das células osteogênicas, está entre os acontecimentos mais importantes da osteocondução. A segunda fase de cicatrização engloba a formação de novo osso (“de novo bone formation”), que resulta na mineralização da matriz na interface entre osso e implante. Estas duas primeiras fases resultam na osteogênese de contato, e adesão do implante ao osso. A terceira fase de cicatrização, processo mais demorado que a osteogênese de contato, corresponde à remodelação óssea através da reabsorção óssea promovida pela ação dos osteoclastos e da formação óssea sobre o tecido pré-existente a partir da aposição de matriz extracelular por células osteogênicas provindas do osso (osteogênese à distância).

Masuda *et al.* (1997) analisaram a resposta tecidual ao redor de implantes de titânio colocados na tibia de ratos após 2, 6, 10 e 28 dias. O modelo animal em ratos propiciou a avaliação dos estágios envolvidos na osseointegração de implantes em nível celular. A análise das respostas iniciais de cicatrização por microscopia eletrônica revelou a rápida formação de uma rede de fibrina e de uma matriz desorganizada de colágeno. Nesta etapa, células sangüíneas contactaram a superfície do implante. Ao 6º dia formou-se uma matriz mais organizada, contendo muitos vasos sangüíneos opostos à superfície do implante, enquanto poucas células sangüíneas permaneceram nesta região. Em torno do 10º dia, a ferida cirúrgica foi preenchida por osso imaturo. Poucas células estavam aderidas aos implantes quando estes foram removidos. A matriz mostrou-se consolidada

aos 28 dias. A interface entre osso e implante possuía uma matriz amorfa. Através da análise por microscopia de luz, verificou-se que a partir do 6º dia as células predominantes no espaço entre osso e implante eram similares a osteoblastos. Estas células osteobásticas promoveram a formação de uma matriz osteóide, a partir da qual a formação óssea teve continuidade. Esta matriz osteóide representava um osso imaturo com muitos osteócitos. Ao 6º dia, a remodelação óssea pode ser observada em locais distantes do sítio cirúrgico; e ao 28º dia, observou-se atividade osteoblástica no osso trabecular adjacente à superfície do implante.

O processo de osseointegração pode sofrer influência direta do tipo de superfície do implante e da sua micro e nanotopografia. Franchi *et al.* (2004) investigaram a influência de tipos diferentes de superfícies de implantes na osteogênese após duas semanas (cicatrização inicial) e três meses de osseointegração (cicatrização completa). Os autores inseriram 30 implantes cônicos com diferentes tratamentos de superfície (superfície lisa maquinada (SS), tratamento com spray de plasma (TPS), jateamento com óxido de zircônio (Zr-SLA)) na diáfise dos fêmures e tíbias de duas ovelhas. Após duas semanas de cicatrização, a análise histológica através de microscopia de luz revelou que a osteogênese à distância predominou em implantes de superfície lisa, enquanto ao redor de superfícies rugosas (TPS e Zr-SLA) ocorreram ambas as osteogêneses: a de contato e à distância. A análise por microscopia eletrônica dos implantes SS demonstrou a formação de um tecido ósseo escasso, fino e imaturo, caracterizando um osso trabecular imerso em matriz ampla, desorganizada e com uma rede de vasos sanguíneos. Ao redor dos implantes TPS e Zr-SLA formou-se significativo trabeculado ósseo que atravessava o espaço medular, com cristais ósseos em nódulos que indicaram um processo de mineralização ativo. Após três meses, todos os implantes mostraram-se osseointegrados, quase totalmente envolvidos por osso compacto maturo. No entanto, alguns espaços medulares

ricos em vasos sangüíneos e células indiferenciadas ainda permaneciam em contato com a superfície metálica de todos os tipos de implantes.

Franchi *et al.* (2005) investigaram os aspectos histológicos envolvidos na fixação biológica de implantes. Foram inseridos 48 implantes de titânio com diferentes tratamentos de superfície (liso, spray de plasma ou jateamento de areia) em fêmures e tíbias de ovelhas. As análises foram realizadas com microscópio de luz e eletrônico após 1 hora, 14 e 90 dias de cicatrização. Uma hora após a implantação, o espaço entre osso e implante foi preenchido com coágulo sangüíneo e espículas ósseas providas da preparação cirúrgica do sítio implantar com brocas. Após quatorze dias de cicatrização, novo osso trabecular foi formado no espaço entre osso e implante. A ausência de osteogênese foi notada onde as roscas dos implantes estavam em contato com o osso pré-existente. Noventa dias após, todo osso trabecular foi substituído por osso lamelar maduro com poucos espaços medulares.

Slaets *et al.* (2007) descreveram eventos celulares que ocorriam na cicatrização inicial do osso trabecular ao redor de implantes. Relataram que a inserção de implante no osso iniciava uma série de processos biológicos que incluíam a formação de hematoma, intensa remodelação óssea e formação de novo osso, eventualmente levando à osseointegração do implante.

A cicatrização óssea ao redor de implantes tem sido considerada um processo biológico distinto do reparo ósseo. No reparo ósseo normal não ocorre formação de novo osso sobre uma superfície sólida que não tenha osso ou matriz cartilaginosa pré-existente. Este processo ocorre apenas quando da inserção de implantes (LeGeros & Craig, 1993; Ogawa & Nishimura, 2003); (2) mesmo após a cicatrização peri-implantar ter sido completada, a formação óssea continua por um extenso período de tempo através do recrutamento de células osteogênicas em diferenciação para a superfície do implante (Grizon *et al.*, 2002); (3) na osseointegração, o padrão de expressão de alguns genes, especialmente os

relacionados com formação de matriz óssea, é diferente do que ocorre durante o reparo ósseo convencional (Ogawa & Nishimura, 2003; 2006 e Kojima *et al.*, 2008).

Carinci *et al.* (2003) e Carinci *et al.* (2004) cultivaram células osteoblásticas MG-63 sobre discos de titânio com diferentes tratamentos de superfície, e analisaram a expressão de um amplo número de genes através do uso da tecnologia de microarray. Os resultados demonstraram que genes envolvidos em atividades funcionais como apoptose, transporte vesicular e estrutura funcional estavam super ou sub-regulados de acordo com o tipo de superfície dos implantes.

Ogawa *et al.* (2002) avaliaram o efeito da topografia de superfície de implantes na resistência biomecânica e padrão de expressão de genes de matriz extracelular óssea durante a osseointegração. Inseriram-se implantes cilíndricos com superfície maquinada ou tratada por duplo ataque ácido em fêmures de ratos (DE). Após duas e quatro semanas de cicatrização, realizou-se teste de tração dos implantes. Além disso, implantes em formato de “T” foram separadamente inseridos nos fêmures, o RNA foi extraído do tecido formado no interior do implante após duas e quatro semanas de cicatrização e RTPCR foi utilizado para medir a expressão gênica durante a osseointegração. Os valores do teste de tração foram 300% maiores para os implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido do que para os maquinados. A expressão de colágeno tipo II, osteocalcina e biglicano foram maiores para o implante DE do que para os maquinados após duas semanas de cicatrização. Após quatro semanas, as expressões dos colágenos tipo II e IX foi 7 e 26 vezes maiores, respectivamente, para o grupo de implante com duplo ataque ácido do que para o grupo de implantes maquinados. Os autores concluíram que a topografia de superfície do implante induziu alterações fenotípicas e genotípicas nas células ao redor do implante. Os maiores valores de tração para os implantes de superfície tratada por

duplo ataque ácido foram associados à modulação de um conjunto de genes relacionados à matriz óssea extracelular.

Ogawa & Nishimura (2003) avaliaram a influência da rugosidade de superfície na expressão gênica ao redor de implantes osseointegráveis. Os autores inseriram implantes em formato de “T” em fêmures de ratos, e após 3 dias, 1, 2 e 4 semanas de cicatrização, extraíram RNA do tecido contido no interior do implante e utilizaram RTPCR para avaliarem a expressão de alguns genes integrantes da matriz, como o colágeno tipo I, colágeno tipo III, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea II, integrinas beta 1 e beta 3. Após duas semanas, a área de contato entre osso e implante foi 2,5 a 6 vezes maior para a superfície que recebeu duplo ataque ácido do que para a superfície maquinada. A análise histomorfométrica revelou que o volume ósseo da superfície com ataque ácido foi maior que a superfície maquinada após duas semanas. A superfície com duplo ataque ácido promoveu a expressão gênica acelerada de genes da matriz extracelular, como osteonectina e osteocalcina, além da estimulação da expressão de sialoproteína óssea II, colágeno tipo III e integrinas após a primeira semana de cicatrização. Os autores concluíram que as diferenças histológicas na osseointegração de implantes estavam associadas ao tipo de tratamento de superfície dos materiais, e podiam ser explicadas em parte pela modulação da expressão de genes integrantes da matriz extracelular. Os resultados também revelaram que a modulação da expressão gênica *in vivo* ocorreu a níveis locais de acordo com os tipos de superfícies dos implantes.

Em 2003, Ogawa & Nishimura identificaram transcritos que eram expressos especificamente durante a osseointegração. Para isso, foram inseridos implantes com formato de “T” em fêmures de ratos os quais foram separados em três grupos de acordo com o tratamento: osteotomia sem inserção de implantes (OS), inserção de implante com superfície maquinada (MI) ou colocação de implante com superfície tratada por duplo ataque ácido (DE). Através da técnica de display diferencial de PCR, rastream-se 90 genes (com uso de primers e

sondas) que poderiam ter sua expressão alterada após duas semanas de cicatrização peri-implantar quando comparada ao reparo da osteotomia. Os resultados revelaram três genes com expressão alterada exclusivamente na cicatrização peri-implantar: TO1 – “unknown”, transcrito com função até então desconhecida; TO2 – apolipoproteína E (expressão aumentada em 30 vezes); e TO3 – prolil-hidroxilase subunidade- α (expressão aumentada em 50 vezes). Considerando os resultados do primeiro experimento, os autores sugeriram que TO1, TO2 e TO3 eram genes específicos da osseointegração. Para confirmar esta hipótese, foram realizados experimentos adicionais onde se avaliou a capacidade destes genes em responder à modulação por fatores locais, como a superfície do implante, e por fatores sistêmicos, como a deficiência de estrógeno. A expressão gênica do colágeno tipo I, osteopontina, osteocalcina, Runx2, Bmp2, assim como de TO1, TO2 e TO3 foram obtidas por RTPCR, e comparadas entre os grupos: osteotomia (OS), inserção de implante maquinado (MI) e colocação de implante com duplo ataque ácido de superfície. As análises foram conduzidas após 3, 7, 14 e 28 dias de cicatrização. Da mesma forma, a expressão de TO1, TO2 e TO3 foi verificada em ratas que receberam operação simulada (SHAM) ou ovariectomia (OVX), após 14 e 28 dias. Após duas semanas estes três genes tiveram sua expressão aumentada na cicatrização peri-implantar em implantes maquinados (15 vezes) e expressão acelerada pela superfície rugosa tratada através de duplo ataque ácido (40-60 vezes). Ainda, os genes codificadores de colágeno tipo I e osteocalcina apresentaram aumento de expressão de apenas 1,5 a 2 vezes e os codificadores de Runx2 e Bmp2 não foram alterados durante a cicatrização peri-implantar quando comparado ao reparo ósseo normal. E quando da deficiência de estrógeno em ratas, TO1, TO2 e TO3 tiveram sua expressão reduzida.

Kojima *et al.* (2008) afirmaram que a análise de um número restrito de genes que podem ser induzidos pelo titânio não era suficiente para explicar os mecanismos moleculares envolvidos na osseointegração. Sendo assim, os autores mediram a expressão de mais de 20.000 transcritos utilizando a tecnologia

de microarray e compararam os padrões de expressão do reparo ósseo normal com a cicatrização peri-implantar *in vivo* após uma, duas e quatro semanas de cicatrização. Os resultados revelaram que 31 genes estavam super-expressos após duas ou quatro semanas de osseointegração dos implantes; e apenas 12 genes apresentaram super-expressão em tempo inferior a duas semanas. Apenas a proteína de ligação de hialurano e proteoglicano foi induzida pelo titânio desde a primeira até a quarta semana de cicatrização. Os autores sugeriram que a fase que englobava duas semanas de osseointegração representava o período de conversão de osso imaturo em osso lamelar maduro, já que a expressão da maioria dos genes estava aumentada. Ainda sugeriram que o fato de mais de 50 genes se mostrarem super-expressos apenas na segunda semana de osseointegração demonstrava que este estágio era provavelmente crítico para se detectar as diferenças entre os processos de reparo ósseo normal e cicatrização peri-implantar. Até a quarta semana, os autores observaram a indução principalmente de genes de matriz extracelular óssea, como osteocalcina, fibrina, fibromodulina, colágenos e fibronectina. Descreveram também a expressão de alguns genes associados à osteoclastogênese e reabsorção óssea, como a catepsina e metaloproteinases (MMPs). A indução de genes relacionados aos proteoglicanos (como biglicano, glicoproteína transmembrana *nbm* e lumicano) demonstrou o papel importante destas moléculas durante o estabelecimento da osseointegração.

2.5. Falha na osseointegração e a perda precoce de implantes

Buser *et al.* (1991) classificaram as perdas de implantes dentários em perdas precoces ou tardias. Atribuíram a classificação de perda precoce às perdas dos implantes que acontecessem antes da conexão da prótese, e perda tardia, às perdas que ocorrem após a instalação protética.

Esposito *et al.* (1998a, 1998b) e Quirynen *et al.* (2002) definiram o termo “falha na osseointegração” como a perda precoce de um implante resultante

da ausência de um íntimo contato entre osso e implante. Uma das possíveis causas relatadas na literatura para a perda precoce de implantes foi a inadequada ocorrência do processo de cicatrização óssea.

Diversos autores descreveram que o processo de osseointegração podia sofrer influências de diferentes fatores locais e sistêmicos que resultariam na perda do implante. A associação da perda precoce de implantes à fatores como o fumo (Bain & Moy, 1993; Bain, 2003), hipo e hiperparatireoidismo (Hwang & Wang, 2007), Doença de Chron, diabetes e alcoolismo (Scully *et al.*, 2007) foi citada na literatura. As reações que ocorrem na interface entre osso e implante podem ser influenciadas pela técnica cirúrgica, biocompatibilidade do material, estrutura e o tipo de tratamento de superfície do implante, e condições locais do leito receptor e condições sistêmicas do paciente (Albrektsson *et al.*, 1981; Branemark *et al.*, 1983)

Tonetti & Schmid (2000) realizaram uma ampla revisão sobre a patogênese das falhas de implantes e descreveram que as falhas precoces podiam ocorrer semanas a poucos meses após a implantação, tendo como possíveis causas: o dano tecidual devido à técnica cirúrgica inadequada, a contaminação bacteriana, a sobrecarga prematura, e as alterações de condições sistêmicas.

Lekholm (2004) relatou alguns fatores que podem contribuir para a perda precoce de implantes, dentre eles citou a idade crítica, diabetes descompensada, raquitismo dependente de Vitamina D, osteoporose, Síndrome de Sjögren e o fumo como fatores mais importantes.

Moy *et al.* (2005) realizaram um estudo retrospectivo em que avaliaram alguns fatores que poderiam estar envolvidos com a falha na osseointegração de implantes inseridos no período entre 1982 e 2003. Os autores encontraram que a porcentagem de falhas de implantes foi de 8,16% na maxila e 4,93% na

mandíbula. Observaram que a idade avançada estava fortemente associada ao risco de falha no implante, onde pacientes entre 60 e 79 anos apresentaram maiores riscos de falhas quando comparado a pacientes com menos de 40 anos. Consideraram que gênero, doença da artéria coronária, doença pulmonar, terapia com esteróides, quimioterapia, não fazer uso de terapia para reposição hormonal para mulheres em idade pós-menopausa não estavam associados com o aumento das falhas de implante. No entanto, o fumo, a radiação de cabeça e pescoço e a terapia pós-menopausa com estrógenos estavam significativamente relacionados ao aumento da perda de implantes. Concluíram que as porcentagens de falhas na osseointegração de implantes eram baixas, e não existiam contra-indicações para a colocação de implantes. Segundo os autores, as condições que estiveram correlacionadas ao risco à falha de implantes deveriam ser consideradas durante o planejamento do tratamento, bem como relatadas em um consentimento informativo ao paciente.

Ainda, alguns estudos relataram que fatores genéticos relacionados a polimorfismos localizados em genes codificadores de metaloproteinases (MMP-9, MMP-1) e interleucina I β (IL-1 β) estavam associados à perda precoce de implantes dentários (Campos *et al.*, 2005; Alvim-Pereira *et al.*, 2008a). Alvim-Pereira *et al.* (2008b) investigaram se fatores clínicos e a existência de polimorfismo do receptor da vitamina D (rs731236, TaqI) estavam relacionados ao processo de falha de implantes dentais osseointegráveis. Os autores dividiram 217 pacientes com média de idade de 51,7 \pm 11,3 anos, em grupo controle (137 indivíduos com pelo menos um implante osseointegrado em função por pelo menos seis meses e nenhuma perda implantar) e grupo estudo (80 indivíduos com perda de pelo menos um implante). Embora os autores não tenham encontrado associação entre genótipos/alelos do polimorfismo TaqI do VDR e a perda de implantes, o edentulismo, a profundidade de sondagem periodontal, a posição do implante, a estabilidade primária, o comprimento do implante, a técnica cirúrgica e a quantidade óssea estiveram associados à perda de implantes.

2.6. Deficiência de vitamina D, osteoporose e falha na osseointegração

A maioria dos estudos avaliou a associação entre osteoporose e falha na osseointegração. No entanto, a maior parte das investigações recentes demonstrou que a osteoporose, principalmente relacionada à deficiência de hormônio feminino, não estava diretamente relacionada à perda de implantes, mas apenas a um atraso no processo de osseointegração.

Shibli *et al.* (2008) reportaram um caso de perda protética de um implante em uma paciente com osteoporose tipo 1. Os autores avaliaram a área de contato entre osso e implante, e observaram histologicamente que o implante apresentou-se osseointegrado e envolvido por tecido ósseo sadio. No entanto, a área de contato entre osso e implante foi em média 40,07% (+/- 1,07%). Não se encontrou evidência de reação de corpo estranho ao redor do implante, embora tenha sido observado um crescimento de tecido conjuntivo nesta interface. Os resultados deste relato de caso demonstraram que histologia do tecido peri-implantar não estava alterada quando o paciente possuía diagnóstico de osteoporose.

Smith *et al.* (1992) realizaram um estudo retrospectivo de 104 pacientes, de idades variadas, e 313 implantes sobre as condições sistêmicas que poderiam levar a complicação e perda de implantes. A maioria dos pacientes (65) eram mulheres em pós-menopausa, sete das quais realizavam reposição hormonal com estrógeno. Neste estudo, a osteoporose não esteve associada com o aumento das complicações e perdas de implantes.

Dao *et al.* (1993) analisaram 93 mulheres e 36 homens de diversas idades no período entre dois e sete anos da instalação de implantes. Os autores concluíram que a incidência de perda de implante foi maior em mulheres acima de 50 anos. No entanto, a taxa de sucesso do tratamento com implantes não foi diferente para mulheres em pós-menopausa.

Friberg (1994) acompanhou durante cinco anos o sucesso de cinco implantes na maxila e seis implantes na mandíbula em uma paciente de 64 anos com osteoporose secundária, reabilitada com próteses implanto-suportadas. Não foi encontrada perda de implantes, e o autor concluiu que a osteoporose não representou uma contra-indicação para a colocação de implantes.

Fujimoto *et al.* (1996) analisou após um ano, o sucesso de cinco implantes inseridos na mandíbula de uma paciente de 72 anos que possuía osteoporose por 11 anos. Não foram encontradas complicações ou perda de implantes.

Minsk & Polson (1998) em análise retrospectiva, avaliaram 450 implantes inseridos em 116 mulheres em pós-menopausa que realizavam (n=25) ou não (n=91) terapia hormonal com estrógenos. Após um ano de inserção, a terapia com implantes naquelas mulheres que realizavam tratamento de reposição hormonal não mostrou resultados favoráveis.

Eder & Watzek (1999) avaliaram seis implantes após 5 anos de inserção na região anterior da mandíbula de uma paciente de 80 anos com osteoporose severa e poli-artrite. Todos os implantes permaneceram osseointegrados, embora tenha sido observada perda óssea média de 2,87 mm ao redor dos implantes não associada à colonização bacteriana.

Becker *et al.* (2000) estudaram 98 pacientes e 364 implantes inseridos na mandíbula e maxila, e compararam a densidade mineral dos ossos rádio e ulna (proximal e distal) entre o grupo que apresentava perda de implantes e o grupo controle sem perda de implantes após três anos e 1 mês ou três anos e 9 meses, respectivamente. Utilizaram o exame de absorvometria de dupla energia de raios-X para as medições de densidade óssea. Não foi encontrada diferença da densidade óssea do rádio e da ulna entre os dois grupos.

Friberg *et al.* (2001) avaliaram após 6-11 anos o sucesso do tratamento com implantes em 14 pacientes com osteoporose, duas pacientes com osteopenia, totalizando 70 implantes de maxila e mandíbula. Os índices de sucesso foram de 97% para maxila e mandíbula, apesar da presença de ambas as doenças.

August *et al.* (2001) analisaram o sucesso do tratamento com implantes após 1-5 anos em 275 pacientes que receberam 761 implantes na maxila, sendo que 252 pacientes receberam 652 implantes. As pacientes estavam em pós-menopausa e realizavam ou não terapia de reposição hormonal. Concluiu-se que mulheres em pós-menopausa que não realizavam tratamento de reposição hormonal apresentavam maior taxa de sucesso dos implantes maxilares.

Ozawa *et al.* (2002) avaliaram a influência da deficiência de hormônio gonadal feminino no estabelecimento da osseointegração de implantes. Os autores inseriram mini-implantes cilíndricos a 7 e 11mm da margem distal do fêmur de ratas que passaram por simulação de cirurgia (SHAM) ou ovariectomia (OVX). Após duas e quatro semanas da cirurgia, os fêmures dos animais foram extraídos e os implantes foram submetidos ao teste de tração. Verificou-se que os valores do teste de tração estavam diminuídos no grupo OVX após duas semanas de cicatrização, quando comparado ao grupo SHAM. Após quatro semanas de cicatrização, não houve diferença nos valores do teste de tração entre os dois grupos. Ainda, os valores do teste de tração mostraram aumento após quatro semanas de inserção dos implantes quando comparados a duas semanas de cicatrização. Em um experimento complementar, foram inseridos implantes com formato de "T" a 7mm da margem distal do fêmur de ratas SHAM ou OVX. Após duas e quatro semanas, o implante e o tecido ósseo formado em seu interior foram submetidos à análise histológica e histomorfométrica. Verificou-se que houve a formação de tecido ósseo imaturo após duas semanas e formação de osso trabecular após quatro semanas. A análise histomorfométrica demonstrou que a área óssea foi 35% menor nas ratas OVX após duas semanas de

implantação; mas ao final de quatro semanas, a área óssea foi similar entre os dois grupos. Ainda, os autores compararam a expressão gênica do tecido ósseo do fêmur de ratas SHAM e OVX, que não haviam recebido tratamento algum (sem defeito ósseo), que receberam osteotomia apenas, ou que receberam a inserção de implantes de formato “T”. Os seguintes genes foram avaliados por RTPCR: colágeno tipos I e III, sialoproteína óssea II (BSP2), osteonectina, osteopontina, osteocalcina, integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$. Após duas semanas, houve aumento na expressão de todos os genes avaliados quando da osteotomia, sem a inserção de implantes, comparado à expressão em osso não tratado. Não houve diferença entre os grupos SHAM e OVX quando do reparo da osteotomia sem implante. No entanto, para a condição SHAM, a expressão destes genes no grupo que recebeu implantes aumentou 3 a 7 vezes mais que a expressão obtida do grupo não tratado (sem defeito ósseo), e 2 a 4 vezes mais que a expressão obtida do grupo que recebeu apenas a osteotomia. No entanto, a expressão destes genes, exceto osteocalcina e integrinas, não foi alterada após quatro semanas, independente da condição SHAM ou OVX. Portanto, a ovariectomia não influenciou a expressão dos genes avaliados em tecido ósseo que não recebeu tratamento ou que recebeu apenas osteotomia. Quando foram inseridos implantes, houve um aumento da expressão dos genes de matriz extracelular para o grupo SHAM, mas apenas a expressão da osteocalcina e integrinas foi aumentada para o grupo OVX. Concluíram que a inserção de implante aumentou a expressão gênica mais do que a osteotomia apenas, e que a deficiência de hormônio promoveu atraso na osseointegração; mas, relataram que não houve diferença entre os grupos que receberam SHAM e ovariectomia ao final de quatro semanas. A deficiência de hormônio teve um efeito bifásico, onde interferiu com o processo inicial da osseointegração (duas semanas), mas, uma vez estabelecida a osseointegração (fase avançada) não houve influência da OVX.

Van Steenberghe *et al.* (2002) estudaram os fatores locais e sistêmicos associados à perda de implantes em 339 pacientes e 1263 implantes inseridos na

mandíbula e maxilla. Embora os resultados tenham demonstrado uma taxa de 97,8% de sucesso no tratamento com implantes, a osteoporose foi relacionada às perdas precoce dos implantes.

Degidi & Piattelli (2003) acompanharam o sucesso de 4 implantes inseridos sob carga imediata na mandíbula de uma paciente com osteoporose que realizava tratamento com bifosfonatos. Todos os implantes mostraram-se estáveis após um ano.

Moy *et al.* (2005) realizaram um estudo retrospectivo com 1140 pacientes e 4680 implantes após um e vinte anos da inserção dos implantes. Os autores avaliaram os fatores locais e sistêmicos que poderiam estar associados à perda de implantes. Concluíram que as mulheres em pós-menopausa que faziam reposição hormonal tinham probabilidade 2,55 vezes maior de perda do implante. Em mulheres em pós-menopausa sem reposição hormonal esta incidência não foi significativa.

Hwang & Wang (2007) descreveram que os maiores efeitos da osteoporose nos ossos são a reduzida força mecânica, as alterações na arquitetura trabecular, a diminuição do conteúdo mineral ósseo, o aumento da razão entre carbonato e fosfato e a reduzida formação de osteóide. Os autores relataram que o índice de sucesso de implantes na mandíbula para pacientes com osteoporose foi de 92%, e que a falha estava relacionada à colocação dos abutments. A reposição com estrógeno não influenciou as taxas de perda de implantes em pacientes com osteoporose. Concluíram que a osteoporose representa uma contra-indicação relativa à colocação de implantes.

Na revisão de literatura realizada por Erdogan *et al.* (2007), foram avaliados 399 pacientes e 1263 implantes, e encontraram 97,8% de sucesso do tratamento com implante. Concluíram que a osteoporose não representava uma contra-indicação para a colocação de implantes, já que, embora tenham

encontrado baixa qualidade óssea, a taxa de sucesso dos implantes permaneceu alta.

Shibli *et al.* (2008) realizaram uma comparação histológica entre implantes retirados de 21 pacientes que possuíam (sete implantes de sete pacientes) ou não osteoporose (15 implantes de 14 pacientes). Os resultados revelaram que a porcentagem de contato entre osso e implante foi relativamente a mesma entre pacientes que apresentavam ou não osteoporose. A avaliação foi realizada depois de a osseointegração ter sido estabelecida (quatro anos). Concluiu-se que uma vez que o contato entre osso e implante esteja estabelecido, não ocorrem reabsorções ósseas.

A deficiência severa de vitamina D foi associada ao desenvolvimento de raquitismo e osteomalácia; enquanto a deficiência menos severa de vitamina D foi associada à osteoporose, aumento de risco à fratura e densidade óssea mineral reduzida. Além disso, deve-se considerar que a vitamina D pode regular a expressão de muitos genes que participam de ações fisiológicas diversificadas. Sendo assim, a influência da vitamina D no processo de osseointegração pode estar relacionada não apenas à sua participação direta no metabolismo, mas também na expressão genes que participam de outras funções fisiológicas e que, tendo sua expressão alterada, pode prejudicar o sucesso da osseointegração. No entanto, a literatura reportou poucas evidências sobre a influência dos baixos níveis de vitamina D no processo de osseointegração (Lekholm, 2003; Kelly *et al.*, 2009).

Lekholm (2003) reportou um caso clínico de paciente portador de raquitismo hipofosfatêmico dominante ligado ao cromossomo X, onde oito entre dez implantes falharam. Esta doença é considerada a causa mais comum de raquitismo hereditário causada por uma mutação no gene PHEX (gene regulador do fósforo (P) com homologia (H) para as endopeptidases (E) localizado no cromossomo X), e leva à insuficiente mineralização ou ao retardo da

mineralização da matriz osteóide formada durante o desenvolvimento ósseo durante o processo de ossificação endocondral. Estas características alteradas da matriz osteóide presentes nesta forma de raquitismo hereditário também estão presentes em pacientes que apresentam deficiência de vitamina D (Saggese & Baroncelli, 2000).

Kelly *et al.* (2009) avaliaram a osseointegração de implantes após duas semanas de inserção de implantes cilíndricos, com superfície tratada com duplo ataque ácido ou com cobertura de nanopartículas de hidroxiapatita, em fêmures de ratos suficientes e deficientes de vitamina D. Foi realizada a análise da biomecânica e da área de contato entre osso e implante através de teste de tração e histomorfometria, respectivamente. A superfície recoberta por nanopartículas de hidroxiapatita demonstrou superior resistência à tração apenas para o grupo suficiente de vitamina D. No entanto, os resultados demonstraram que os valores do teste de tração assim como a área de contato estavam reduzidos no grupo deficiente de vitamina D, independente da superfície de implante utilizada.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo propôs-se a investigar a influência da deficiência de vitamina D nos padrões de expressão gênica durante a osseointegração. A proposição geral deste estudo abordou os seguintes objetivos específicos:

(a) investigar a influência da deficiência de vitamina D nos padrões de expressão gênica durante a osseointegração *in vivo*; onde se investigou a seguinte hipótese: a deficiência de vitamina D afeta a expressão gênica durante a osseointegração;

(b) avaliar o efeito da vitamina D e do titânio na expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo *in vitro*; onde a seguinte hipótese foi formulada: a vitamina D e o titânio podem modular a expressão de genes relacionados à matriz extracelular óssea e cartilaginosa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

Para o primeiro experimento, utilizou-se a tecnologia de microarray para rastrear as expressões de aproximadamente 41.000 transcritos (variáveis dependentes) contidos na plataforma do microarray, em busca de genes que apresentassem expressão alterada quando da inserção de implantes (1ª variável independente) e sob deficiência de vitamina D (2ª variável independente). Dezesesseis ratos foram randomicamente divididos em quatro grupos: OSTV+ (suficientes de vitamina D que receberam apenas osteotomia sem inserção de implante), OSTV- (deficientes de vitamina D que receberam apenas osteotomia sem inserção de implante), NTV+ (suficientes de vitamina D que receberam inserção de implante) e NTV- (deficientes de vitamina D que receberam inserção de implante). A decisão por realizar quatro réplicas biológicas por grupo para o experimento de microarray foi baseada no estudo de Wei *et al.* (2004). O uso de quatro réplicas biológicas reduzia a taxa de erro (0,01% de chances de obter um resultado falso positivo) e gerava poder estatístico (90%) suficiente para detectar as diferenças de expressão gênica que possuísem significado biológico (no mínimo 25% dos genes alterados em 1,5 X) (Wei *et al.*, 2004). Para o segundo experimento, células multipotentes de medula óssea foram cultivadas sobre placas plásticas ou discos do titânio, com ou sem suplementação do meio com vitamina D, para se verificar o efeito da vitamina D (1ª variável independente) e do titânio (2ª variável independente) na modulação das expressões de genes relacionados ao metabolismo ósseo *in vitro* (variáveis dependentes). As expressões gênicas após 1, 3, 7 e 14 dias de cultura foram medidas por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) e comparadas pelo teste de ANOVA bifatorial.

4.2. Modelo animal de deficiência de vitamina D

Dezesseis ratos machos, da espécie Sprague-Dawley, com nove semanas de idade (Harlan Teklad, Madison, WI, US) foram mantidos em gaiolas individuais, com ração e água *ad libitum* e iluminação controlada por ciclos com 12 horas claro e 12 horas escuro (período de luz das 6:00 às 18:00 horas), com luz fluorescente sem UVB, e com temperatura e umidade controladas. Após um período de adaptação de 7 dias, os animais foram randomicamente divididos em dois grupos que foram alimentados com dieta padrão (#7013, Harlan Teklad Products) ou dieta deficiente de vitamina D (0,47% Ca, 0,3% P) (#TD.89123, Harlan Teklad Products) durante 30 dias precedentes e 15 dias posteriores aos procedimentos cirúrgicos. Assim, os animais estavam com 14 semanas de idade quando receberam os procedimentos cirúrgicos. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Pesquisa em Animais da Universidade da Califórnia em Los Angeles, Los Angeles, CA, EUA (Anexo 1).

4.3. Procedimentos para osteotomia e inserção dos implantes

Implantes com formato de “T”, com dimensões medindo 4,0 x 3,0 x 1,0 mm, foram fabricados com liga de titânio Ti4V6Al e possuíam uma câmara interna oca com dimensões correspondentes a 3,0 X 2,5 X 0,8 mm (Figura 1A). A superfície de implante foi tratada através de duplo ataque ácido e receberam discreta deposição de nanopartículas de hidroxiapatita (Nishimura *et al.*, 2007). Os implantes foram esterelizados por gás e embalados individualmente pelo fabricante (Nanotite, Biomet3i, Palm Beach Gardens, Flórida, EUA).

Para a inserção dos implantes, os ratos foram anestesiados por inalação com isofluoreno a 2-2,5%. Os pêlos do local da incisão cutânea foram aparados, a pele foi descontaminada com solução de iodo-povidona a 10% e etanol 70%, e o lado distal do fêmur foi cuidadosamente exposto respeitando os princípios cirúrgicos de assepsia e esterelidade. O sítio implantar foi preparado

através da perfuração com broca cilíndrica de 1 mm de diâmetro (#157, Brasseler USA Dental Instrumentation, Savannah, Georgia, EUA), e se localizou a 7 mm de distância da margem distal da superfície plana do fêmur quando exposto em norma frontal (Ogawa & Nishimura, 2003, 2006; Kojima *et al.*, 2008) (Figura 1B). Para reduzir o calor local e prevenir a deposição de debris ósseos nos tecidos moles, a osteotomia foi conduzida sob irrigação constante com solução salina a 0,9% estéril. O implante foi colocado dentro do sítio preparado até que sua superfície superior estivesse visualmente justaposta à superfície exterior do fêmur, e a estabilidade foi confirmada pela existência de embricamento mecânico passivo. Os músculos e pele foram suturados separadamente, com fios de sutura absorvíveis (Ethicon Vicryl 4-0, Novartis Animal Health U.S. Inc., Basel, Suécia) ou fios de nylon (Ethilon Vicryl 3-0, Novartis Animal Health U.S. Inc.), respectivamente. Os animais foram tratados com 0,012 mg de hidrocloreto de buprenorfina (Buprenex injetável, Reckitt Benckiser Healthcare Ltd, Hull, Inglaterra), e a água foi suplementada com 400 mg de Sulfametoxalol e 80 mg Trimetoprim (HI-TECH Pharmacal Co. Inc., Amityville, Nova Iorque, EUA) / 500 ml de água por sete dias após a cirurgia. Criou-se uma osteotomia do mesmo tamanho e profundidade das dimensões do implante no local correspondente do fêmur do rato, mas sem a inserção posterior do implante, para os grupos OSTV+ e OSTV-. Duas semanas após a cirurgia, os ratos foram sacrificados por inalação letal de CO₂ associada ao deslocamento cervical, e o tecido formado no interior do implante foi coletado.

4.4. Confirmação do posicionamento e cicatrização dos Implantes (micro-tomografia computadorizada e análise histológica)

Quatro amostras adicionais foram geradas para o grupo NTV+, conforme os procedimentos descritos anteriormente, a fim de confirmar o posicionamento dos implantes com relação à cartilagem da zona de crescimento e verificar a fase inicial da osseointegração dos implantes em duas semanas de cicatrização. Os fêmures contendo os implantes foram coletados duas semanas

de cicatrização e fixados com solução de formalina 10% durante 15 dias a 4°C. O Sistema de Imagens de Micro-Tomografia Computadorizada (μ CT 40, Scanco Medical, Basserdorf, Suécia) foi utilizado para a obtenção de imagens de três dimensões dos conjuntos fêmur-implante (70kV, 114 mA, e 20 μ m de resolução) (Figura 1C). Posteriormente à aquisição das imagens tomográficas, as amostras foram processadas sem descalcificação e imersas em resina epóxi curada por luz (Technovit 7200 VLC, Hereaus Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Secções longitudinais (5 μ m de espessura), paralelas à abertura da câmara interna do implante foram obtidas utilizando um micrótomo motorizado (Exakt Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), coloridas com tricromo de Goldner e observadas em microscopia de luz sob lente de 4X de aumento. A figura 1D mostra secção histológica do interior do implante.

4.5. Medições sorológicas

Aproximadamente 5-6 ml de sangue foram extraídos diretamente do coração dos animais imediatamente após seu sacrifício. Amostras de soro foram preparadas e submetidas a um mesmo laboratório (Anilytics Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA) para a obtenção das medições de 25-hidroxicolescalciferol (25(OH)D), hormônio paratireoideano, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo, magnésio, fator de crescimento da insulina-1, colesterol, glicose e triglicerídeos. As comparações dos valores obtidos entre os grupos foram conduzidas através do teste de ANOVA para dois fatores, considerando $p \leq 0,05$.

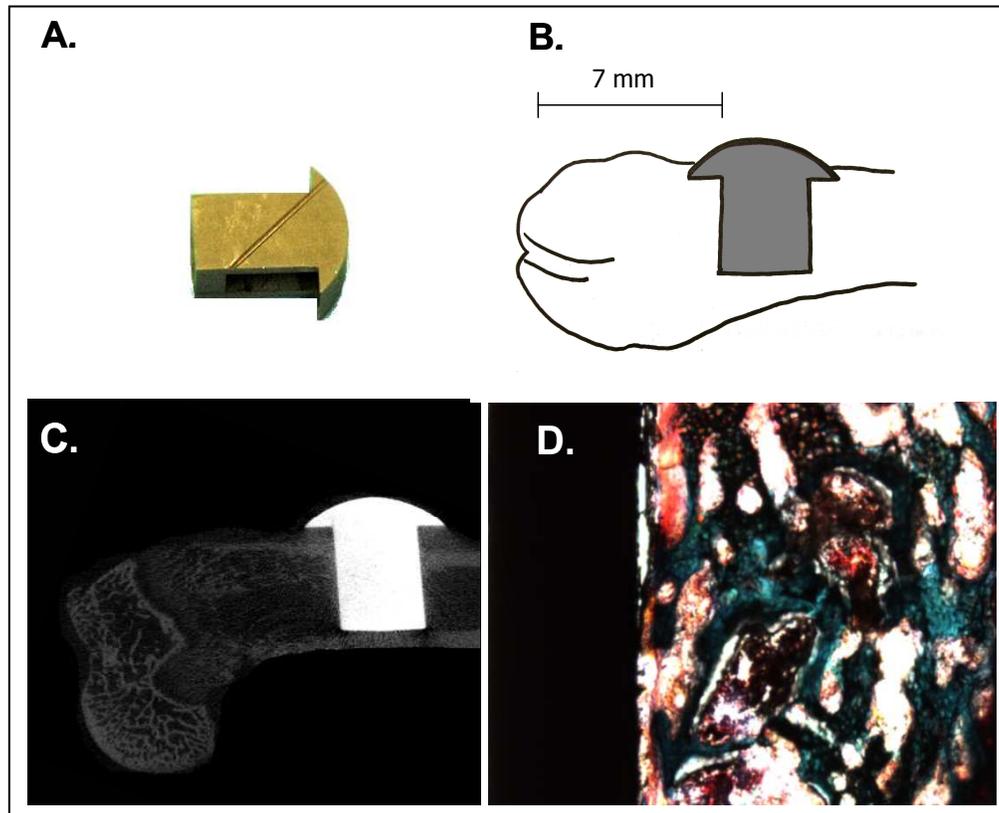


Figura 1: Implante experimental. [A] Implante em formato de “T” com superfície superior com formato de “guarda-chuva” e câmara interna oca. [B] Desenho esquemático do sítio implantar em norma frontal, localizado a 7 mm de distância da margem distal do fêmur do rato. [C] Imagem obtida através de micro-tomografia computadorizada, confirmando distância suficiente da cartilagem de crescimento. A cartilagem de crescimento mostra-se como uma linha mais radiolúcida que o tecido ósseo. [D] Secção histológica transversal do interior do implante a 4X de aumento, corada com tricromo de Goldner. A superfície de titânio pode ser observada em preto (à esquerda) enquanto tecido osteóide corou-se em tons vermelhos e o tecido ósseo em tons de verde. A imagem histológica confirmou o início da formação óssea no interior do implante após duas semanas de cicatrização.

4.6. Preparo das amostras de RNA

Cada fêmur foi removido sob condições assépticas e o tecido formado no sítio de osteotomia ou contido no interior da câmara do implante foram coletados por meios assépticos utilizando instrumentos previamente tratados com RNase-Away (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EUA). Os tecidos foram imediatamente imersos em solução de RNALater (Ambion Inc., Austin, Texas, EUA) para preservação do RNA. O RNA total foi isolado separadamente em cada amostra com o kit commercial miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (total de dezesseis amostras). A concentração de RNA de cada amostra foi medida através de absorbância espectrofotométrica de luz a um comprimento de 260 nm (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA). A integridade do RNA foi checada pelo Bioanalyzer 2000 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Califórnia, EUA). Apenas amostras que tivessem bandas precisas do RNA ribossomal 18s e 28s assim como altos valores de integridade foram utilizados para os experimentos subseqüentes.

4.7. Marcação, hibridização e validação interna do microarray

O microarray com canais de duas cores (Agilent Rat Whole Genome, Agilent Technologies, Inc.) foi utilizado para rastrear os padrões de expressão de aproximadamente 41.000 transcritos contidos na plataforma dos microarrays. Foi preparado um pool de referência, em que foram agrupados 250 ng de RNA das amostras pertencentes ao grupo OSTV+ (no total de 1 µg) e este “pool” foi marcado com o corante fluorescente vermelho (Cy5). Todas as outras amostras foram marcadas individualmente pelo corante fluorescente verde (Cy3) (no total de 1 µg de RNA) e posteriormente hibridizadas individualmente com o pool de referência. As reações foram preparadas segundo as instruções do fabricante. A fim de realizar a validação interna do microarray e confirmar a confiabilidade da hibridização com diferentes corantes, uma das amostras foi aleatoriamente

selecionada para ser hibridizada com a inversão dos corantes (teste de Dye Swap). Os resultados da hibridização com a inversão dos corantes foram comparados com a primeira hibridização da amostra através do teste de correlação de Pearson. Ainda, para confirmar a precisão da hibridização, o pool de referência foi marcado separadamente com os corantes Cy3 e Cy5 e hibridizado consigo mesmo.

4.8. Preparação dos dados

Os resultados de expressão foram obtidos através da interpretação dos sinais do microarray com a utilização do software Agilent Feature Extraction (versão 7.5.1). Foi usado o software GeneSifter (www.genesifter.net) para o pré-processamento e análise das informações obtidas nos microarrays. Os resultados foram expressos como a razão Cy3/Cy5 ao invés das intensidades Cy3 e Cy5 isoladas por duas razões: (a) pela escolha do uso de microarray de dois canais e (b) pelas amostras terem sido hibridizadas com um pool de referência. Embora os resultados do microarray da plataforma Agilent não sejam afetados pelos efeitos do tipo de canal e tipo de normalização (Stafford & Brun, 2007), decidiu-se pela aplicação da normalização pelo método de LOWESS (Zahurak *et al.*, 2007) para aumentar a confiabilidade entre as amostras, melhorando a precisão e sensibilidade da avaliação. Os métodos de normalização são usados para calcular uma curva de normalização que mede o potencial de erro entre as razões logarítmicas de todas as intensidades obtidas. Uma das curvas mais conhecidas é chamada LOWESS — uma curva de regressão linear com pesos diante de dados de quaisquer intensidades. Esta curva determina o potencial de erro dos corantes que pode estar presente na razão logarítmica durante a obtenção dos valores de intensidade da expressão gênica. Como este método assume que os erros dos corantes são dependentes da intensidade dos mesmos, os valores são corrigidos através da multiplicação das intensidades dos canais verde e vermelho; este ajuste removerá os possíveis erros da razão logarítmica.

Após a preparação, os dados obtidos foram analisados estatisticamente e transformados em escala logarítmica, de forma que se comparou a proporção das alterações. Considerou-se um limiar de decisão de 1,5 para considerar a expressão de um transcrito como alterada entre os grupos.

4.9. Análise estatística

Como o delineamento deste estudo abordou duas variáveis independentes (inserção de implante e condição de vitamina D), utilizou-se a análise de variâncias (ANOVA) para dois fatores na comparação dos dados entre os quatro grupos, que permitiu a avaliação do efeito das variáveis independentes separadamente ou a interação entre as mesmas nas variáveis dependentes (aproximadamente 41.000 expressões gênicas). O primeiro efeito analisado pelo teste ANOVA bifatorial foi relacionado à inserção do implante (H), com dois níveis: osteotomia sem implante (OSTV+, OSTV-) ou osteotomia com implante (NTV+, NTV-). O segundo fator foi relacionado à condição de vitamina D (VD), com dois níveis: suficiência (OSTV+, NTV+) ou deficiência de vitamina D (OSTV-, NTV-). A ANOVA bifatorial também permitiu analisar um terceiro fator, relacionado à interação do primeiro com o segundo fator (I) (inserção de implante e deficiência de vitamina D). Os valores de p foram ajustados para Taxa de Falsas Descobertas (FDR) através da correção de Benjamini e Hochberg (Hochberg & Benjamini, 1990) para $p \leq 0,05$. Para a comparação da expressão gênica entre os grupos nos experimentos de microarray são realizados múltiplos testes estatísticos (um teste para cada gene; totalizando no presente estudo, comparação de mais de 41.000 genes abordados pela plataforma do Agilent Rat Whole Genome. Por ser uma análise rigorosa, a aplicação da correção de Benjamini e Hochberg reduz a possibilidade de falsas descobertas, aumentando a confiabilidade dos resultados estatísticos quando se realiza múltiplas comparações e aumentando apontando para novas descobertas (genes com intensa alteração de sua expressão quando influenciados pelos efeitos avaliados).

4.10. Análise funcional dos genes com expressão alterada

Para se estabelecer as prováveis relações, interações e funções entre os genes, os transcritos cuja expressão mostrou-se alterada mais de 1,5 vezes (1,5X) nas condições estudadas, foram agrupados em clusters. Um cluster representa um conjunto de genes que possuem um padrão de expressão similar, e que podem ser co-regulados (Eisen *et al.*, 1998). Dois tipos de análises independentes foram realizadas: clusterização hierárquica e de PAM (partitioning around medoids – particionamento sobre medóides). A clusterização hierárquica baseou-se na Distância Euclideana. A aplicação do algoritmo de Bootstrap suportou a reamostragem de 1000 conjuntos de resultados para gerar um consenso de clusters. A análise da clusterização hierárquica e de PAM foram realizadas com a utilização do software MeV v4.3.01 (MultiExperiment Viewer, TM4 Microarray Software Suite) (<http://www.tm4.org/mev.html>).

Os transcritos expressos distintamente também foram comparados ao banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) e da Ontologia Gênica (GO) (www.geneontology.org) para atribuir funções e verificar a participação dos genes em vias biológicas e reações, e descrever o envolvimento do produto destes genes em funções moleculares, processos biológicos e celulares. As vias metabólicas que apresentaram um z-score maior ou igual a 2,0 foram selecionadas como significantes para análise.

4.11. Validação externa do microarray por RTPCR

A reação de polimerase em cadeia em tempo real (RTPCR) foi realizada para se obter a expressão de genes selecionados e validar a análise do microarray. Primeiramente, 1 µg de cada amostra de RNA (total de 16 amostras + 1 pool de referência) foi convertido a cDNA utilizando o kit Advantage[®] RT-for-PCR (Clontech, Takara Bio Company, Mountain View, Califórnia, EUA). Então,

utilizou-se o ensaio de Expressão Gênica da TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e o Sistema de Detecção de Sequências ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). O RTPCR foi realizado em duplicatas. A tabela 1 mostra os transcritos e primers / sondas utilizadas para o RTPCR. O gene codificador de gliceraldeído 3-desidrogenase (GAPDH) foi selecionado como controle positivo (ref. NM_017008.3, cat#4352338E, Applied Biosystems). O primer / probe para o gene codificador do colágeno tipo X, alfa 1 foi customizado (ref. XM_001053056.1, CTGTCAAGCTCATCCTAATC). O teste de ANOVA bifatorial foi usado para as comparações entre os grupos, considerando $p \leq 0,05$.

Tabela 1: Primers / sondas utilizadas para o RTPCR (experimento *in vivo*), adquiridos da ABI (Applied Biosystems).

Identificação do primer / sonda	Símbolo do gene	Nome do gene
Rn00670286_m1	Col1a2	Colágeno tipo I, alfa 2
Rn01637087_m1	Col2a1	Colágeno tipo II, alfa 1
Rn01438224_m1	NPAS2	Domínio 2 neuronal Per-Arnt-Sim
Rn01455285_g1	Bglap	Osteocalcina
Rn01470624_m1	Sparc	Osteonectina
Rn00681031_m1	SPP1	Osteopontina
Rn01427704_m1	Per2	Homólogo do Período 2 (<i>Drosophila</i>)

4.12. Experimento *in vitro*: cultura de células sobre discos de titânio com e sem suplementação do meio com vitamina D

A fim de avaliar a influência do titânio e da vitamina D na expressão de alguns genes relacionados à matriz extracelular óssea e cartilaginosa, células estromais derivadas da medula óssea (D1 ORL UVA [D1], número ATCC®: CRL-12424™) em passagens iniciais (P18) foram semeadas a uma densidade de

16.000 células/poço em placas plásticas de cultura de 48-poços (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) ou sobre discos de titânio estéreis de 10mm de diâmetro (Nanotite, Biomet3I) utilizando meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (1X DMEM, Cellgro, Mediatech Inc., Manassas, Virginia, EUA) suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS) (Benchmark, Gemini Bio-Products, West Sacramento, Califórnia, EUA), e solução de penicilina-estreptomicina a 1% (PS) (MD Biomedicals, Thermo Fisher Scientific) sob incubação úmida a 5% de CO₂ a 37°C.

Um dia após a semeadura, o meio mínimo foi trocado por uma das seguintes condições experimentais: meio-base (B) (DMEM, FBS 10%, PS 1%, beta-glicerol-fosfato 10 mM e ácido ascórbico 50µM); (VD) meio-base suplementado por vitamina D (1,25αOHD 10nM), (RA) meio-base suplementado com ácido retinóico (5µM). A suplementação do meio com ácido retinóico foi utilizada como controle positivo, para examinar se as células mesenquimais utilizadas no experimento eram capazes de expressar colágeno tipo X quando estimuladas por RA, conforme relatado em condrócitos por Cohen *et al.* (2006). A vitamina D (1-α, 25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)₂D)) foi adquirida da Calbiochem (EMD Biosciences Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e o ácido retinóico, da Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, Philadelphia, EUA).

Após 1, 3, 7 e 14 dias de cultura nas condições acima mencionadas, o RNA foi isolado das células utilizando o kit RNeasy (Qiagen), à mesma hora do dia. A concentração e qualidade do RNA, assim como o RTPCR foram realizados conforme descritos nos itens anteriores. A tabela 2 mostra os primers / sondas correspondentes aos transcritos selecionados para o RTPCR. O primer / sonda do GAPDH foi utilizado como controle positivo do RTPCR (Mm0302249_g1, ref.NM_008084.2). Os primers / sondas para a osteocalcina (ref. NM_001032298, CACTATTTAGGACCTGTGCT) e osteopontina (ref. NM_009263.2,

GGAACATCAGAGCCACAAGT) foram customizados pela ABI (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados pelo método de quantificação comparativa Ct e ANOVA bifatorial, considerando $p \leq 0,05$.

Tabela 2: Primers / sondas utilizadas para o RTPCR (experimento *in vitro*), adquiridos da ABI (Applied Biosystems).

Identificação do primer / sonda	Símbolo do gene	Nome do gene
Mm00448840_m1	Sox9	Gene contendo SRY-box 9
Mm00483937_m1	Col1a2	Colágeno tipo I alfa 2
Mm01309565_m1	Col2a1	Colágeno tipo II alfa 1
Mm00487041_m1	Col10a1	Colágeno tipo X alfa 1
Mm00486332_m1	SPARC /	Osteonectina
Mm00501584_m1	Runx2	Fator de transcrição relacionado ao Runt 2

5. RESULTADOS

O presente estudo comparou duas condições sistêmicas: suficiência e deficiência de vitamina D. Para analisar a adequação do modelo animal utilizado (descrito por Kelly *et al.*, 2009), foram avaliados os níveis sorológicos de vitamina D (VD), hormônio paratireoideano (PTH), cálcio (Ca), fósforo (P), magnésio (Mg), fosfatase alcalina (ALP), fator de crescimento da insulina-1 (IGF-1), colesterol (Chol), glicose (Glu) e triglicerídeos (Trig) (Figura 2). Os níveis sorológicos de VD, P, Chol e IGF1 diminuíram quando da deficiência de vitamina D. Os níveis de ALP foram reduzidos pelo efeito da interação entre os fatores: inserção do implante e deficiência de vitamina D. Os níveis de Mg foram aumentados pela inserção do implante. As concentrações de Ca, PTH, Glu e Trig não foram alteradas.

Uma vez estabelecido o modelo animal de deficiência vitamina D, utilizou-se a tecnologia de microarray (Agilent Rat Whole Genome) para obter a expressão gênica de mais de 41.000 transcritos, e entre estes, identificar aqueles que tiveram sua expressão alterada quando da inserção do implante e deficiência de vitamina D. Primeiramente, as condições de hibridização foram avaliadas para verificar a possibilidade de variação nas intensidades dos corantes através de um experimento de inversão dos corantes (Dye-Swap). A correlação de Pearson mostrou a existência de uma correlação positiva entre os dois corantes utilizados (coeficiente de correlação = 0,94) (Figura 3A e 3B). A maioria dos valores de expressão concentrou-se ao centro dos gráficos, confirmando a precisão e confiabilidade na intensidade dos corantes Cy3 e Cy5. No scatter plot da figura 3C observou-se que a maioria dos genes mostrou sua expressão inalterada (amarelo) pela intensidade dos corantes, confirmando a precisão e similaridade entre a marcação com Cy3 ou Cy5 no presente estudo.

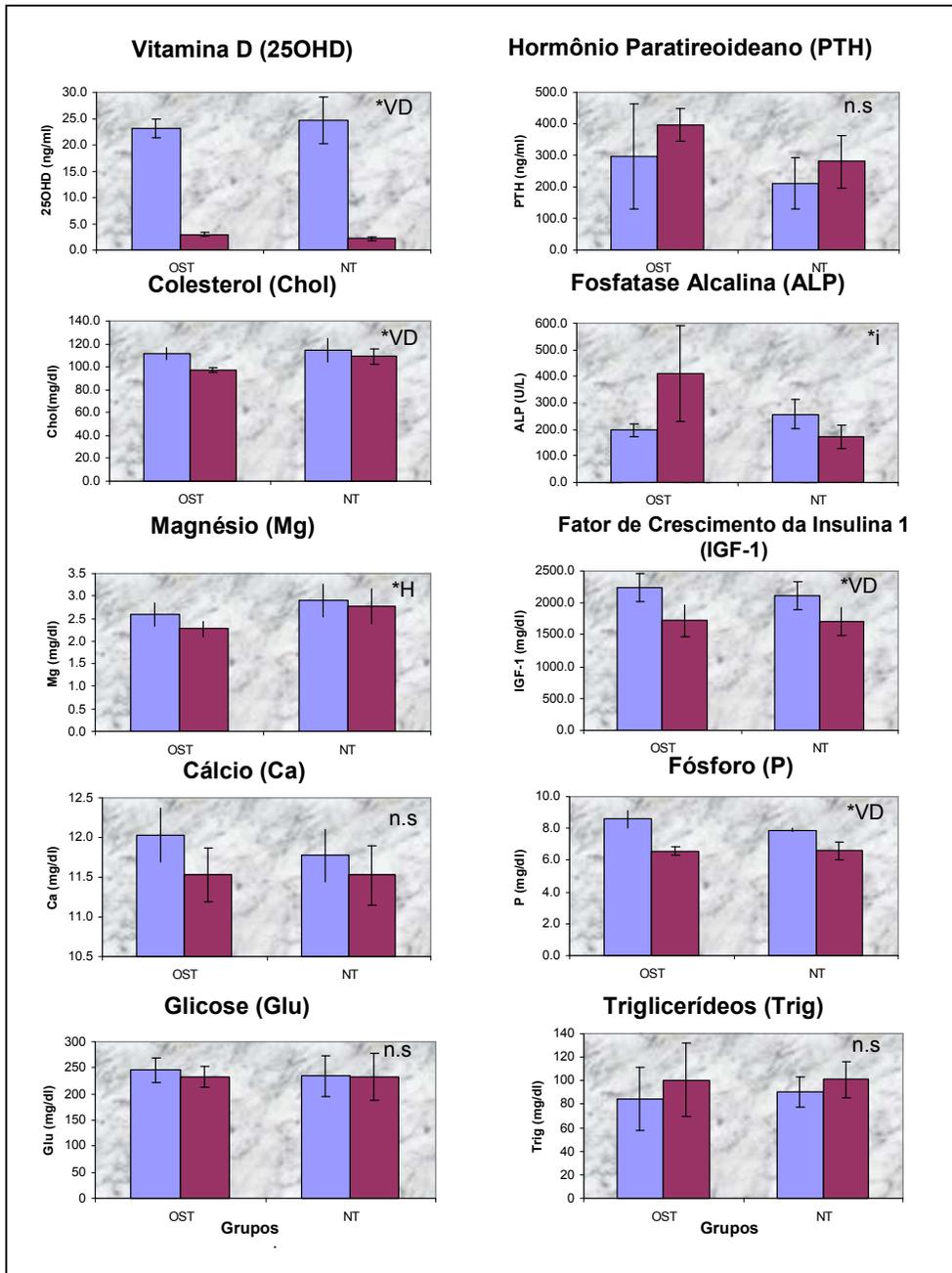


Figura 2: Resultados dos testes sorológicos para os grupos que receberam osteotomia (OST) e para os grupos que receberam implante (NT), sob condições de suficiência (V+) ou deficiência (V-) de vitamina D. A diferença entre os grupos foi considerada não significativa (n.s), significativa para o efeito da inserção do implante (*H); significativa para o efeito da condição de vitamina D (*VD), ou significativa para a interação entre os dois efeitos (*I), segundo $p \leq 0,05$.

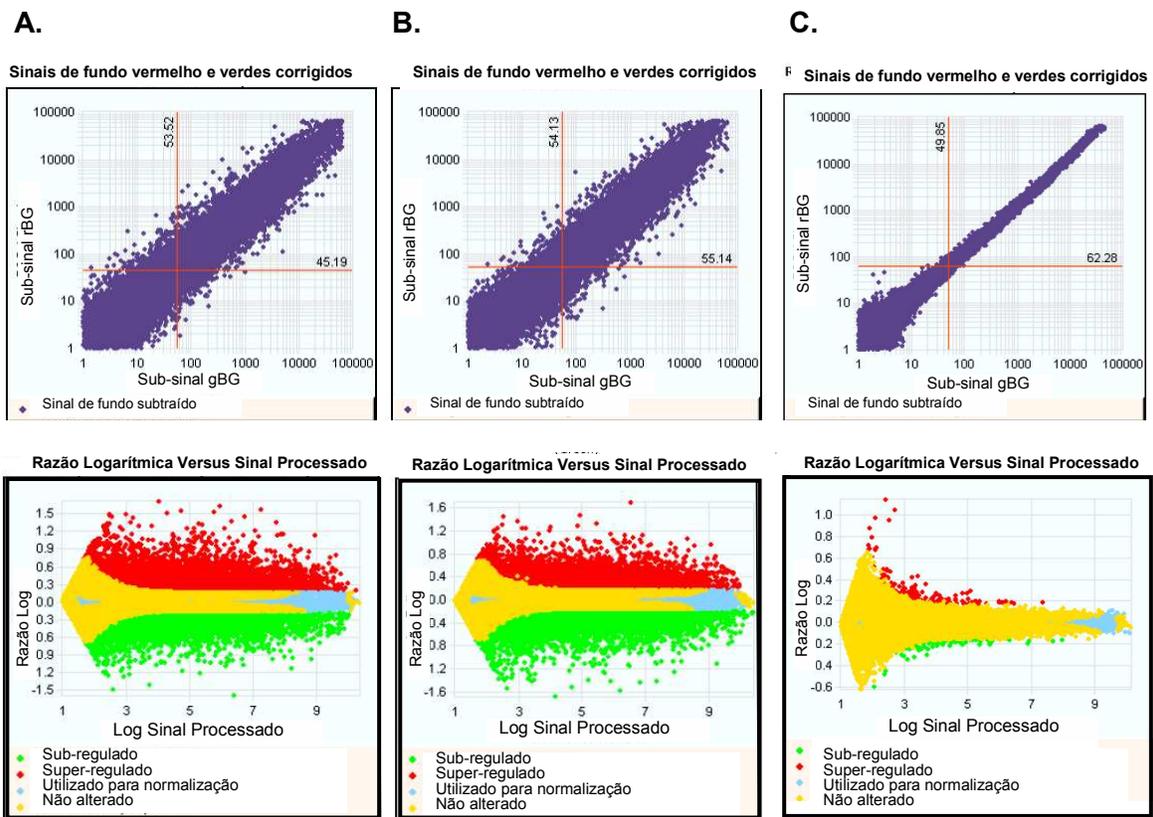


Figura 3: Scatter plots da validação interna do microarray – inversão dos corantes. [A] Amostra selecionada para a inversão dos corantes marcada com Cy3 e hibridizada com o pool de referência marcado com Cy5; [B] Mesma amostra agora marcada com Cy5 e hibridizada com o pool de referência marcado com Cy3; [C] pool de referência marcado separadamente com os corantes Cy3 e Cy5 e hibridizado consigo mesmo. Os gráficos superiores representam os sinais de fundo vermelhos (sub-sinal rBG) *versus* verdes (sub-sinal gBG), indicando a precisão da hibridização. Os scatter plots inferiores representam os valores da razão logarítmica ([A] Cy3/Cy5 e [B] Cy5/Cy3) entre as intensidades dos corantes e o sinal processado, indicando a intensidade de expressão dos genes avaliados. Nos gráficos inferiores, os pontos em amarelo representam a intensidade dos genes com expressão não alterada; em cor vermelho, os genes super-regulados; e em verde, os genes sub-regulados. [A] e [B] apresentaram coeficiente de correlação de Pearson igual a 0,94; e [C] demonstra que a maioria dos valores de expressão não foi alterada.

A figura 4 mostra os resultados da validação externa do microarray por RTPCR para os genes codificadores de colágeno tipos I (col1a2), II (col2a1) e X (col10a1), homólogo 2 do período (*Drosophila*) (Per2), de domínio 2 neuronal Per-Arnt-Sim (NPAS2), de osteocalcina (OSC), de osteonectina (OSN) e de osteopontina (OSP). Embora os valores de expressão não sejam iguais devido às diferentes tecnologias de microarray e RTPCR, os padrões de expressão obtidos por microarray e RTPCR foram similares.

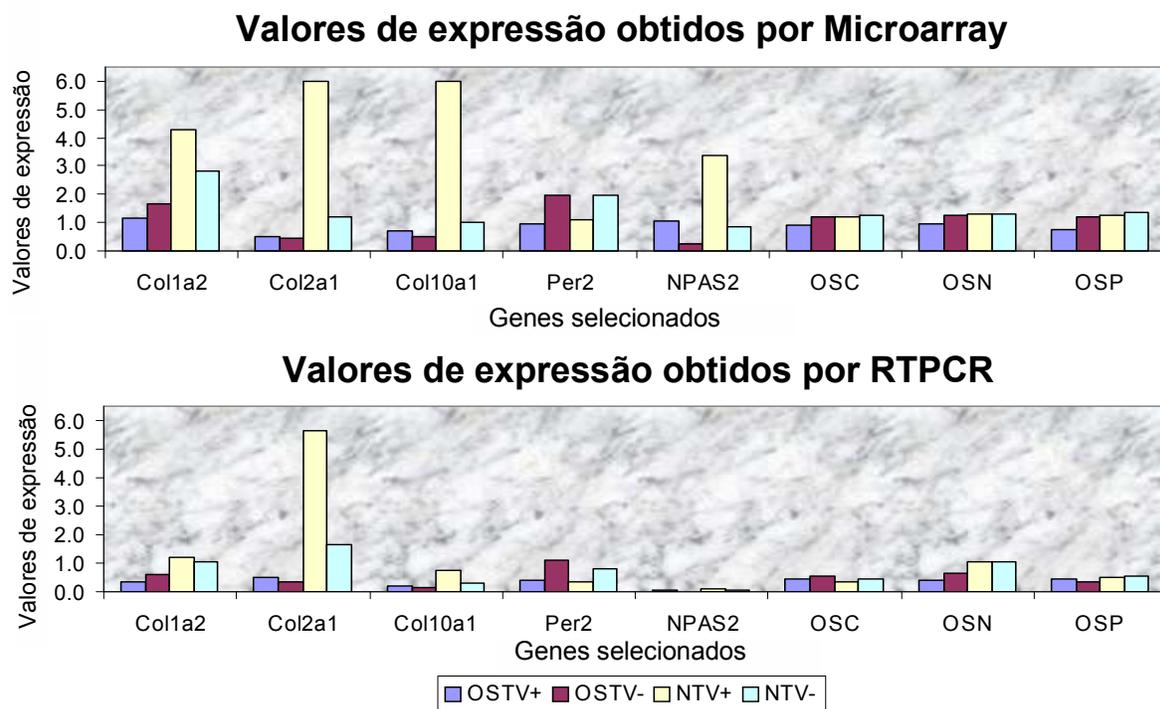


Figura 4: Validação externa do microarray. Os gráficos mostram os valores de expressão obtidos por [A] microarray e [B] RTPCR para alguns genes selecionados para os quatro grupos OSTV+, OSTV-, NTV+ e NTV-.

Mais de 41.000 transcritos contidos na plataforma do microarray tiveram sua expressão rastreada. Destes, 1.668 genes estavam com expressão alterada nas condições estudadas. Do total de 1.668, a expressão de 1.661 transcritos foi alterada pelo efeito da inserção do implante (H); 13 transcritos tiveram a expressão alterada pelo efeito da condição de vitamina D, devido à hipovitaminose D (VD); e a expressão de 7 transcritos foi alterada pelo efeito da interação entre a inserção do implante e deficiência de vitamina D (I) ($p \leq 0,05$). Sete dos 13 transcritos mostraram expressão alterada exclusivamente sob o efeito da deficiência de vitamina D (VD) (Tabela 3). A figura 5 representa a expressão gênica obtida para os quatro grupos estudados, segundo o mapa de calor. Os genes NPAS2, FRA1 e IGFBP3 tiveram expressão aumentada pela inserção do implante, enquanto os outros genes não tiveram sua expressão alterada por este fator. Verificou-se também que a expressão dos genes Maestro, TSC22, Per2, RGD1564491, e SLC30 foi aumentada; enquanto dos genes NPAS2, FRA1, SCL7, e IGFBP3 foi diminuída pela deficiência de vitamina D, afetando ambos os grupos OSTV- e NTV-. Analisando-se o fator interação inserção do implante e deficiência de vitamina D, observou-se que a expressão dos genes EPO e CTTNBP2 (cortactina), foi reduzida; enquanto a expressão dos genes Pole e CYP2b15 foi aumentada, efeito oposto quando da inserção de implante durante suficiência de vitamina D ou reparo ósseo normal sob deficiência de vitamina D.

Tabela 3: Genes com expressão alterada pelos efeitos: inserção do implante (H), condição de vitamina D (VD) e interação entre os dois fatores (I).

Símbolo do gene	Identificador	Título do Gene	H	VD	I
Efeito [H]					
1661 transcritos					
Efeito [VD]					
Npas2	CO386194	Domínio 2 neuronal Per-Arnt-Sim	*	*	
Per2	NM_031678	Homólogo do Período 2 (<i>Drosophila</i>)			*
Tsc22d3	NM_031345, AI029054, NM_031345,	Zipper de leucina induzido por glucorticóide			*
Igfbp3	NM_012588	Proteína 3 de ligação do fator de crescimento da insulina	*	*	
RGD1564491	XM_221305	RGD1564491 (Similar ao Fator de Von Willebrand 5B)			*
Slc7a8	NM_053442	Carregador de soluto família 7 (transportador amino-catiônico, sistema y+), membro 8	*	*	
Slc30a2	BC061997	Carregador de soluto família 30 (transportador de zinco), membro 2	*	*	
Fos1	NM_012953	Fos-like antígeno 1			*
Maestro	XM_001053368	Similar ao maestro (predicted) (RGD1559803_predicted)			*
-	AA899948, BF393107	Locus de Transcrição	*	*	
Efeito [I]					
Cyp2b15	NM_017156	Citocromo P450, família 2, subfamília b, polipeptídeo 15	*	*	*
Pole	AI555827	Polimerase, epsilon	*	*	*
EPO	TC543872	Eritropoietina AF202309S2	*	*	*
-	DV729125	Locus de transcrição, similar ao XP_904500.1, proteína hipotética LOC69784	*	*	*
-	XM_227556	CTTNBP2 N-terminal like (Cttnbp2nl_predicted), cortactina	*	*	*
-	XM_574576	Similar ao cDNA RIKEN 1700063I17, (RGD1560948_predicted)	*	*	*
-	TC529016	Unknown - desconhecido	*	*	*

* Diferença estatística para $p \leq 0,05$.

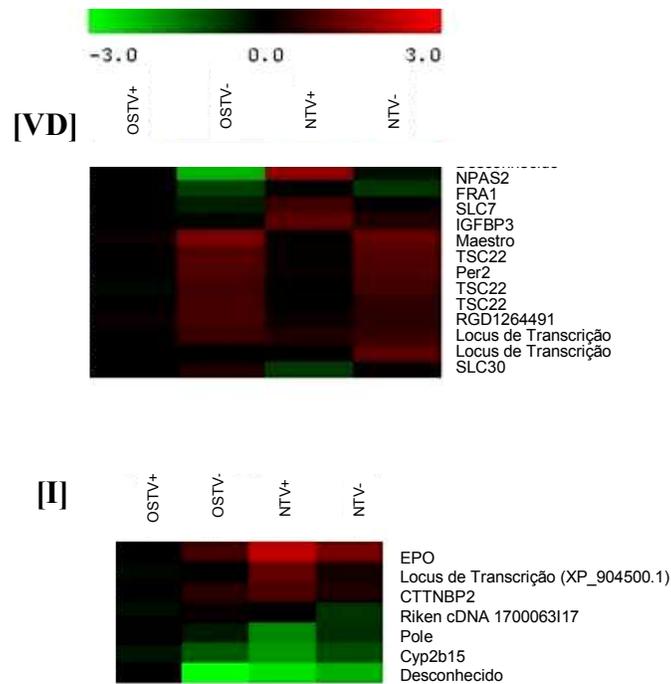


Figura 5: Mapa de calor representando a expressão dos genes alterada pelos efeitos: condição de vitamina D (VD) e interação entre os dois fatores (I). As colunas do mapa de calor representam a expressão gênica nos quatro grupos avaliados (OSTV+, OSTV-, NTV+, NTV-, a partir da esquerda), sendo a super-expressão representada em vermelho; sub-expressão em verde; e a expressão não alterada está indicada em preto. A escala de cores indica proporção de expressão de -3,0 (verde intenso) a 3,0 (vermelho intenso).

A clusterização de PAM (Figura 6) agrupou os transcritos com expressão alterada mais de 1,5 vezes em dois padrões diferentes: genes que foram sub-expressos (588 genes) (Figura 6A) ou super-expressos (1.080 genes) (Figura 6B) comparados ao grupo OSTV+. O padrão de expressão que foi alterado em NTV+ foi significativamente atenuado no grupo NTV-.

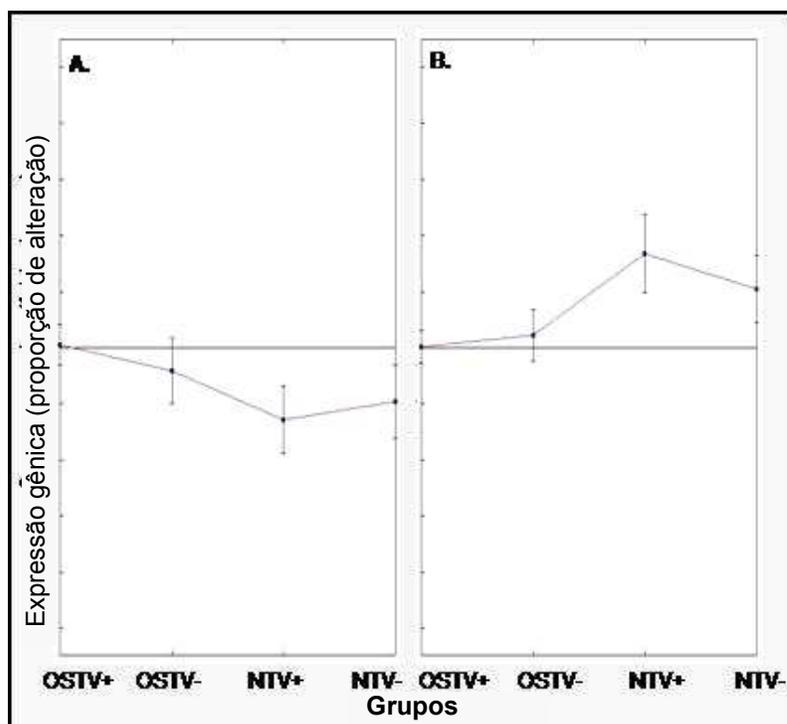


Figura 6: Resultados da clusterização de PAM representando os padrões de expressão entre os grupos: OSTV+, OSTV-, NTV+, NTV- (largura de silhueta média = 0,65). [A] Genes induzidos pela inserção do implante; [B] genes suprimidos pela inserção do implante.

Posteriormente, os transcritos que tiveram sua expressão alterada acima de 1,5 vezes após a análise de ANOVA, foram agrupados em clusters hierárquicos (Figura 7A) aonde a maioria dos genes mostrou expressão induzida pela inserção do implante (amarelo), e atenuada quando da deficiência de vitamina D. Notou-se que os genes da osteonectina e colágeno tipo VIII, alfa 2, estavam co-localizados no cluster da IGFBP3 e cortactina (Figura 7B); os clusters dos genes Cyp2b15 (Figura 7C) e fos-like antígeno 1 (FRA1) (Figura 7E) não incluíram genes de matriz extracelular; e o cluster contendo o gene codificador de EPO (Figura 7D) possuía os colágenos tipos I e XI (col1a2 e col11a1). No entanto, houve dificuldade em se inferir a existência de co-regulação ou interação biológica funcional para a maioria dos clusters, pelo fato de serem muito extensos e,

portanto, pouco informativos (Figura 7B a 7E). Assim, a maior parte dos clusters obtidos englobou uma lista extensa de genes, enquanto apenas dois clusters apresentaram-se estreitos. Os dois clusters menores incluíram os genes NPAS2 e Per2 (Figura 8A e 8B, respectivamente). NPAS2 estava co-localizado com os genes codificadores de colágeno tipo II (col2a1), colágeno tipo X (col10a1) e proteína de ligação de hialurano e proteoglicano (HPLP) (Figura 8A). O gene Per2 estava co-localizado com os genes Maestro, TSC22 (também chamado GILZ) e RGD1564491 (similar ao Fator de Von Willebrand 5B) (Figura 8B).

A análise da Ontologia Gênica promoveu uma lista de genes com expressão alterada que estavam envolvidos em várias funções de processos biológicos, celulares e moleculares. No entanto, como houve uma distribuição ampla dos genes em cada categoria da Ontologia, esta análise não foi informativa e os resultados não foram incluídos neste trabalho. No entanto, a análise da Ontologia permitiu a separação dos genes segundo sua participação na formação de matriz extracelular de tecido cartilaginoso ou ósseo, para que as expressões destes genes pudessem ser comparadas para inferência de uma possível regulação biológica. Entre os genes de matriz extracelular, os relacionados à síntese de cartilagem, como colágeno tipos II e X, tiveram a expressão reduzida no grupo NTV- em comparação ao grupo NTV+ (Figura 8C). Ainda, os genes relacionados à matriz cartilaginosa foram mais afetados pela deficiência de vitamina D do que os genes envolvidos em matriz óssea (Figura 8D), para os grupos que receberam implantes.

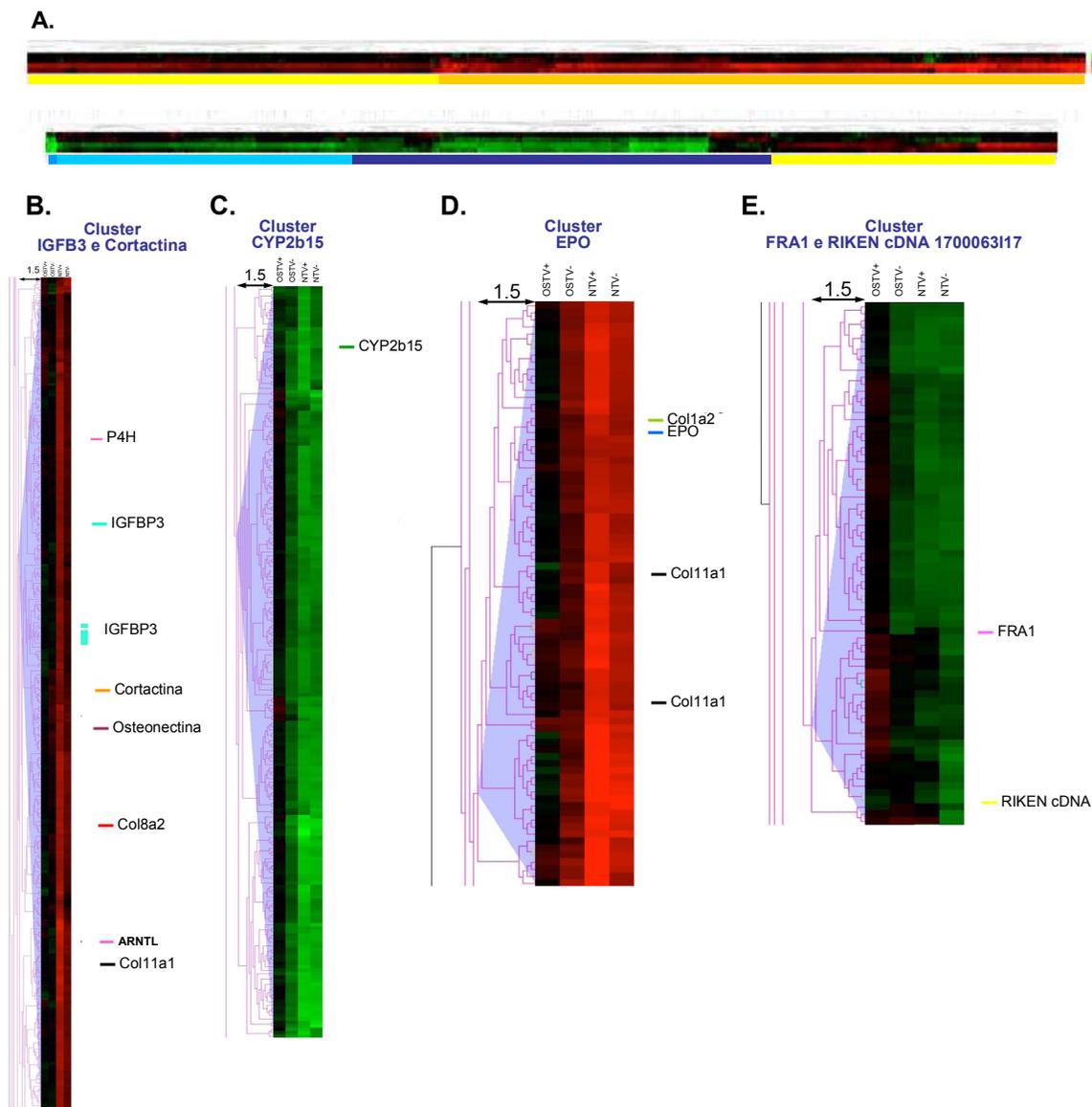


Figura 7: Resultados da clusterização hierárquica. [A] Representação do agrupamento do total de 1.668 genes que mostraram expressão alterada nas condições desse estudo. Representado em tons de amarelo, agrupamentos que apresentaram super-expressão (terceira linha vermelha na árvore hierárquica); e em tons de azul, agrupamentos que mostraram sub-expressão (terceira linha verde na árvore hierárquica) quando da inserção do implante. As figuras de [B - D] mostram uma visão aproximada dos clusters referentes a alguns genes com expressão alterada pelo efeito (VD) ou (I), com a co-localização de genes

integrantes de matriz extracelular. [B] Cluster contendo a IGFBP3 e Cortactina; [C] cluster contendo CYP2b15; [D] cluster contendo EPO; [E] cluster contendo FRA1. As colunas da árvore hierárquica representam a expressão gênica nos quatro grupos avaliados (OSTV+, OSTV-, NTV+, NTV-), sendo a super-expressão representada em vermelho; sub-expressão em verde; e expressão não alterada em preto.

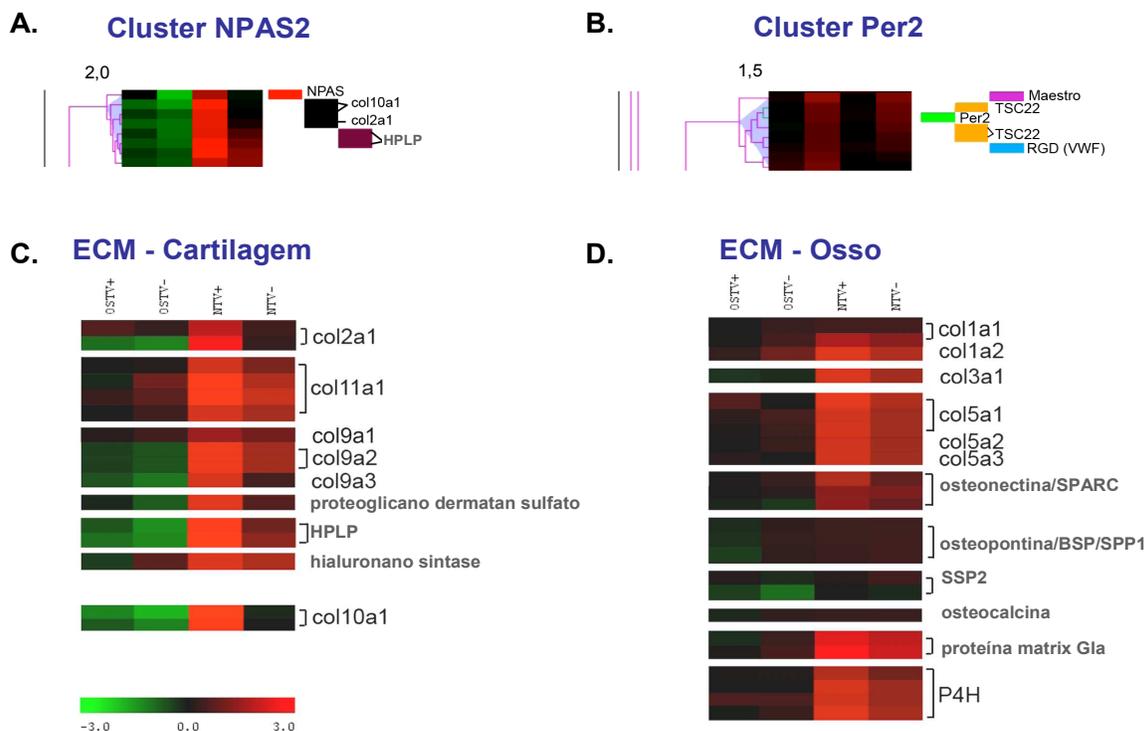


Figura 8: Clusters dos genes NPAS2 [A] e Per2 [B], e mapas de calor representando a expressão gênica entre os grupos de alguns genes de matriz extracelular (ECM) cartilaginosa [C] e óssea [D]. As colunas da árvore hierárquica e do mapa de calor representam a expressão gênica nos quatro grupos avaliados (OSTV+, OSTV-, NTV+, NTV-, a partir da esquerda), sendo a super-expressão representada em vermelho; sub-expressão em verde; e expressão não alterada em preto. A escala de cores indica proporção de expressão de -3,0 (verde intenso) a 3,0 (vermelho intenso). A distância utilizada no dendrograma do gene NPAS2 foi de 2,0 enquanto do Per2 foi de 1,5.

A comparação dos resultados ao banco de dados da KEGG revelou que os transcritos com expressão alterada pelo efeito da inserção do implante (H) estavam envolvidos em 12 vias metabólicas distintas (Figura 9A). Além disso, sete vias tiveram representação significativa quando se consideraram os efeitos da condição de vitamina D (VD) (Figura 9B) ou o efeito da interação entre os fatores (I) (Figura 9C). As vias afetadas pelos efeitos (H), (VD) e (I) representaram cinco processos principais ocorridos em duas semanas de osseointegração (Figura 9D): formação de matriz extracelular (comunicação celular, interação receptor de matriz extracelular, adesão focal, e metabolismo de prolina e arginina), angiogênese (sistema renina-angiotensina), resolução da inflamação e resposta imunológica (metabolismo de xenobióticos e do ácido aracdônico, linhagem de células hematopoiéticas, cascata de complementos e coagulação), controle da energia corporal e metabolismo ósseo (ritmo circadiano, interação receptor-ligante neuroativos, metabolismo da glutathione, sinalização via wnt), e proliferação e diferenciação celular (DNA polimerase, e metabolismo da pirimidina e purina).

A.

[H]	Lista	Array	z-score
Comunicação Celular	21	84	6,8
Interação com Receptor de Matriz Extracelular	16	58	6,4
Metabolismo de Arginina e Prolina	6	25	3,5
Adesão Focal	20	150	3,3
Metabolismo de Xenobióticos pelo CYP450	8	42	3,2
Linhagem de Células Hematopoiéticas	11	69	3,1
Ritmo Circadiano	2	11	2,7
Interação ligante-receptor Neuro-ativo	30	283	2,7
Sistema Renina-Angiotensina	4	18	2,6
Metabolismo da Glutamina	5	29	2,3
Metabolismo do Ácido Aracônico	7	51	2,0
Cascatas de Complemento e Coagulação	7	51	2,0

B.

[VD]	Lista	Array	z-score
Ritmo Circadiano	2	11	18,6
Sinalização via Wnt	1	110	2,7

C.

[I]	Lista	Array	z-score
DNA Polimerase	1	21	8,2
Metabolismo de Xenobióticos pelo CYP450	1	42	5,7
Metabolismo da Pirimidina	1	42	5,7
Metabolismo do Ácido Aracônico	1	51	5,2
Metabolismo da Purina	1	90	3,8

D.

5 PROCESSOS PRINCIPAIS :

1. Formação de matrix extracelular	
2. Resolução da inflamação e resposta imune	
3. Controle da energia corporal e metabolismo ósseo	
4. Angiogênese	
5. Proliferação / diferenciação celular	

Figura 9: Vias biológicas da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG) com representação significativa ($z\text{-score} \geq 2,0$) para os efeitos: [A] inserção de implante (H), [B] condição de vitamina D (VD) e [C] interação dos dois efeitos inserção do implante e deficiência de vitamina D (I). Em [D], a representação dos cinco processos principais envolvidos durante a osseointegração, relacionados às 16 vias biológicas encontradas.

Para investigar o efeito da vitamina D e da superfície de titânio na modulação da expressão gênica *in vitro*, células precursoras mesenquimais foram cultivadas sobre placas plásticas ou discos de titânio durante um (d1), três (d3), sete (d7) e quatorze dias (d14) com ou sem suplementação de vitamina D (VD). A suplementação com ácido retinóico (AR) foi utilizada como controle positivo para a expressão do colágeno tipo X. As expressões de alguns genes relacionados à matriz extracelular óssea (Figura 10) e à síntese de matrix cartilaginosa e controle do metabolismo ósseo (Figura 11) foram medidas através de RTPCR. A análise de ANOVA bifatorial permitiu a avaliação dos resultados sob três efeitos: superfície de titânio, suplementação com VD, e interação entre superfície de titânio e suplementação. A expressão do colágeno tipo I foi bloqueada pelo efeito do titânio no d1 e pela interação entre os fatores nos dias 7 e 14 de cultura. A redução na expressão da osteocalcina no 3º e 14º dias foi consequência da interação entre os fatores ou da vitamina D, respectivamente. A interação entre os fatores induziu a expressão da osteocalcina no primeiro dia. A vitamina D e o titânio, individualmente também aumentaram a expressão deste gene no sétimo dia. E apenas o fator titânio foi capaz de induzir a osteocalcina após 14 dias de cultura. A vitamina D e o titânio separadamente aumentaram a expressão da osteonectina no d1. A interação entre os dois fatores foi responsável por diminuir a expressão deste gene no terceiro dia, aumentar sua expressão no sétimo dia e reduzir a expressão no décimo quarto dia. O gene Runx2 não foi modulado por nenhum dos fatores até o terceiro dia, a partir do sétimo dia teve sua expressão reduzida pela vitamina D.

As expressões dos genes de colágeno tipos II e X foram significativamente potencializadas pelo titânio no primeiro dia de cultura, e reduzidas nos dias subsequentes. Esta redução no gene de colágeno tipo II foi devido à interação entre os fatores nos dias d3 e d7 e à vitamina D no d14. No entanto, a expressão do gene de colágeno tipo X foi suprimida pela vitamina D nos dias d3 e d14 e pela interação entre os fatores no sétimo dia. O gene SOX9

apresentou expressão diminuída no primeiro dia de cultura devido à interação entre os fatores. O titânio manteve a expressão de SOX9 diminuída no terceiro dia e ao sétimo dia, o titânio induziu a expressão deste gene.

O ácido retinóico foi capaz de induzir a expressão de colágeno tipo X nos dias d1 e d3 quando as células foram cultivada sobre plástico. No entanto, quando cultivadas sobre discos de titânio, o efeito do titânio foi dominante para induzir a expressão do colágeno tipo X no primeiro dia de cultura e reduzir sua expressão nos dias subseqüentes.

O gene do colágeno tipo X é geralmente expresso por condrócitos da zona hipertrófica de cartilagem, e induzido diretamente pelo ácido retinóico. Para confirmar se as células mesenquimais utilizadas neste estudo eram capazes de expressar o gene do colágeno tipo X, as mesmas foram cultivadas em meio-base suplementado por ácido retinóico. Os resultados demonstraram que as células cultivadas eram capazes de expressar colágeno tipo X quando induzidas pelo ácido retinóico, mesmo não tendo passado por não terem a expressão intensamente modulada pelo ácido retinóico. Surpreendentemente, embora as células mesenquimais cultivadas não tenham passaram por diferenciação condrogênica ou osteogênica em meio convencional, quando cultivadas sobre discos de titânio, as expressões dos genes de colágeno tipos II e X foram induzidas significativamente. Esta expressão foi maior do que quando as células foram induzidas pelo ácido retinóico. O efeito do titânio foi dominante sobre a expressão do colágeno tipo X, no primeiro dia de cultura das células mesenquimais.

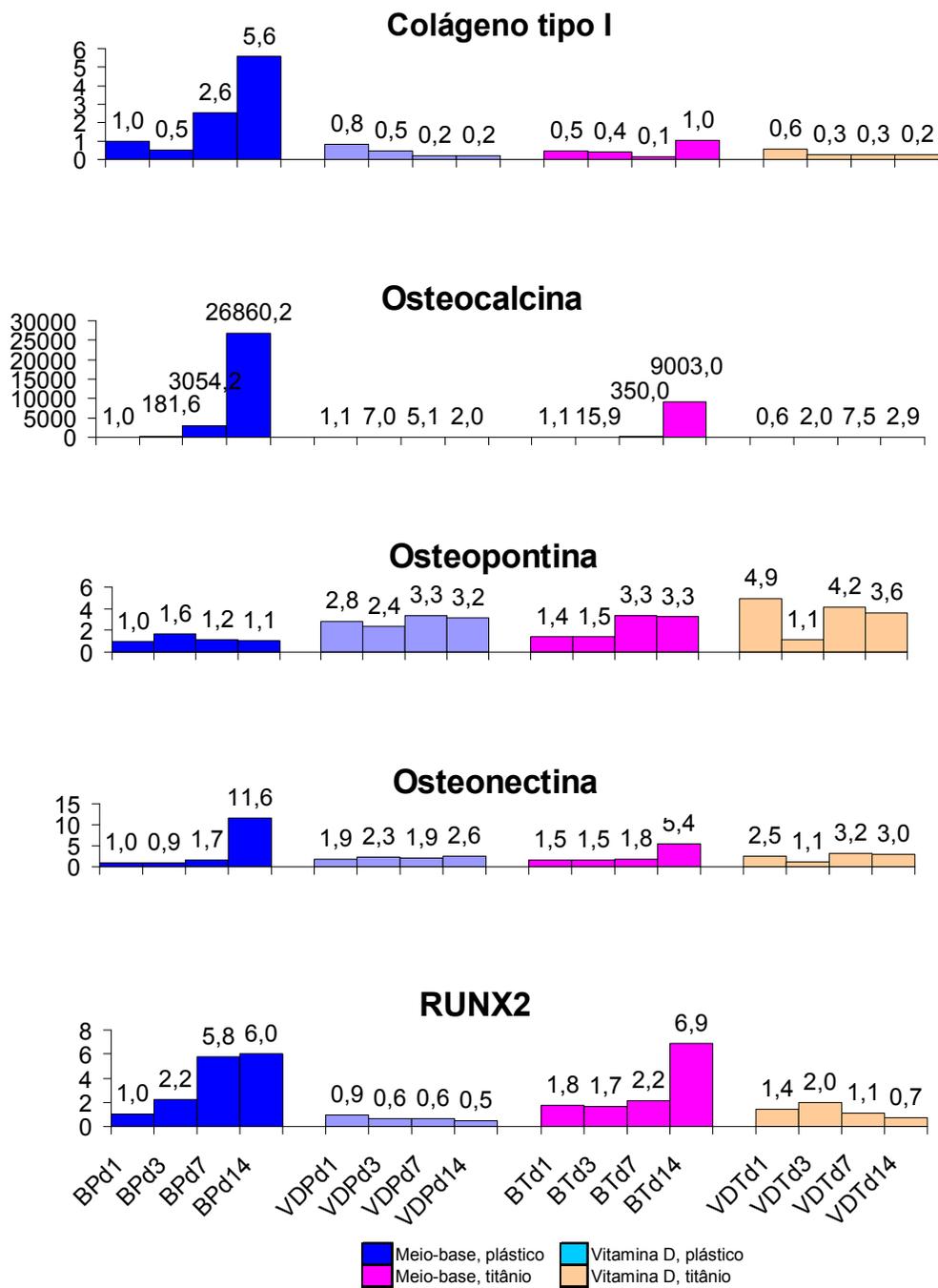


Figura 10: Expressão gênica obtida por RTPCR de genes integrantes de matriz extracelular óssea, quando células precursoras derivadas de medula óssea foram cultivadas sobre plástico (P) ou titânio (T), em meio base (B), ou suplementado com vitamina D (VD), durante um (d1), três (d3), sete (d7) ou quatorze dias (d14).

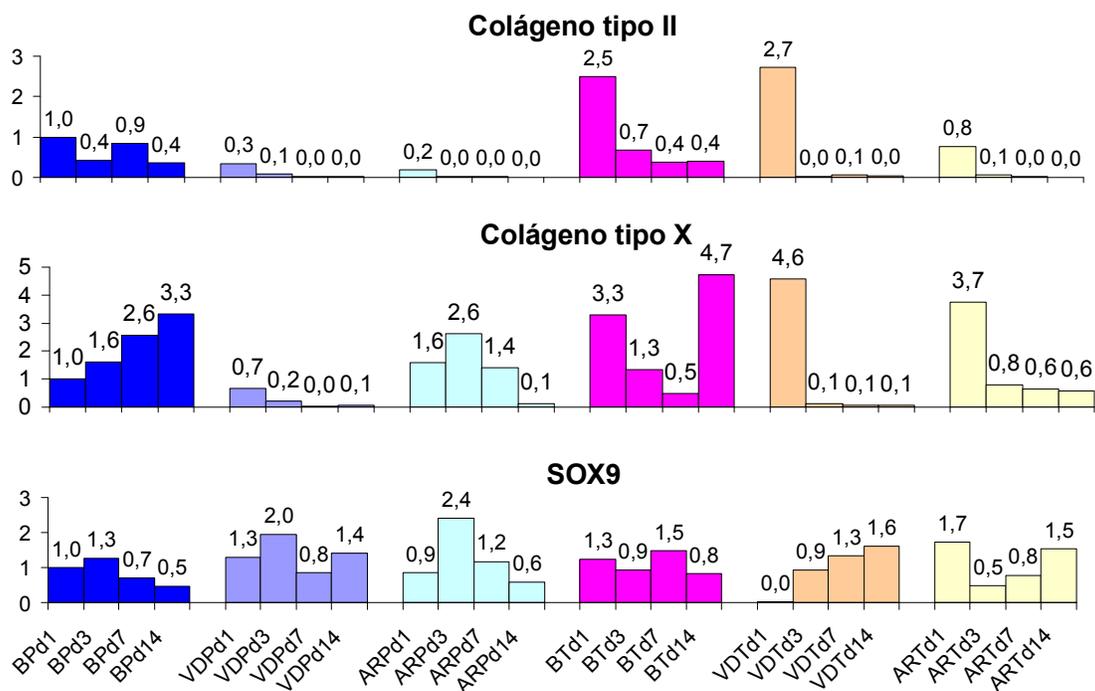


Figura 11: Expressão gênica obtida por RTPCR de genes relacionados à matriz extracelular cartilaginosa, quando células precursoras derivadas de medula óssea foram cultivadas sobre plástico (P) ou titânio (T), em meio base (B), ou suplementado com vitamina D (VD) durante 1 (d1), 3 (d3), 7 (d7) ou 14 dias (d14). A suplementação com ácido retinóico (AR) foi realizada como controle positivo para a expressão do gene de colágeno tipos X.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a influência da vitamina D na expressão gênica durante a osseointegração. Para isso, utilizou-se modelo animal de deficiência de vitamina D. Os testes sorológicos confirmaram a adequação do modelo de deficiência de vitamina D em rato, em que os níveis de 25(OH)D e fósforo foram reduzidos, comparado com os ratos que receberam dieta padrão. Estes resultados confirmam que baixos níveis de vitamina D estão associados à hipofosfatemia (Lips, 2001; Lekholm, 2003). Os níveis de fosfatase alcalina não estavam alterados em ratos deficientes de vitamina D durante o reparo ósseo normal, mas se mostraram reduzidos quando da inserção de implantes em ratos deficientes de vitamina D. Este fato sugere que a condição de deficiência de vitamina D prejudicou ou atrasou a formação óssea durante a osseointegração, mas não durante o reparo da osteotomia normal. Embora a concentração de IGF-1 estivesse diminuída quando da deficiência de vitamina D, os níveis de glicose e triglicerídeos e hormônio paratireoideano não foram alterados, e os de colesterol foram reduzidos. Assim, após receber a dieta privada de vitamina D durante 45 dias, os ratos tornaram-se deficientes de vitamina D, mas não demonstraram características de síndrome metabólica ou hipertireoidismo (Hypponen *et al.*, 2008). Os presentes resultados mostraram que os níveis circulatórios de IGF1, que participa na hidroxilação de prolina, e a expressão do gene codificador de IGFBP3 foram reduzidos quando da deficiência de vitamina D. A prolina é um aminoácido que está presente na cadeia de alguns tipos de colágenos, como o colágeno tipo 1. Para a maturação destes colágenos, os resíduos de prolina precisam sofrer hidroxilação, a qual é mediada pelo fator de crescimento da insulina-1 (IGF1). A proteína IGFBP3 é responsável por manter os níveis de IGF1 estáveis no sangue, não permitindo que esta última seja rapidamente degradada. Embora os dados do microarray não mostraram alteração significativa da expressão do gene col1a2, a expressão de IGFBP3 e conseqüentemente os níveis séricos de IGF1 foram reduzidos. Assim, uma vez que o fator de crescimento de

insulina-1 participa na reação de hidroxilação dos resíduos de prolina, sugere-se que a modificação pós-tradução das fibras de colágeno pode ter sido prejudicada, com possível redução de fibras de colágeno tipo I durante o reparo ósseo e a osseointegração em ratos deficientes de vitamina D.

A osseointegração é um processo complexo envolvido na cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio. Este processo foi considerado biológico e molecularmente distinto do reparo ósseo normal ou remodelação óssea (Ozawa *et al.*, 2002; Ogawa & Nishimura, 2006). O presente estudo aplicou a tecnologia de microarray e determinou os padrões de expressão durante o reparo ósseo e cicatrização peri-implantar, durante a suficiência e deficiência de vitamina D. Optou-se pelo uso da tecnologia de Microarray de dois canais, da plataforma Agilent, em função deste sistema possuir uma maior quantidade de transcritos, sendo a maioria validada pelo fabricante, o que aumentava a confiabilidade do método. Além disso, a plataforma Agilent apresentava maior precisão e sensibilidade para atingir os objetivos do presente estudo, em comparação aos outros sistemas disponíveis no mercado. Ainda, os algoritmos indicados para a análise de dados obtidos através da plataforma Agilent trariam menor necessidade de ajustes, aumentando a precisão dos resultados. O uso da tecnologia de microarrays de dois canais exige que um delineamento de estudo específico seja traçado para a adequada obtenção dos resultados. Desta maneira, optou-se pela utilização de quatro réplicas biológicas e invés de réplicas técnicas, aumentando o número de amostras por grupo de forma a intensificar o poder estatístico em detectar diferenças de expressão gênica entre os grupos (Wei *et al.*, 2004). Optou-se também pela realização de um pool de referência para ser hibridizado com as amostras a serem testadas. Este método reduziria as possíveis variabilidades técnicas e biológicas entre as amostras além de permitir a comparação direta dos resultados entre os grupos. Assim, o grupo OSTV+ (pool de referência) foi utilizado como controle da hibridização, e foi hibridizado com todas as outras amostras e as intensidades da expressão gênica dos outros grupos demonstram

a expressão relativa em forma de múltiplos (pela transformação logarítmica) referente ao grupo controle. Foram desta forma considerados para análise estatística, os genes que tinham pelo menos 1,5 vezes maior ou menor expressão com relação ao grupo controle.

A existência de correlação positiva para a validação interna do microarray (inversão dos corantes) demonstrou que não houve influência das diferentes intensidades dos corantes utilizados. Os scatter plots mostraram linearidade e pouca distribuição das intensidades de expressão, confirmando a precisão e confiabilidade da técnica. A figura 4 demonstra que os padrões de expressão dos genes selecionados obtidos através da tecnologia de microarray foram similares aos obtidos por RTPCR. Este fato confirmou a confiabilidade e precisão da tecnologia de microarray utilizada neste experimento, corroborando com o estudo de Kojima *et al.* (2008).

O uso de microarrays para identificar e quantificar genes em amostras biológicas permite o rastreamento de expressão em larga escala de genes que possam estar diferentemente expressos em dois ou mais grupos ou condições (Eisen *et al.*, 1998). O presente estudo rastreou mais de 41.000 transcritos do genoma de rato presentes na plataforma do microarray; conseqüentemente, era de crucial importância que as falsas descobertas (erro tipo I) fossem rigorosamente reduzidas para aumentar o poder de detectar as diferenças de expressão gênica entre os grupos (Devlin *et al.*, 2003). Sendo assim, os valores de p foram ajustados para taxa de falsa descoberta (FDR) utilizando a correção de Benjamini e Hochberg. Por exemplo, considerando $p \leq 0,05$ sem a correção para FDR, 5% (2050) do total de genes avaliados (41.000) poderiam ser falso-positivos. Este resultado seria inaceitável por sua reduzida confiabilidade. Portanto, com a aplicação da restrita correção de Benjamini e Hochberg para FDR, considera-se que 5% dos genes cuja expressão mostrou-se diferente pelo teste ANOVA bifatorial podem ser tratados como falso-positivos (menos de 84 genes), reduzindo o número de erros e apontando para novas descobertas (Devlin *et al.*, 2003). As

correções para FDR têm sido amplamente utilizadas nos estudos envolvendo microarrays, já que seu rigoroso método de seleção permite que sejam ressaltados apenas os transcritos com significativa alteração de expressão, tendo uma possibilidade extremamente reduzida em que os genes foram alterados devido ao acaso.

A análise rigorosa aplicada neste estudo através da correção para FDR permitiu a identificação 13 transcritos com expressão alterada pela deficiência de vitamina D ($p \leq 0,05$) em ambas as condições de reparo ósseo e cicatrização peri-implantar; e 7 transcritos cuja expressão foi alterada pela interação entre a inserção do implante e a deficiência de vitamina D. Os resultados demonstraram mais de 1.650 genes com expressão alterada pela inserção de implante quando comparado ao reparo ósseo normal (osteotomia), em concordância com estudos anteriores que encontraram que o implante foi o maior fator de modulação da expressão de um grande número de genes, enquanto a osteotomia afetou uma menor quantidade de genes (Ozawa *et al.*, 2002; Ogawa & Nishimura, 2003, 2006; Kojima *et al.*, 2008). A fim de organizar os dados e ter uma compreensão global do comportamento dos genes avaliados, aplicaram-se dois tipos de algoritmos de clusterização: particionamento sobre medóides (PAM) e clusterização hierárquica.

PAM é um algoritmo de particionamento, uma variação de médias-K, que é comumente aplicada nas análises de microarray (Dudoit & Fridlyand, 2002). O PAM utiliza um gene com expressão mediana ao invés de um gene com expressão média como o ponto central para dividir o conjunto de dados de maneira a aperfeiçoar a similaridade dos genes dentro de um cluster e a dissimilaridade entre os clusters. Os resultados da clusterização de PAM apontaram para a existência de dois padrões diferentes de expressão gênica em aproximadamente 65% dos genes. Ambos os padrões mostraram que a inserção do implante no osso foi a maior indutora ou supressora da expressão gênica, quando se comparou a cicatrização dos grupos que receberam apenas osteotomia

com os que receberam osteotomia com inserção de implantes. A deficiência de vitamina D atenuou a expressão gênica em ambos os padrões.

A clusterização hierárquica e as comparações estatísticas com os bancos de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kioto (KEGG) e Ontologia Gênica (GO), permitiram a análise de possíveis interações, co-regulação e função dos 20 transcritos alterados na osseointegração pela deficiência de vitamina D. O objetivo da clusterização é agrupar os transcritos baseado na similaridade ou dissimilaridade de seus perfis de expressão a fim de possivelmente inferir alguma relação entre aqueles que estão contidos em um mesmo cluster. Genes agrupados em um mesmo cluster possuem padrão similar de expressão e podem ser co-regulados pelos mesmos co-fatores e participarem de mesmas funções biológicas (Eisen *et al.*, 1998). Estes genes com expressão atenuada pela deficiência de vitamina D podem ser genes críticos para o adequado processo de osseointegração, principalmente considerando o envolvimento dos processos de formação de matriz extracelular, angiogênese, resolução da inflamação e resposta imune, controle da energia corporal e metabolismo ósseo, e proliferação e diferenciação celular. Análises futuras são necessárias para investigar como a alteração individual da expressão destes afetaria o produto final das vias metabólicas envolvidas no processo de osseointegração de implantes.

O presente estudo demonstrou que a expressão de 1.661 transcritos foi induzida ou suprimida quando da inserção do implante no osso. O implante mostrou-se o maior regulador da expressão gênica durante a cicatrização no tecido ósseo, modulando localmente mais genes do que o fator sistêmico de deficiência de vitamina D. A maioria dos transcritos (1080) mostraram super-expressão e menos da metade (588) foram sub-expressos quando da cicatrização peri-implantar. Estudos anteriores também demonstraram que diversos genes relacionados ao tecido ósseo foram induzidos pela superfície de titânio *in vitro*

(Carinci *et al.*, 2003; Carinci *et al.*, 2004) e *in vivo* (Ogawa & Nishimura, 2003 , 2006; Kojima *et al.*, 2008).

Ogawa & Nishimura (2006) descreveram três novos genes que foram considerados importantes no processo de osseointegração: TO1 (desconhecido, homólogo ao XM_225880), TO2 (apolipoproteína E) e TO3 (prolil-4-hidroxilase subunidade- α (P4H α). No entanto, os resultados do presente estudo utilizando microarray demonstraram que apenas o gene P4H α teve sua expressão induzida pela inserção do implante; enquanto sua expressão não foi afetada pela deficiência de vitamina D. O gene P4H α codifica a enzima prolil-4-hidroxilase, responsável pela hidroxilação da prolina durante o metabolismo de certos tipos de colágeno e pela degradação da proteína HIF1- α (fator induzível de hipóxia, subunidade α). Para sua atividade, a enzima P4H α necessita de oxigênio. Portanto, em situação de hipóxia tecidual, a redução dos níveis de oxigênio diminui a ação da enzima P4H α , prejudicando o metabolismo do colágeno e permitindo o acúmulo de HIF1- α . No entanto, HIF1- α não mostrou expressão alterada no presente estudo. A redução de oxigênio no tecido ósseo pode ocorrer em diferentes graus quando da lesão de vasos sanguíneos durante o reparo de ferida óssea. Geralmente, o gene codificador do HIF1- α mostra-se super-expresso quando da redução dos níveis de oxigênio tecidual, sendo o primeiro iniciador da cascata para adaptação à situação de hipóxia. Sendo HIF1- α responsável pela modulação da expressão de diversos genes responsivos à hipóxia, o acúmulo de HIF1- α desencadeia uma cascata de sinalização para sistemas de adaptação do organismo/tecido ao reduzido nível de oxigênio, entre eles, o início do processo de angiogênese. Genes como VEGF e EPO também são responsivos à hipóxia, por serem modulados por HIF. No entanto, os resultados do microarray não demonstraram alteração na expressão de genes responsivos à hipóxia (HIF1- α ou HIF1- β). Embora houve indução da expressão do gene EPO quando da inserção de implantes e supressão quando da deficiência de vitamina D, a expressão de

HIF não foi alterada, sugerindo que outros fatores desconhecidos regularam a expressão de EPO, exceto a resposta à hipóxia tecidual mediada por HIF.

A deficiência de vitamina D atenuou a expressão de 1.668 genes, tendo maior influência sobre 20 genes específicos. Entre eles: FRA1, EPO, maestro, RGD1564491, TSC22, cortactina, CYP2b15, IGFBP3. O gene Fos-like antígeno 1 (Fra1) pertence à família de fatores de transcrição AP-1, a qual contém domínios de zíper de leucina básica. Fra1 é um dos fatores de transcrição críticos para a diferenciação de osteoclastos e foi descrito recentemente que Fra1 era um ativador da formação de matriz óssea (Nishiwaki *et al.*, 2006). A cortactina (CCTNBP2) é um substrato de c-Src produzido por osteoclastos e conhecido por promover a união da proteína relacionada à actina (Arp 2/3) *in vitro* durante a formação da zona de selamento na superfície do tecido ósseo em reabsorção. A formação de um anel de filamentos de actina (zona de selamento) sobre a superfície óssea é necessária para um adequado processo de reabsorção óssea (Tehrani *et al.*, 2006). O gene RGD1564491 é um homólogo de rato do gene humano Fator de Von Willebrand (VWF) domínio A 5B2. O VWF está envolvido em variadas funções biológicas como ligação à integrinas durante a adesão celular na matriz extracelular (Takahashi *et al.*, 2000), ligação de colágeno durante a lesão celular endotelial, e ligação de fatores de coagulação (Sadler, 1998). O zíper de leucina induzido por glucocorticóide (GILZ or TSC22) foi recentemente reportado como um novo membro da família das proteínas do zíper de leucina e clone-22 estimulado pelo fator transformador de crescimento- β (Tsc-22) (Ayroldi *et al.*, 2002). O gene GILZ é capaz de inibir a expressão do receptor ativado de proliferador de peroxissomo γ -2 (PPAR γ -2) e bloquear a diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais (Ayroldi *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). O gene Maestro ou cDNA B29 é uma proteína integral da membrana e foi caracterizada como um membro específico da célula B da superfamília das imunoglobulinas. O gene B29 é expresso em todos os estágios de desenvolvimento da célula B e está relacionado a moléculas nas

células T envolvidas no reconhecimento celular e adesão (como CD4), sugerindo que esta molécula pode ser importante para as interações celulares durante a linfopoiese B (Hermanson *et al.*, 1988; Ishihara *et al.*, 1992). O gene CYP2b15 é um homólogo do rato para o gene de camundongo CYP2B19. Ambos são membros da família de citocromo monooxigenases; assim como o gene CYP2B12 que foi encontrado não apenas no fígado, mas também em glandulas sebáceas de pele de camundongo (Keeney *et al.*, 1998; Rencurel *et al.*, 2005). CYP2b15 e CYP2b19 foram encontrados na pele, em células supra-basais da epiderme e sebócitos da glândula prepudial (Keeney *et al.*, 1998). Até então, nenhum gene da família dos citocromos tinham sido identificados no tecido ósseo. No entanto, verificou-se que o gene CYP2B15 expressou-se no tecido ósseo peri-implantar e foi alterado pela deficiência de vitamina D. As proteínas da subfamília CYP2B metabolizam ácido aracdônico, constituinte normal das membranas celulares, assim como os precursores de lipídios biologicamente ativos, tais como: ácidos epoxieicosatrienóico (EET), ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE), leucotrienos, tromboxanas, e prostaglandinas (Keeney *et al.*, 1998). Os eicosanóides podem também funcionar na vasomodulação, metabolismo do colesterol (Baron *et al.*, 1997) e resolução da inflamação (Serhan *et al.*, 2008). Embora os genes IGFBP3, B29, FRA1, CTTNBP2, EPO, e CYP2b15 possam ser genes-chave para a osseointegração, as interações e papéis destes genes no tecido ósseo e peri-implantar ainda precisam ser investigados mais profundamente.

A clusterização hierárquica é um método de abordagem holística baseado no cálculo e comparação de coeficientes de correlação entre pares de expressão gênica de forma a organizar os genes de acordo com sua similaridade ou proximidade no padrão de expressão. A co-localização de genes em um mesmo cluster também representa genes que tenham uma co-regulação específica ou participem de uma função biológica similar (Eisen *et al.*, 1998). No entanto, os clusters que englobaram os transcritos IGFBP3, CYP2b15, FRA1, e EPO foram muito extensos para serem analisados em detalhes.

Conseqüentemente, não se pôde inferir nenhuma conclusão sobre uma possível co-regulação e função envolvendo os genes destes clusters extensos. Por outro lado, o gene Per2 foi encontrado em um cluster menor, o qual incluiu TSC22/GILZ, similar ao Maestro cDNA (B29), e RGD1564491 mRNA (similar ao Fator de Von Willebrand 5B). Portanto, a co-localização pode representar que estes genes sejam co-regulados e participem de mesma função biológica. O gene NPAS2 também foi encontrado em um cluster restrito e, surpreendentemente, estava co-localizado com genes relacionados à matriz extracelular cartilaginosa (col2a1, col10a1, e HPLP). Ambos Per2 e NPAS2 são genes reguladores do ritmo circadiano; e recentemente foram descritos como moduladores do metabolismo e remodelação óssea (Karsenty, 2002).

O presente estudo encontrou que a expressão dos genes participantes da formação de matriz óssea foi induzida pela inserção de implante; porém não foi significativamente alterada, mas apenas atenuada pela deficiência de vitamina D após duas semanas de cicatrização. Estes resultados concordam com os obtidos por Ogawa *et al.* (2002), em que os genes de colágenos tipo I e III, sialoproteína óssea II, osteonectina, osteocalcina, e integrinas β 1 e β 2 foram super-regulados *in vivo* pela inserção de implantes com superfície tratada por duplo ataque ácido, quando comparados ao reparo ósseo sem a presença de implantes (osteotomia). No entanto, Ogawa *et al.* (2002) encontraram que a expressão destes genes foi significativamente afetada pela deficiência de estrógeno após duas semanas de osseointegração, mas não após quatro semanas. Ogawa *et al.* (2002) verificaram que a deficiência de estrógeno afetou significativamente genes de matriz óssea após duas semanas de cicatrização, enquanto o presente estudo observou que a deficiência de vitamina D afetou genes de matriz cartilaginosa mais do que de matriz óssea. Sendo assim, sugere-se que as deficiências de vitamina D e de estrógeno afetaram a osseointegração de maneiras diferentes. Estudos que abordem a influência da deficiência de estrógeno na expressão de genes de matriz cartilaginosa são necessários para se confirmar esta hipótese.

Para analisar o efeito da vitamina D na expressão gênica durante a osseointegração de implantes *in vitro*, a expressão de alguns genes relacionado à matriz óssea e cartilaginosa e ao controle do metabolismo ósseo foi obtida por RTPCR através da cultura de células mesenquimais precursoras de medula óssea foram cultivadas na presença e ausência de discos de titânio e vitamina D. As hipóteses a serem confirmadas eram: a superfície de titânio de um implante e a vitamina D são capazes de alterar as expressões de genes relacionados ao metabolismo ósseo *in vitro*. Os resultados demonstraram que a expressão do gene do colágeno 1 (col1a2) foi bloqueada pelo efeito do titânio (T) em fase precoce de cultura (d1) ou da interação (I) entre titânio e vitamina D em fase tardia (d7 e d14). Assim, verificou-se que a vitamina D e o titânio não foram capazes de induzirem a expressão de col1a2. O gene codificador de osteocalcina teve sua expressão reduzida quando da presença de titânio ou vitamina D. No entanto, ao analisar a interação dos efeitos, verificou-se existir um efeito de sinergismo entre a vitamina D e o titânio durante a modulação deste gene, onde o titânio reduziu a expressão da osteocalcina no terceiro dia, mas a presença da vitamina D potencializou esta redução. E ao 14º dia, a vitamina D reduziu a osteocalcina independente da existência do titânio. O fato destes dois genes terem sua expressão bloqueada pela vitamina D ou pelo titânio pode estar relacionado a um atraso no processo de deposição de matriz óssea, promovido pelo titânio ou ao estágio inicial de cultura das células mesenquimais utilizadas. O bloqueio da expressão do gene RUNX2 relacionou-se ao efeito da vitamina D nos dias 7 e 14 de cultura. Estes resultados sugerem que o implante e a vitamina D, separadamente ou em interação, podem promover atraso ou bloqueio na expressão de colágeno tipo I, osteocalcina e RUNX2 em células mesenquimais em diferenciação. Sugere-se que outros fatores devem estar associados ao titânio e vitamina D durante a osteoblastogênese e início da deposição de matriz óssea durante a osteogênese de contato. Ainda, o bloqueio destes genes relacionados à matriz óssea pode ter ocorrido devido à possível resposta diferencial de células estágios iniciais de crescimento ao titânio e vitamina D. Owen *et al.* (1991)

observaram redução na expressão de colágeno tipo 1 em células mesenquimais em estágios iniciais de crescimento.

Verificou-se que o efeito da interação entre titânio e vitamina D foi sinérgico para a indução da expressão do gene da osteopontina no primeiro e sétimo dias de cultura. Ao 14º dia, a expressão da osteopontina é aumentada pelo efeito do titânio. Assim, observou-se que o titânio é capaz de induzir a expressão da osteopontina em fase inicial (d1) e tardia (d7 e d14), e que a vitamina D parece ser um fator intensificador de sua expressão. Para a osteonectina, similar efeito foi observado. O titânio e a vitamina D separadamente aumentaram a sua expressão. A partir do 3º dia, há a interação sinérgica entre o titânio e a vitamina D para a modulação da osteonectina, bloqueando sua expressão nos dias d3 e d14, mas induzindo seu aumento no sétimo dia de cultura.

A ocorrência principal quando da inserção de um implante de titânio no tecido ósseo é a capacidade do titânio de induzir o recrutamento e atrair a migração de células mesenquimais em diferenciação inicial, caracterizando à osteocondução que leva ao processo de osteogênese de contato sobre a superfície do implante. O uso de células precursoras mesenquimais derivadas de medula óssea justifica-se na tentativa de simulação *in vitro* do efeito do titânio na indução da expressão gênica durante os períodos iniciais de cicatrização peri-implantar. Da mesma maneira, investigou-se a influência da vitamina D na modulação da expressão gênica nesta fase inicial, caracterizada pela osteocondução. Sugere-se que a vitamina D pode exercer um papel importante nas fases iniciais de osseointegração através da potencialização dos efeitos da superfície de titânio na expressão de genes da osteopontina e osteonectina, para a formação de novo osso e da linha de interface entre osso e implante.

Surpreendentemente, os resultados do experimento *in vitro* confirmaram que col10a1 e col2a1 foram induzidos pelo titânio, especialmente em fase precoce (primeiro dia de cultura). Embora o col2a1 seja predominante em

matriz cartilaginosa, também pode ser encontrado em matriz óssea. Ogawa *et al.* (2002) e Ogawa & Nishimura (2003) descreveram a indução do colágeno tipo II durante a osseointegração. No entanto, o presente estudo foi o primeiro a detectar a super-expressão de colágeno tipo X na cicatrização ao redor de implantes. Verificou-se também a inibição da expressão de SOX9 até o terceiro dia da osseointegração. *In vitro*, o efeito do implante em induzir os colágenos tipo II e X parece ser dependente da inibição de SOX9 e mediado pela vitamina D através de um efeito de interação sinérgica. Este fato sugere novamente a possível importância destes dois tipos de colágeno na osseointegração e da participação da vitamina D neste processo, particularmente na fase inicial de indução de células mesenquimais durante a osteogênese de contato e formação da interface entre osso e implante. A ocorrência da codificação do gene col10a1 na região peri-implantar não foi foco do presente estudo e, portanto, experimentos que confirmassem a presença da proteína do col10a1 *in vivo* são necessários. Além disso, futuras investigações devem ser incentivadas para se determinar a possível função do colágeno tipo X na osseointegração. O presente estudo verificou que células precursoras de medula óssea fêmural foram capazes de produzir col10a1 e col2a1 quando induzidas pelo titânio, embora não tivessem sofrido diferenciação condrogênica. Ainda, col10a1 e col2a1 foram os genes mais alterados pelo titânio *in vitro* em comparação com os genes de matriz óssea.

Dentro das limitações deste estudo, o grupo que recebeu implantes e era deficiente de vitamina D mostrou super-expressão de genes de matriz extracelular cartilaginosa e óssea *in vitro*. Surpreendentemente, os genes de matriz óssea selecionados para análise não foram significativamente afetados pela deficiência de vitamina D como os genes de matriz cartilaginosa. Os genes col2a1 e col10a1 foram os mais afetados pela deficiência de vitamina D entre os genes de matriz cartilaginosa nos experimentos *in vivo* e *in vitro*. A partir destes resultados, sugere-se que o col10a1 e col2a1 possam representar genes-chave do processo inicial de osseointegração.

Ainda, deve-se considerar o presente estudo limitou-se ao modelo animal envolvendo a inserção de implantes em fêmur de ratos. Deve-se incentivar a realização de investigações futuras adicionais para que se estender estes resultados à osseointegração em seres humanos, além de se investigar possíveis alterações moleculares neste processo relacionadas a diferentes tipos de tecido ósseo do organismo.

Um dos desafios atuais da Implantodontia é reduzir o tempo de cicatrização de implantes. Sendo assim, estudos adicionais que investiguem o isolamento e caracterização de genes que possam ser modulados durante as fases da osseointegração podem representar uma estratégia valiosa para a otimização deste processo, especialmente quando da existência de condições sistêmicas desfavoráveis, como a deficiência de vitamina D.

7. CONCLUSÕES

Considerando as limitações do presente estudo, as seguintes conclusões foram traçadas:

a) A deficiência de vitamina D afetou os perfis de expressão gênica após duas semanas de osseointegração *in vivo*;

b) As expressões dos colágenos tipo II e X mostraram-se elevadas quando da presença de titânio (*in vivo* e *in vitro*), e reduzidas quando da deficiência de vitamina D (*in vivo*, mas não *in vitro*).

8. REFERÊNCIAS *

- Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52(2): 155-70.
- Alsaadi G, Quirynen M, Komarek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(7): 610-7.
- Alsaadi G, Quirynen M, Michiles K, Teughels W, Komarek A, van Steenberghe D. Impact of local and systemic factors on the incidence of failures up to abutment connection with modified surface oral implants. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(1): 51-7.
- Alvim-Pereira F, Montes CC, Mira MT, Trevilatto PC. Genetic susceptibility to dental implant failure: a critical review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008a; 23(3): 409-16.
- Alvim-Pereira F, Montes CC, Thome G, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of association of clinical aspects and vitamin D receptor gene polymorphism with dental implant loss. *Clin Oral Implants Res*. 2008b; 19(8): 786-95.
- Armas L, Heaney RP, Recker RR. Seasonal variation in bone histomorphometry. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(2):301.
- August M, Chung K, Chang Y, Glowacki J. Influence of estrogen status on endosseous implant osseointegration. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 59(11): 1285-9.

* De acordo com a norma utilizada na FOP/UNICAMP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A, Di Marco B, Marchetti C, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(22): 7929-41.
- Bain CA. Implant installation in the smoking patient. *Periodontol 2000.* 2003; 33: 185-93.
- Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1993; 8(6): 609-15.
- Bar-Shavit Z, Kahn AJ, Teitelbaum SL. Defective binding of macrophages to bone in rodent osteomalacia and vitamin D deficiency. *In vitro* evidence for a cellular defect and altered saccharides in the bone matrix. *J Clin Invest.* 1983; 72(2): 526-34.
- Baron A, Frieden M, Beny JL. Epoxyeicosatrienoic acids activate a high-conductance, Ca(2+)-dependent K⁺ channel on pig coronary artery endothelial cells. *J Physiol.* 1997; 504 (3): 537-43.
- Becker W, Hujuel PP, Becker BE, Willingham H. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. *J Periodontol.* 2000; 71(4): 625-31.
- Bhattoa HP, Bettembuk P, Ganacharya S, Balogh A. Prevalence and seasonal variation of hypovitaminosis D and its relationship to bone metabolism in community dwelling postmenopausal Hungarian women. *Osteoporos Int.* 2004; 15(6): 447-51.
- Branemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983; 50(3): 399-410.

- Branemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*. 1983; 4(1): 25-8.
- Broadus AE, Insogna KL, Lang R, Ellison AF, Dreyer BE. Evidence for disordered control of 1,25-dihydroxyvitamin D production in absorptive hypercalciuria. *N Engl J Med*. 1984; 311(2): 73-80.
- Buser D, Weber HP, Bragger U, Balsiger C. Tissue integration of one-stage ITI implants: 3-year results of a longitudinal study with Hollow-Cylinder and Hollow-Screw implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1991; 6(4): 405-12.
- Campos MI, Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early implant failure in non-smoking patients. *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16(2): 194-201.
- Carinci F, Pezzetti F, Volinia S, Francioso F, Arcelli D, Marchesini J *et al*. Analysis of MG63 osteoblastic-cell response to a new nanoporous implant surface by means of a microarray technology. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(2): 180-6.
- Carinci F, Pezzetti F, Volinia S, Francioso F, Arcelli D, Marchesini J *et al*. Analysis of osteoblast-like MG63 cells' response to a rough implant surface by means of DNA microarray. *J Oral Implantol*. 2003; 29(5): 215-20.
- Cohen AJ, Lassoova L, Golden EB, Niu Z, Adams SL. Retinoids directly activate the collagen X promoter in prehypertrophic chondrocytes through a distal retinoic acid response element. *J Cell Biochem*. 2006; 99(1): 269-78.
- Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993; 8(2): 137-44.

- Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003; 67(8): 932-49.
- Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005; 16(7): 713-6.
- Degidi M, Piattelli A. Immediately loaded bar-connected implants with an anodized surface inserted in the anterior mandible in a patient treated with diphosphonates for osteoporosis: a case report with a 12-month follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2003; 5(4): 269-72.
- Den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium.* 2003; 33(5-6): 497-507.
- Devlin B, Roeder K, Wasserman L. False discovery or missed discovery? *Heredity.* 2003 Dec; 91(6): 537-8.
- Dudoit S, Fridlyand J. A prediction-based resampling method for estimating the number of clusters in a dataset. *Genome Biol.* 2002; 3(7):36.
- Eder A, Watzek G. Treatment of a patient with severe osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14(4): 587-90.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(25): 14863-8.
- Erdogan O, Shafer DM, Taxel P, Freilich MA. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(6): 1-13.

- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci.* 1998a; 106(1): 527-51.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998b; 106(3): 721-64.
- Farach-Carson MC, Xu Y. Microarray detection of gene expression changes induced by 1,25(OH)(2)D(3) and a Ca(2+) influx-activating analog in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Steroids.* 2002; 67(6): 467-70.
- Farias, FAB. Prevalência de osteoporose, fraturas vertebrais, ingestão de cálcio, e deficiência de vitamina d em mulheres na pós-menopausa [tese]. Recife: FIOCRUZ - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; 2003.
- Fardellone P, Sebert JL, Garabedian M, Bellony R, Maamer M, Agbomson F *et al.* Prevalence and biological consequences of vitamin D deficiency in elderly institutionalized subjects. *Rev Rhum Engl Ed.* 1995; 62(9): 576-81.
- Fleet JC, Gliniak C, Zhang Z, Xue Y, Smith KB, McCreedy R *et al.* Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice. *J Nutr.* 2008; 138(6): 1114-20.
- Franchi M, Fini M, Martini D, Orsini E, Leonardi L, Ruggeri A *et al.* Biological fixation of endosseous implants. *Micron.* 2005; 36(7-8): 665-71.
- Franchi M, Orsini E, Trire A, Quaranta M, Martini D, Piccari GG *et al.* Osteogenesis and morphology of the peri-implant bone facing dental implants. *ScientificWorldJournal.* 2004; 4: 1083-95.

- Friberg B. Treatment with dental implants in patients with severe osteoporosis: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994; 14(4): 348-53.
- Friberg B, Ekestubbe A, Mellstrom D, Sennerby L. Branemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001; 3(1): 50-6.
- Fujimoto T, Niimi A, Nakai H, Ueda M. Osseointegrated implants in a patient with osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11(4): 539-42.
- Gannage-Yared MH, Tohme A, Halaby G. [Hypovitaminosis D: a major worldwide public health problem]. *Presse Med*. 2001; 30(13): 653-8.
- Grizon F, Aguado E, Hure G, Basle MF, Chappard D. Enhanced bone integration of implants with increased surface roughness: a long term study in the sheep. *J Dent*. 2002; 30(5-6): 195-203.
- Harris SS, Soteriades E, Coolidge JA, Mudgal S, Dawson-Hughes B. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in a low income, multiracial, elderly population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(11): 4125-30.
- Heaney RP. Long-latency deficiency disease: insights from calcium and vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2003; 78(5): 912-9.
- Heaney RP, Weaver CM. Calcium and vitamin D. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003; 32(1): 181-94.
- Hermanson GG, Eisenberg D, Kincade PW, Wall R. B29: a member of the immunoglobulin gene superfamily exclusively expressed on beta-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85(18): 6890-4.

- Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med.* 1990; 9(7): 811-8.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Molecular mechanism of active Ca²⁺ reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol.* 2002; 64: 529-49.
- Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ *et al.* Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 23(5): 905-10.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80(Suppl 6): 1678S-88S.
- Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res.* 2007; 22(Suppl 2): V28-33.
- Hwang D, Wang HL. Medical contraindications to implant therapy: Part II: Relative contraindications. *Implant Dent.* 2007; 16(1): 13-23.
- Hypponen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. *Diabetes.* 2008; 57(2): 298-305.
- Ishihara K, Wood WJ, Jr., Damore M, Hermanson GG, Wall R, Kincade PW. B29 gene products complex with immunoglobulins on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(2): 633-7.
- Jesudason D, Need AG, Horowitz M, O'Loughlin PD, Morris HA, Nordin BE. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency. *Bone.* 2002; 31(5): 626-30.

- Karsenty G. [Central control of bone formation]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2002; 63(2): 145-53.
- Keeney DS, Skinner C, Wei S, Friedberg T, Waterman MR. A keratinocyte-specific epoxygenase, CYP2B12, metabolizes arachidonic acid with unusual selectivity, producing a single major epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem*. 1998; 273(15): 9279-84.
- Kelly J, Lin A, Wang CJ, Park S, Nishimura I. Vitamin D and bone physiology: Demonstration of vitamin D deficiency in an implant osseointegration rat model. *J Prosthodont*; *no prelo* 2009.
- Kojima N, Ozawa S, Miyata Y, Hasegawa H, Tanaka Y, Ogawa T. High-throughput gene expression analysis in bone healing around titanium implants by DNA microarray. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(2): 173-81.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T *et al*. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998; 93(2): 165-76.
- LeGeros RZ, Craig RG. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *J Bone Miner Res*. 1993; 8 (Suppl 2): S583-96.
- Lekholm U. Immediate/early loading of oral implants in compromised patients. *Periodontol 2000*. 2003; 33: 194-203.
- Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. *Bioessays*. 2004; 26(1): 21-8.
- Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(11): 1668-71.

- Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001; 22(4): 477-501.
- Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006; 92(1): 4-8.
- Lips P, Duong T, Oleksik A, Black D, Cummings S, Cox D *et al.* A global study of vitamin D status and parathyroid function in postmenopausal women with osteoporosis: baseline data from the multiple outcomes of raloxifene evaluation clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(3): 1212-21.
- Masuda T, Salvi GE, Offenbacher S, Felton DA, Cooper LF. Cell and matrix reactions at titanium implants in surgically prepared rat tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997; 12(4): 472-85.
- Meier C, Woitge HW, Witte K, Lemmer B, Seibel MJ. Supplementation with oral vitamin D3 and calcium during winter prevents seasonal bone loss: a randomized controlled open-label prospective trial. *J Bone Miner Res.* 2004; 19(8): 1221-30.
- Minsk L, Polson AM. Dental implant outcomes in postmenopausal women undergoing hormone replacement. *Compend Contin Educ Dent.* 1998; 19(9): 859-62, 64; 66.
- Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics.* 2008; 122(2): 398-417.
- Moro JR, Iwata M, von Andriano UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(9): 685-98.

- Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20(4): 569-77.
- Need AG, Horowitz M, Morris HA, Moore R, Nordin C. Seasonal change in osteoid thickness and mineralization lag time in ambulant patients. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(5): 757-61.
- Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Horowitz M, Nordin BE. The effects of age and other variables on serum parathyroid hormone in postmenopausal women attending an osteoporosis center. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89(4): 1646-9.
- Nishiwaki T, Yamaguchi T, Zhao C, Amano H, Hankenson KD, Bornstein P *et al*. Reduced expression of thrombospondins and craniofacial dysmorphism in mice overexpressing Fra1. *J Bone Miner Res*. 2006; 21(4): 596-604.
- Ogawa T, Nishimura I. Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003; 18(2): 200-10.
- Ogawa T, Nishimura I. Genes differentially expressed in titanium implant healing. *J Dent Res*. 2006; 85(6): 566-70.
- Ogawa T, Sukotjo C, Nishimura I. Modulated bone matrix-related gene expression is associated with differences in interfacial strength of different implant surface roughness. *J Prosthodont*. 2002; 11(4): 241-7.
- Owen TA, Aronow MS, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB. Pleiotropic effects of vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of the bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure,

and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures. *Endocrinology*. 1991; 128(3): 1496-504.

Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD *et al*. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone*. 2002; 30(1): 137-43.

Pike JW, Meyer MB, Watanuki M, Kim S, Zella LA, Fretz JA *et al*. Perspectives on mechanisms of gene regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007a; 103(3-5): 389-95.

Pike JW, Zella LA, Meyer MB, Fretz JA, Kim S. Molecular actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on genes involved in calcium homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2007b; 22 (Suppl 2): V16-9.

Quirynen M, De Soete M, van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: a review of the literature. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13(1): 1-19.

Reginster JY. The high prevalence of inadequate serum vitamin D levels and implications for bone health. *Curr Med Res Opin*. 2005; 21(4): 579-86.

Reid IR, Gallagher DJ, Bosworth J. Prophylaxis against vitamin D deficiency in the elderly by regular sunlight exposure. *Age Ageing*. 1986; 15(1): 35-40.

Rencurel F, Stenhouse A, Hawley SA, Friedberg T, Hardie DG, Sutherland C *et al*. AMP-activated protein kinase mediates phenobarbital induction of CYP2B gene expression in hepatocytes and a newly derived human hepatoma cell line. *J Biol Chem*. 2005; 280(6): 4367-73.

- Romagnoli E, Caravella P, Scarnecchia L, Martinez P, Minisola S. Hypovitaminosis D in an Italian population of healthy subjects and hospitalized patients. *Br J Nutr.* 1999; 81(2): 133-7.
- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 395-424.
- Saggese G, Baroncelli GI. Hypophosphataemic rickets. *Horm Res* 2000; 53 (Suppl 3): 57-60.
- Sahota O, Munday MK, San P, Godber IM, Lawson N, Hosking DJ. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone: calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone.* 2004; 35(1): 312-9.
- Schwartz Z, Dean DD, Walton JK, Brooks BP, Boyan BD. Treatment of resting zone chondrocytes with 24,25-dihydroxyvitamin D3 [24,25-(OH)2D3] induces differentiation into a 1,25-(OH)2D3-responsive phenotype characteristic of growth zone chondrocytes. *Endocrinology.* 1995; 136(2): 402-11.
- Scully C, Hobkirk J, Dios PD. Dental endosseous implants in the medically compromised patient. *J Oral Rehabil.* 2007; 34(8): 590-9.
- Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(5): 349-61.
- Shi X, Shi W, Li Q, Song B, Wan M, Bai S *et al.* A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep.* 2003; 4(4): 374-80.

- Shibli JA, Grande PA, d'Avila S, Iezzi G, Piattelli A. Evaluation of human bone around a dental implant retrieved from a subject with osteoporosis. *Gen Dent.* 2008; 56(1): 64-7.
- Slaets E, Carmeliet G, Naert I, Duyck J. Early trabecular bone healing around titanium implants: a histologic study in rabbits. *J Periodontol.* 2007; 78(3): 510-7.
- Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000; 21(5): 457-87.
- Smith RA, Berger R, Dodson TB. Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992; 7(3): 367-72.
- Sooy K, Sabbagh Y, Demay MB. Osteoblasts lacking the vitamin D receptor display enhanced osteogenic potential *in vitro*. *J Cell Biochem.* 2005; 94(1): 81-7.
- St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 225-30.
- Stafford P, Brun M. Three methods for optimization of cross-laboratory and cross-platform microarray expression data. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(10): 72.
- Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes FaNB, Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride.* 1 ed. Washington, D.C.: National Academies Press; 1997.
- Takahashi H, Isobe T, Horibe S, Takagi J, Yokosaki Y, Sheppard D *et al.* Tissue transglutaminase, coagulation factor XIII, and the pro-polypeptide of von

- Willebrand factor are all ligands for the integrins alpha 9, beta 1 and alpha 4. *J Biol Chem.* 2000; 275(31): 23589-95.
- Takeda S, Yoshizawa T, Nagai Y, Yamato H, Fukumoto S, Sekine K *et al.* Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology.* 1999; 140(2): 1005-8.
- Tehrani S, Faccio R, Chandrasekar I, Ross FP, Cooper JA. Cortactin has an essential and specific role in osteoclast actin assembly. *Mol Biol Cell.* 2006; 17(7): 2882-95.
- Tonetti MS, Schmid J. Pathogenesis of implant failure. *Periodontol 2000.* 1994; 4: 127-38.
- Van der Wielen RP, Lowik MR, van den Berg H, de Groot LC, Haller J, Moreiras O *et al.* Serum vitamin D concentrations among elderly people in Europe. *Lancet.* 1995; 346(8969): 207-10.
- Van Steenberghe D, Jacobs R, Desnyder M, Maffei G, Quirynen M. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13(6): 617-22.
- Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, Nagai Y *et al.* Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol.* 2005; 19(11): 2685-95.
- Wei C, Li J, Bumgarner RE. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics.* 2004; 5(1): 87.
- Wolpowitz D, Gilchrist BA. The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54(2): 301-17.

Yang N, Zhang W, Shi XM. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mediates glucocorticoid action and inhibits inflammatory cytokine-induced COX-2 expression. *J Cell Biochem.* 2008; 103(6): 1760-71.

Zahurak M, Parmigiani G, Yu W, Scharpf RB, Berman D, Schaeffer E *et al.* Pre-processing Agilent microarray data. *BMC Bioinformatics.* 2007; 8: 142.

Zhang W, Yang N, Shi XM. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem.* 2008; 283(8): 4723-9.

9. APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela 4: Lista de 50 genes que apresentaram maiores graus de indução de expressão quando da inserção de implante.

	Indução ≥ 3,0
	1,5 ≤ Indução < 3,0

SÍMBOLO	GENES	ID	EXP
	C1qtnf3	C1q e proteína 3 relacionada ao fator de necrose tumoral	AW917132
	Mmp3	Metalopeptidase de matriz 3	NM_133523
	C1qtnf3	C1q e proteína 3 relacionada ao fator de necrose tumoral	XM_226833
	Tnmd	Tenomodulina	NM_022290
	Aspn	Asporina	NM_001014008
	-	Similar à proteína 2 específica de interrupção do ciclo celular	XM_574454
	-	Locus de transcrição	AA818342
	Lect1	Quimiotaxina derivada de célula leucocitária 1	NM_030854
	Il1r1	Interleukin 1 receptor-like 1	NM_013037
	Col10a1	Colágeno, tipo X, alfa 1	XM_001053056
	-	Proteína da camada intermediária de cartilagem, nucleotídeo pirofosfohidrolase (predicted)	XM_236348
	Slc38a4	Carregador de soluto, família 38, membro 4	NM_130748
	Ccl7	Quemoquina(C-C motif) ligante 7	NM_001007612
	-	HPL1_RAT (P03994) Precursor da proteína 1 da proteína de ligação de hialurano e proteoglicano	TC553366
	Meox2	Homeobox 2	NM_017149
	Fmod	Fibromodulina	NM_080698
	-	Carboxipeptidase X 2 (família M14) (predicted) (Cpxm2_predicted)	XM_215106
	-	Locus de transcrição	CB327622
	Msln	Mesotelina	NM_031658
	-	Tolóide-like 1 (predicted) (Tll1_predicted)	XM_001073797
	Itm2a	Proteína integral de membrana 2A	NM_001025712
	-	Locus de transcrição	BF563262
	Ccl22	Quemoquina (C-C motif) ligante 22	NM_057203
	Mmp12	Metalopeptidase de matriz 12	NM_053963
	Gpr64	Receptor acoplado à proteína G 64	NM_181366
	Col2a1	Colágeno, tipo II, alfa 1	NM_012929
	Hapln1	Proteína de ligação de hialurano e proteoglicano 1	NM_019189
	Nov	Gene super-expresso em nefroblastoma	NM_030868
	-	Similar à metaloprotease/disintegrina ADAM33 (LOC311425) de <i>Rattus norvegicus</i>	XM_230607
	-	Similar à proteína hipotética B230314O19 (predicted) (RGD1308013_predicted)	XM_342658
	RGD1307396	Similar ao cDNA RIKEN 6330406115	XM_341029
	Acan	Agrecan	NM_022190
	-	CDNA clone IMAGE:7461928	BC099104
	Comp	Proteína oligomérica de matriz de cartilagem	NM_012834
	Thbs2	Trombospondina 2	BF559836
	-	Similar à proteína integral de membrana 2A (LOC299698)	-
	Col14a1	Colágeno, tipo XIV, alfa 1	XM_235308
	RGD1307396	Similar ao RIKEN cDNA 6330406115	AW916327
	-	Desconhecido	TC556391
	-	Relacionado a homeobox pareado 2 (predicted) (Prrx2_predicted)	XM_238327
	Dcn	Decorina	AI639233
	Thbs2	Trombospondina 2	XM_214778
	Ccl2	Quemoquina (C-C motif) ligante 2	NM_031530
	-	Procolágeno, tipo IX, alfa 2 (predicted) (Col9a2_predicted)	XM_342903
	Olfml1	Olfactomedina-like 1	NM_001013192
	Ccl2	Quemoquina (C-C motif) ligante 2	NM_031530
	-	Similar à proteína C20orf158 (predicted) (RGD1305899_predicted)	XM_001058977
	-	Similar à SERTA contendo domínio 4 (predicted) (RGD1565408_predicted)	XM_341174
	-	Desconhecido	TC527726
	Serpine1	Inibidor de serina (ou cisteína) peptidase, classe E, membro 1	NM_012620

APÊNDICE 2

Tabela 5: Lista de 50 genes que apresentaram maiores graus de supressão de expressão quando da inserção de implante.

 $-1,5 \leq \text{Supressão} < -3,0$
 $-1,0 \leq \text{Supressão} < -1,5$

SÍMBOLO	GENES	ID
-	Metaloproteinase de matriz 27 (predicted) (Mmp27_predicted)	XM_235795
-	Clone 8C12 anticorpo Ig monoclonal específico do receptor de complemento-1	AF220557
-	UPPS_RICCN (Q92130) Undecaprenil pirofosfato sintetase (UPP sintetase)	TC542557
-	Desconhecido	-
Naip2	Família NLR, proteína inibitória de apoptose 2	XM_226742
-	Similar à multimerina 1 (LOC500152)	XM_001065496
Brs3	Receptor de Bombesina-like 3	NM_152845
-	Similar à proteína KIAA1409 (predicted) (RGD1311117_predicted)	XM_001067752
LOC691966	Similar à sulfito:quinona oxidoreductase, precursor mitocondrial	AI013361
-	Peroxidase de eosinófilo (predicted) (Epx_predicted)	XM_220834
S100a8	S100 proteína de ligação de cálcio A8 (calgranulina A)	CA507495
Camp	Peptídeo antimicrobiano Catelicidina	CB577971
Cbln2	Proteína precursora de Cerebelina 2	AA817812
Np4	Precursor de Defensina NP-4	NM_173299
-	Miosina, polipeptídeo leve 7, regulatório (predicted) (Myl7_predicted)	XM_214074
-	Locus de transcrição	DV714667
-	RNU50356 pseudogene de defensina de neutrófilos, parcial	U50356
LOC690020	Similar ao receptor lectna-like da célula NK, subfamília A, membro 17	BF556412
-	Similar ao cDNA RIKEN 4921530L21 (RGD1306441)	XM_224432
Ifitm6	Proteína 6 transmembrana induzida por Interferon	AI547707
Ifitm6	Proteína 6 transmembrana induzida por Interferon	XM_219476
Sit1	Adaptador transmembrana indutor de supressão 1	AW532179
Anxa3	Anexina A3	AI146189
Ugt8a	UDP galactosiltransferase 8A	AI228110
-	Fosfodiesterase 6C, cGMP específica, cone, alfa prime (predicted) (Pde6c)	XM_342046
-	Q89UJ4 (Q89UJ4) 3-desoxi-mano-octulosonato citidililtransferase, parcial	TC557534
F5	Fator de coagulação V	AI555052
-	Desconhecido	-
-	Grancalcina (predicted) (Gca_predicted)	XM_229977
-	Grânulo-proteína de neutrófilo (predicted) (Ngp_predicted)	XM_236646
Degs2	Homólogo ao espermatócito degenerativo 2 (Drosophila), lipídeo desaturase	NM_001017457
-	Proteína de reconhecimento de peptidoglicano 4 (predicted) (Pglyrp4_predicted)	XM_227383
-	Similar ao receptor de formil-peptídeo, sequência relacionada 2 (LOC681693)	XM_001057995
-	Desconhecido	TC528633
Gca	Grancalcina	DV721491
Trem1	Receptor gatilho expresso em células mielóide-like 1	XM_576511
-	Locus de transcrição	BF558337
-	Desconhecido	TC562529
Orm1	Orosomucóide 1	NM_053288
-	Catepsina G (predicted) (Ctsg_predicted)	XM_214205
Pou2af1	Domínio POU, classe 2, fator de associação 1	AA924297
Tacstd2	Tradutor de sinais de cálcio associado a tumor 2	NM_001009540
-	Locus de transcrição	BI395539
-	Inibidor de serina (ou cisteína) peptidase, classe B (ovalbumin), membro 11 (predicted) (Serpnb11)	XM_222495
Rag1	Gene ativador de recombinação 1	XM_230375
Ldnc	Lactato desidrogenase C	NM_017266
Ppbb	Proteína básica pró-plaqueta	NM_153721
Cd177	Antígeno CD177	XM_574390
Gp5	Glicoproteína 5, plaqueta	NM_012795
-	Locus de transcrição, similar a XP_001160384.1 PREDICTED: isoforma piccolo 1	CB545206
Clec1b	Domínio de lectina tipo C, família 1, membro b	XM_575687

10. ANEXOS

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal *



APPROVAL NOTICE

OFFICE FOR PROTECTION OF RESEARCH SUBJECTS
Chancellor's Animal Research Committee
1100U Kinross Avenue, Suite 100
169-07
Phone: (310) 206-6308
Email: arc@opr.ucla.edu
Website: <http://www.opr.ucla.edu/animal>

June 6, 2008

Ichiro Nishimura, D.D.S., D.M.Sc., D.M.D. (Principal Investigator)
DENTISTRY
B3-081 CHS
Mailcode: 166815

SUBJECT: ARC # 1997-136-33
(Approval Period from 6/5/2008 through 6/4/2009)
Bone Generation and Regeneration

The UCLA Institutional Animal Care and Use Committee, known as the Chancellor's Animal Research Committee (ARC), has approved your above-referenced protocol. The ARC understands that you will receive approval from all associated departments and/or Committees (e.g., Institutional Biosafety Committee, Human Embryonic Stem Cell Research Oversight [ESCRO] Committee) prior to undertaking relevant experiments.

In accordance with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (PHS Policy) IV.C.5 and USDA Animal Welfare Act Regulations (AWARs) §2.31(d)(5), the ARC is required to conduct continuing review of each previously approved animal research application, including an annual review and a complete *de novo* review no less than every 3 years. Continuation of animal activities beyond the maximum approval period without such review would be a violation of the USDA AWARs, PHS Policy, and the terms and conditions of NIH grants; therefore, if a lapse in approval occurs, investigators must cease conducting experiments until a new approval is received. Please note that NO exceptions or extensions to protocol approval can be granted.

The approval of this protocol is limited to the animal model(s) and procedures described in the application. If you require any modifications or additions to this protocol, you must obtain prior approval from the ARC before initiating such changes. The approval of your project includes:

ANIMAL SUBJECTS

The total number of animals, by species, approved for this protocol is:

Mouse (1000)
Rat (721)

* Os procedimentos deste trabalho utilizando animais foram realizados na Universidade da Califórnia de Los Angeles (UCLA, Los Angeles, Califórnia, EUA), sendo aprovados pelo respectivo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (ARC – Chancellor's Animal Research Committee, UCLA Institutional Animal Care and Use Committee), de acordo com a legislação vigente constante no "Animal Welfare Act" e "PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals".

Page 2

APPROVAL NOTICE

PI: Ichiro Nishimura, D.D.S. DMSc, D.M.D.

ARC # 1997-136-33

*This number does not take into account the number of animals you have used.

FUNDING

According to the information provided in your application, the funding source(s) for this research project may include the following:

Funding Type: Department, Extramural, Academic Senate

Agency Name: NIH/NATIONAL INSTITUTE OF DENTAL AND CRANIOFACIAL RESEARCH

PI of Contract/Grant: Ichiro Nishimura

Contract/Grant Title: The role of vitamin D insufficiency in ONJ

Contract/Grant No: 1R01DE018704

Agency Name: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, LOS ANGELES (AKA UCLA)

PI of Contract/Grant: Ichiro Nishimura

Contract/Grant Title: Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw (ONJ): Mechanistic role of helper T cell type-1 (Th-1) osteoimmunology induced by vitamin D insufficiency

Contract/Grant No:

Agency Name: UNIVERSITY OF CALIFORNIA, LOS ANGELES (AKA UCLA)

PI of Contract/Grant: Ichiro Nishimura

Contract/Grant Title: The role of vitamin D insufficiency in osteonecrosis of the jaw following bisphosphonate therapy

Contract/Grant No:

Agency Name: NIH/NATIONAL INSTITUTE OF DENTAL AND CRANIOFACIAL RESEARCH

PI of Contract/Grant: Ichiro Nishimura

Contract/Grant Title: Bio-Functionalized Ti implants via nanotechnology

Contract/Grant No: 2R44DE014927-02

Agency Name: NIH/NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES

PI of Contract/Grant: Ichiro Nishimura

Contract/Grant Title: UCLA Center for Biological Radioprotectors (U19 PI: McBride): Seed

Grant: Bio-radioprotectors for Mesenchymal Stem Cells under Radiation Exposure (PI: Ichiro Nishimura)

Contract/Grant No: U19 AI 67769

Page 3

APPROVAL NOTICE

PI: Ichiro Nishimura, D.D.S., D.M.Sc., D.M.D.

ARC # 1997-136 33

ANIMAL WELFARE ASSURANCE AND ACCREDITATION AT UCLA

UCLA's Animal Welfare Assurance number with the Department of Health and Human Services is A3196-01 (expiration date 7/31/2010). UCLA's animal care and use program is fully accredited by the Association of Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC).



Approval Signature of the ARC Vice Chair