

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIR-34A INDUZIDA POR MINI-
IMPLANTE ORTODÔNTICO**

JENNIFER GUEDES SOBRAL

DISSERTAÇÃO

2023

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIR-34A INDUZIDA POR MINI-
IMPLANTE ORTODÔNTICO**

JENNIFER GUEDES SOBRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Clínica Odontológica).

Orientador(a):

Prof^a. Dra. Cláudia Maria Pereira

Prof^a.Dra. Daniele Dutra Voigt

Co-orientador (a):

Prof. Dr. Rodrigo Lopes Lima

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIR-34A INDUZIDA POR MINI-IMPLANTE ORTODÔNTICO

JENNIFER GUEDES SOBRAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Clínica Odontológica).

Aprovada em 29 de março de 2022

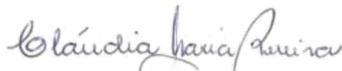
Banca examinadora



Prof. Dr. Jefferson da Rocha Tenório
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof^a. Dr^a. Sara Gemini Piperni
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Pereira
Universidade do Grande Rio/AFYA



Prof^a. Dr^a Danielle Dutra Voigt
Universidade do Grande Rio/AFYA



Prof. Dr. Rodrigo Lopes Lima (Coorientador)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvestre Jorganes Sobral e Enilda Guedes Sobral; A minha avó, América de Mendonça Guedes, a minha irmã Joyce Guedes Sobral e as minha crianças Aninha, Ayla (Lala) e Pedrinho. Sem o incentivo, amor e dedicação de vocês nada seria possível!

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como aluna de mestrado, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais Enilda e Silvestre, a minha avó América e irmã Joyce, pelo amor, apoio incondicional e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. As minhas crianças Ana, Pedro e Ayla por todo carinho, amor e cooperação para realização desta tese.

As minhas orientadoras a Prof.^a Dr.^a. Cláudia Maria Pereira e a Prof.^a Dr.^a. Daniele Dutra Voigt e ao meu orientador o Prof. Dr. Rodrigo Lopes Lima, pelo suporte, suas correções, incentivos e empenho dedicado à elaboração desta dissertação.

A instituição UNIGRANRIO representada pelo Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação Mestrado/Doutorado em Odontologia Prof. Dr. Flávio Rodrigues Ferreira Alves, por todo suporte e apoio ao longo de todo o trajeto de estudo até a obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Nunca tenha certeza de nada porque a sabedoria
começa com a dúvida.”

Sigmund Freud

RESUMO

A correção da má oclusão dentária na ortodontia é realizada pela utilização de aparelhos e mecanismos através dos quais grandes quantidades de força serão exercidas no osso alveolar e no ligamento periodontal. Os mini-implantes (MI) são considerados aparelhos de ancoragem aprimorados por permitirem a aplicação de força mais intensa do que os elásticos convencionais. Durante a aplicação de força ocorre a ativação de diversas vias moleculares importantes envolvidas no recrutamento de osteoclastos e osteoblastos. E essas vias podem ser moduladas pelo tipo de superfície do implante e pelos microRNAs, pequenos RNAs não- codificantes, como miR-34a.

Objetivos: O objetivo deste presente trabalho foi avaliar a expressão de miR-34a em amostras ósseas de coelhos que receberam MI de titânio com diferentes superfícies e na ausência/presença de carga.

Material e métodos: Neste presente estudo foram utilizados seis coelhos. Cada animal recebeu quatro MI ortodônticos: 2 MI do tipo porous inseridos na tíbia direita e 2 MI do tipo convencional na tíbia esquerda. Os MI proximais instalados em cada perna foram submetidos à força de 1N através de mola fechada de níquel titânio, enquanto os MI mais distais permaneceram sem carregamento. Após 14 dias, os MI foram extraídos juntamente com o osso subjacente, além de uma amostra de osso controle. O miR-34a foi avaliado nessas amostras por PCR em tempo real.

Resultados: As amostras que receberam o MI porous sem carga apresentaram um aumento significativo de expressão de miR-34a em comparação ao grupo controle ($p=0,002$). Já em comparação a esse grupo, as amostras que receberam o MI do tipo porous com carga apresentou uma menor expressão. Entretanto, apesar de reduzida, houve um aumento da expressão de miR-34a nesses MIs comparados ao grupo controle ($p=0,064$). As outras condições (MI convencionais) não apresentaram diferenças significativas na expressão de miR-34a quando comparada ao grupo controle, nem aos outros grupos.

Conclusão: Os dados obtidos nesse estudo sugerem que o MI tipo porous sem carga possivelmente favorecer o aumento da expressão de miR-34a e que movimentação ortodôntica parece reduzir a expressão de miR-34a nesse tipo de implante, pela ativação de alguma molécula inibidora deste miRNA durante esse processo. No entanto, para esclarecer a real função biológica de miR-34a nesse tipo de MI serão necessários experimentos adicionais.

Palavras-chave: mini-implante; miR-34a; movimentação ortodôntica.

ABSTRACT

The correction of dental malocclusion in orthodontics is carried out by the use of devices and mechanisms through which large amounts of force will be exerted on the alveolar bone and periodontal ligament. Mini-implants (MI) are considered improved anchorage devices because they allow the application of more intense force than conventional elastics. During the application of force, several important molecular pathways involved in the recruitment of osteoclasts and osteoblasts are activated. And these pathways can be modulated by the type of surface of the implant and by microRNAs, small non-coding RNAs, such as miR-34a.

Objectives: The objective of this present work was to evaluate the expression of miR-34a in bone samples from rabbits that received titanium IM with different surfaces and in the absence/presence of load.

Material and methods: In this present study, six male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) weighing approximately 3Kg were used. Each animal received four orthodontic MIs: 2 MIs of the porous type inserted in the right tibia and 2 MIs of the conventional type in the left tibia. The proximal MI installed on each leg were subjected to a force of 1N through a closed nickel-titanium spring, while the more distal MI remained unloaded. After 14 days, the MI were extracted along with the underlying bone, in addition to a control bone sample. miR-34a was evaluated in these samples by real-time PCR.

Results: Samples that received porous MI without load showed a significant increase in miR-34a expression compared to the control group ($p=0.002$). Compared to this group, the samples that received the MI of the porous type with load showed a lower expression. However, despite being reduced, there was a tendency towards an increase in miR-34a expression in these MIs compared to the control group ($p = 0.064$). The other conditions (conventional IM) did not show significant differences in miR-34a expression compared to the control group or the other groups.

Conclusion: The data obtained in this study seem to suggest that the unloaded porous MI possibly seems to favor the increase of miR-34a expression. Orthodontic movement seems to reduce the expression of miR-34a in this type of implant, perhaps due to the activation of some molecule that inhibits this miRNA during this process. However, to clarify the real biological role of miR-34a in this type of IM, additional experiments will be needed.

Keywords: mini-implant; miR-34a; orthodontic movement.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 Movimentação dentária - Força ortodôntica	4
1.2 A ancoragem na ortodontia	6
1.3 Tipos de mini-implantes na prática ortodôntica	9
1.4 Superfícies de mini-implantes (convencional x porous)	11
1.5 Osseointegração dos implantes ortodônticos	14
1.6 Epigenética, metabolismo ósseo e movimentação ortodôntica	16
1.7 MicroRNAs	21
1.8 miR-34a e o metabolismo ósseo	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Principal	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Descrição das amostras	29
4.2 Colocação dos implantes	31
4.3 Análises moleculares	33
4.3.1 Extração do RNA total e confecção do cDNA	33
4.3.2 Avaliação da expressão de miR-34a	35
4.4 Análise de Dados	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Análises moleculares	36
5.1.1 Extração e quantificação do RNA total das amostras	36
5.1.2 Avaliação da qualidade dos cDNAs	37
5.1.3 Resultado da expressão de miR-34a por PCR em tempo real nas amostras de coelho de acordo com o tipo de implante e tratamento	38
5.1.4 Comparação da expressão de miR-34a entre as amostras e grupos analisados	39
5.1.5 Avaliação da expressão de miR-34a em cada animal analisado	40
5.1.6 Avaliação da expressão de miR-34a entre os animais analisados	42
5.1.7 Avaliação da expressão de miR-34a entre os grupos de tratamento	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO I	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da regulação de RNAs não-codificante (ncRNAs) no remodelamento do periodonto durante a movimentação ortodôntica dentária.....	5
Figura 2	Intrusão de quatro dentes posteriores, com a utilização de dois mini-implantes por vestibular.....	8
Figura 3	Diagrama esquemático demonstrando o crosstalk entre as vias TGF β /BMP, Wnt, e NOTCH que levam à diferenciação osteogênica em superfícies de titânio modificadas.....	13
Figura 4	Participação ativa dos RNAs não-codificantes (ncRNAs) na proliferação celular, respostas inflamatórias, imunes e neurovasculares, autofagia e diferenciação durante a movimentação dentária ortodôntica (MDO).....	17
Figura 5	ncRNAs mecanossensíveis regulam a diferenciação inicial de osteoclastos e suas funções.....	18
Figura 6	Implicações clínicas baseadas em ncRNAs em movimentação ortodôntica.....	19
Figura 7	Biogênese de miRNAs.....	22
Figura 8	Regulação e vias envolvendo miR-34a.....	25
Figura 9	Mini-implantes instalados na tíbia do coelho.....	32
Figura 10	Análise da qualidade dos cDNAs das amostras de coelho.....	37
Figura 11	Análise global da expressão de miR-34a em diferentes tratamentos nos seis animais avaliados nesse estudo.....	40
Figura 12	Análise da expressão de miR34a em diferentes tratamentos individualmente nos seis animais avaliados.....	41
Figura 13	Avaliação da variação da expressão de miR-34a em diferentes tratamentos nos seis animais analisados.....	42
Figura 14	Comparação da expressão de miR-34a nos diferentes tratamentos realizados.....	43
Figura 15	Expressão de miR-34a em CD3 comparado com o grupo controle.....	43

LISTA DE TABELAS

QUADRO 1	Categorização das amostras de tíbia de acordo com o tipo de tratamento.....	30
TABELA 1	Quantificação do RNA total extraído das amostras de coelhos	36
TABELA 2	Valores de <i>Fold Change</i> para miR-34a nas amostras de coelho analisadas em relação aos seus controles	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

BMPs	Do inglês <i>bone morphogenetic proteins</i> (Proteínas Morfogenéticas do Osso)
cDNAs	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
KG	Quilograma
MÊS	Mínima tensão efetiva
MI	Mini-implante
miRNA	microRNA
MSCs	Do inglês <i>mesenchymal stem cell</i> (células tronco mesenquimais)
ncRNAs	Do inglês <i>non-coding RNAs</i> (RNAs não codificante)
NF- κ B	Fator nuclear kappa beta
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
RANK	Do inglês <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i> (Receptor ativador do fator nuclear kappa B)
RANKL	Do inglês <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i> (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B)
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
siRNA	RNA de interferência
TGF- β	Do inglês <i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TGIF2	Do inglês <i>Homeobox protein TGIF2</i> (Fator Induzido TGFB Homeobox 1)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A odontologia possui na ortodontia uma especialidade destinada à utilização de aparelhos e mecanismos de ação para correção de má oclusão dentária através das quantidades de força exercida no osso alveolar pelo ligamento. Essa força ortodôntica é qualificada de acordo com sua magnitude, direção e duração. Quando utilizada de forma correta podem ocasionar movimentação dentária de inclinação, rotação, extrusão, intrusão e torque. Entretanto, qualquer resultado ortodôntico necessita de resposta biológica tecidual que circunda o dente submetido a essas forças externas (KRISHNAM *et al.*, 2017, FERNANDES, 2009).

Para a ortodontia a necessidade da precisão do movimento dentário induzido para resultado satisfatório do tratamento ortodôntico proposto carece da capacidade assertiva de um mecanismo de resistência capaz de controlar e/ou regular o movimento dentário. Um dos mecanismos ortodônticos utilizados é a ancoragem; sua função está relacionada ao mecanismo de ação e reação, em que para toda ação é gerada uma resposta, reação, de igual intensidade, porém de direção oposta (OTAÑO, 2014).

Na movimentação dentária induzida é necessário o acompanhamento e conhecimento de toda estrutura dentária, do alvéolo dentário, que acomoda a raiz do dente, da articulação (gonfose) onde ocorrem os dois estímulos mecânicos simultaneamente de tensão e compressão do ligamento periodontal (KANZAKI *et al.*, 2019). Durante a movimentação ortodôntica, atenção deve ser dada na escolha do tipo de mini-implante utilizado durante a ancoragem. O tamanho, a superfície dos implantes/mini-implantes e o seu *design* são fatores de grande relevância para o sucesso da mecânica osso-implante (ZWEERS *et al.*, 2015; AKÇA *et al.*, 2003; XIE *et*

al., 2017; SCARANO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016). As modificações nas estruturas dos implantes como exposição a ácidos, jateamento convencional e utilização de pasta de fosfato de cálcio são tipos de tratamento dados a essas estruturas para melhorar a osseointegração do titânio (HARTJEN *et al.*, 2018; ITO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017; YAGI *et al.*, 2017; CAMPANELLI *et al.*, 2019; JAGGESSAR *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2018., YADAV *et al.*, 2017).

Nesse complexo sistema implante/osso diversas vias moleculares atuam por meio da ativação/inativação de importantes marcadores moleculares que estão envolvidos no recrutamento de osteoclastos e osteoblastos através do princípio de mecanotransdução celular (SOKO *et al.*, 2014; NETTELHOFF, 2016). Dentre essas vias, destaca-se uma via fundamental para o processo de reabsorção óssea mediada pelo emprego da força ortodôntica. Esta via está envolvida na formação e regulação dos osteoclastos por meio da ativação de um fator de transcrição chamado de Fator Nuclear Kappa β (RANK), o seu ligante (RANKL) e a Osteoprotegerina (OPG) (KANZAKI *et al.*, 2019; OSHIRO *et al.*, 2002).

Neste cenário, os mecanismos reguladores de expressão gênica possuem uma participação de destaque no processo de reabsorção radicular e na velocidade da reabsorção óssea (MASSARELLI, 2011). Como exemplo destes, os mecanismos epigenéticos participam da regulação da homeostase óssea. A epigenética é uma área voltada para o estudo de mecanismos envolvidos na regulação da expressão gênica (ESTELLER, 2008). Dentre os mecanismos epigenéticos, destacam-se os microRNAs (miRNAs), que são moléculas pequenas de RNA que não codificam proteínas, mas que possuem como principal característica/função a regulação pós- transcrricional (MOHR; MOTT, 2015).

Os miRNAs fazem parte do grupo de RNAs não codificantes que são altamente conservados e que exercem uma grande variedade de processos

fisiológicos (SLABÁKOVÁ et al., 2017). O miR-34a faz parte de uma família composta por três membros (miR-34a/b/c) e é codificado no segundo exon de um gene localizado no cromossomo 1p36.22 enquanto os demais compartilham um gene hospedeiro comum localizado no cromossomo 11q23.1 sendo que miR-34a é expresso na maioria dos tecidos em níveis mais altos comparado a miR-34b/c (ROKAVEC et al., 2014).

Os miRNAs possuem função regulatória quando se pareiam com seus RNAs mensageiros (mRNAs) alvos, regulando a expressão gênica por clivagem do mRNA quando o grau de complementaridade for próximo de 100% por meio da via dos RNAs de interferência (SiRNA) e/ou induzindo a repressão da tradução quando a complementaridade for imperfeita. Um mesmo miRNA pode regular diferentes mRNAs (RNAs mensageiros) e um mRNA podem ser regulados por diferentes miRNAs, uma vez que a complementaridade das fitas de mRNA alvo e do miRNA não é total na maior parte das células eucariontes (NAVEED *et al.*, 2017; LEWIS *et al.*, 2005).

Tendo em vista que os miRNAs participam de uma grande variedade de processos fisiológicos (proliferação celular, osteoclastogênese, osteogênese, apoptose e inflamação) e que a identificação dos mecanismos nos quais estas moléculas estão envolvidas podem contribuir para um tratamento ortodôntico mais seguro, preciso e personalizado (CHEN & ZHANG, 2023). Assim, este trabalho teve por intuito avaliar a expressão da expressão de miR-34a em amostras de tíbia de coelho que receberam mini-implantes ortodônticos de diferentes superfícies na ausência/presença de carga.

1.1 Movimentação dentária - Força ortodôntica

O movimento dentário ortodôntico ocorre através de estímulo mecânico originário de uma remodelação do osso alveolar e do ligamento periodontal. A remodelação óssea acontece através do processo de reabsorção óssea no local de pressão e a formação óssea no local de tensão (DAVIDOVITCH Z, 1991). No entanto, o mecanismo de movimentação ortodôntica é controlado pelas respostas biológicas do ligamento periodontal e pelo tamanho da força aplicada que são responsáveis por gerarem alterações ao redor do ligamento periodontal, isso ocorre devido a alteração no fluxo sanguíneo ocasionar a secreção de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias e metabólitos do ácido araquidônico (KRISHNAM & DAVIDOVITCH, 2006).

A movimentação dentária foi denominada inicialmente de movimento “dente” induzido. Porém, em determinadas situações, o tratamento ortodôntico pode realizar a movimentação dento-óssea induzida de forma convencional pela utilização de braquetes, fios e elásticos; ou pela utilização de mini-implantes e mini-placas, chamado de ancoragem aumentada (CONSOLARO *et al.*, 2022). Em ambos os tipos de tratamento, convencional e ancoragem aumentada, os fenômenos moleculares, celulares e teciduais são os mesmos, incluindo duração, intensidade de cada mecanismo e força. O que diferencia a ancoragem aumentada de um tratamento convencional é a sua capacidade de sincronidade nos mais variados pontos dos dentes e ossos, ou seja, ocorrem fenômenos em vários locais ao mesmo tempo (CONSOLARO *et al.*, 2022).

O movimento ortodôntico ocorre inicialmente da mesma maneira que o movimento natural (fisiológico) do sistema dentário, porém, como a força exercida pelos mecanismos ortodônticos são contínuas, o fluido intersticial que antes exercia resistência hidráulica no movimento dentário passa a drenar para os tecidos vizinhos

gerando assim uma pausa da pressão hidráulica que exerce o movimento (FERREIRA, 1997). Alguns efeitos desse movimento podem ser analisados precocemente, afetando células do osso alveolar, ligamento periodontal, matriz extracelular, osteoclastos, osteoblastos e granulócitos. Outras alterações incluem a liberação e síntese de fatores de crescimento, citocinas e fatores quimiotáticos (SPADARI *et al.*, 2017). Os RNAs não codificantes (ncRNAs) também participam no processo de movimentação ortodôntica dentária desde as fases iniciais (fases mecanossensorial e mecanotransdução) até as fases de catabolismo e anabolismo) (CHEN & ZHANG, 2023) (Figura 1):

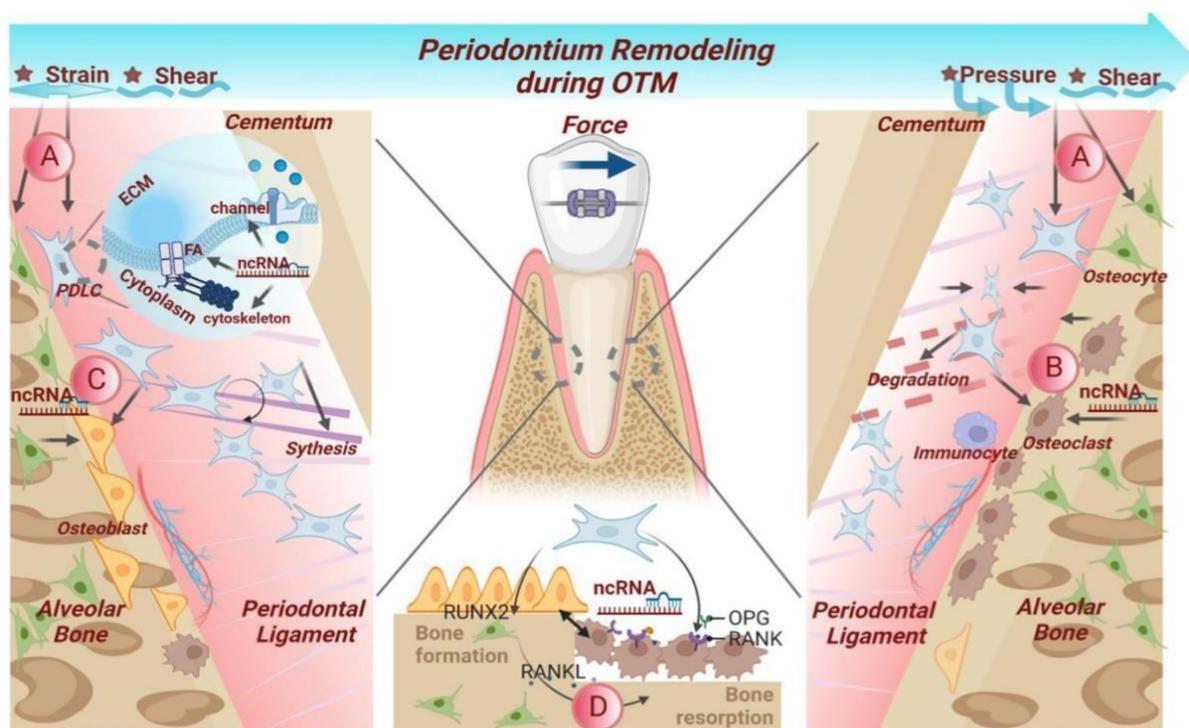


Figura 1: Representação esquemática da regulação de RNAs não-codificantes (ncRNAs) no remodelamento do periodonto durante a movimentação ortodôntica dentária. O tecido periodontal está localizado entre o cimento e o osso alveolar, é um tecido conjuntivo fibroso que contém neurovascularidade e uma variedade de células. **A** - Os ncRNAs contribuem para a sensibilidade e para a mecanotransdução de forças mecânicas aos osteócitos e células do ligamento periodontal (PDLs); **B**- Na fase catabólica os ncRNAs estão envolvidos na reabsorção óssea mediada por osteoclastos e degradação do periodonto por PDLs; **C**- Na fase anabólica subsequente, os ncRNAs regulam a expressão de osteoblastos e a síntese de fibras do ligamento periodontal; e **D**- ncRNAs são responsáveis por coordenar a delicada comunicação via citocinas ou contato celular. Legenda: MEC: Matriz extracelular; Fonte: Chen & Zhang (2023) adaptada

Em relação aos tipos de movimentos dentários, estes podem ser classificados como: i) Inclinação – força exercida sobre o corpo dentário que gera um deslocamento da raiz para o lado oposto a força aplicada; ii) - Translação – força distribuída uniformemente ao longo da superfície radicular; iii) Rotação – o elemento dentário gira sobre o seu longo eixo sob ação de um binário; iv) Verticalização - a coroa do elemento dentário permanece estático enquanto a ápice se desloca; v) Torque – a raiz dentária se desloca enquanto a coroa mantém-se fixa. Podendo ser torque anterior e torque posterior; vi) Extrusão – movimento no sentido da erupção dentária; e vii) Intrusão - movimento em que o dente é intruído. A força é concentrada em uma pequena área do ápice, logo essa força deverá ser leve para exercer uma pressão adequada no ligamento periodontal durante este movimento (KRISHNAM *et al.*, 2017, FERNANDES,2009).

Uma ressalva realizada por ortodontistas está relacionada aos aparelhos de ancoragem aprimorados, mini-implantes, usarem força mais pesada do que os tratamentos convencionais como os elásticos interdentais. A carga aplicada é maior que a carga convencional, porém é distribuída ao longo dos dentes e osso, sendo reduzido ao atingir os tecidos (CONSOLARO, 2014). Por isso, na utilização de mini-implantes e mini-placas ocorre reabsorção dentária menos intensa e em menor frequência que as observadas nos tratamentos convencionais (CONSOLARO & FURQUIM,2011; CONSOLARO, 2012; 2014;).

1.2 A ancoragem na ortodontia

Em meados da década de 1960, o estudo de Branemark sobre microcirculação sanguínea em tíbias de coelho, utilizando como material de apoio uma câmara de titânio, possibilitou a descoberta da integração do material metálico ao osso sem que ocorresse qualquer tipo de rejeição (Branemark, 1964). Após essa evidência foi

desenvolvida uma técnica que aplicava cilindros metálicos de níquel titânio para utilização em tíbias de coelhos e cães, após um período. Esta técnica foi aprimorada e tornou-se a responsável pela utilização de próteses fixas em região maxilar e mandibular em seres humanos. Essa descoberta recebeu o nome de osseointegração e está sendo aplicada pela odontologia mundial desde então. A osseointegração descrita por Brånemark *et al.* viabilizou a oportunidade do manuseio de implantes osseointegrados no procedimento de ancoragem por dentistas ortodontistas (BRÄNEMARK *et al.*, 1983). A osseointegração (união estável e funcional, entre o osso e uma superfície de titânio) é dependente de um sistema de adesão entre células tronco mesenquimais (MSCs) e um coágulo de sangue de fibrina e da população da superfície do implante, formando como resultado osteóide e sua subsequente mineralização (JAFFIN, BERMAN, 1991; BAIN, 1996).

Roberts *et al.* (1984) avaliaram a presença de implantes de titânio no fêmur de coelhos com idade entre três e seis meses. Após um período de um mês e meio a três meses de cicatrização, foi utilizado por quatro a oito semanas uma mola de aço entre implantes com uma força de 100 gramas. Os resultados expuseram a estabilidade do mecanismo de implantes durante aplicação de força, determinando a aplicabilidade desta técnica como forma de ancoragem ortodôntica. Posteriormente, Block e Hoffman (1995) relataram um novo sistema de ancoragem, constituído por um disco texturizado e coberto por hidroxiapatita de um lado, com encaixe interno do outro, que foi denominado *onplants*. Esse mecanismo foi inserido no palato e após a osseointegração foi conectado aos dentes como dispositivo de ancoragem. Esse estudo obteve como resultado a movimentação unilateral de dentes em direção aos *onplants* instalados em cães.

Um estudo realizado por Bousquet *et al.* (1996) consolidou a utilização de um pino de liga de titânio com 0,7 mm de diâmetro por 6 mm de comprimento, esta

utilização estabeleceu com êxito um primeiro molar permanente durante a fase de inclusão. Uma pesquisa realizada por Fávero *et al.* (2002) no ano de 1970 e 2000 verificou uma revisão ordenada de implantes. O estudo mencionou o formato de mini-implantes, biomecânica, cicatrização, tempo de ativação, material, tamanho, cirurgias, apresentação invasiva como microscopia de fluorescência e não invasivos como estabilidade e ausência de inflamação.

A introdução dos implantes na odontologia originou uma ancoragem sem a movimentação da unidade de reação, logo esse novo conceito de ancoragem na ortodontia ficou conhecido como ancoragem esquelética (BEZERA *et al.*, 2004; FRITZ *et al.*, 2004; MARASSI *et al.*, 2005). A necessidade pelo controle da ancoragem e a minimização e conformidade com o conteúdo levou ao desenvolvimento da mini ortodontia, através da utilização de implantes. Com a busca por um material de melhor manuseio e mais versátil para utilização na ortodontia foram desenvolvidos os mini-implantes (**Figura 2**) que por serem de pequeno tamanho, eles permitem uma melhor disposição em várias regiões da cavidade oral, evitando dessa forma possíveis injúrias ao tecido periodontal ao redor do implante diminuindo ou evitando o desconforto ao paciente (ROBERTS *et al.*, 1994; MARASSI *et al.*, 2004).



Figura 2: Intrusão de quatro dentes posteriores, com a utilização de dois mini-implantes por vestibular. Como não havia dentes antagonistas, o controle da inclinação no sentido vestibulo-lingual foi realizado com um segmento de fio colado na superfície oclusal destas unidades, acoplado a um mini-implante instalado por palatino (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os mini-implantes também podem ser mencionados na literatura por outros autores com a nomenclatura de mini-parafusos ou micro-parafusos. É o mecanismo de ancoragem mais utilizado nos últimos anos na ortodontia devido a sua simples técnica de implantação com leve invasão tecidual (BEZERRA *et al.*, 2004; MIYAWAKI *et al.*, 2003; GRAY; SMITH, 2003; ISHII *et al.*, 2004). São considerados ancoragem absoluta, pois a unidade de ancoragem permanece estacionária sob força ortodôntica, o que faz ser determinante para o sucesso do tratamento ortodôntico (RUNGCHARASSAENG; KAN, 2000).

Huang *et al.* (2005) através de uma revisão sistemática descreveram a utilização de mini-implantes como forma segura de ancoragem para ortodontia e a ortopedia. Segundo estudo relatado por Melsen & Verna (2011), dispositivos intra e extraorais estão sendo substituídos por implantes osseointegrados, incluindo placas, mini-implantes, *onplants* e palatino implantes.

Deste modo, a utilização de mini-implantes como ancoragem esquelética temporária se tornou um método confiável, pois a estabilidade do mecanismo ocorre através da mecânica existente entre o mini-implante e o osso, dependendo de alguns fatores importantes como: tipo de mini-implante, qualidade óssea, tipo de inserção do mini-implante, forma, encadeamento, diâmetro e tamanho de rosca (CHANG, TSENG, 2014; MIGLIORAT *et al.*, 2013; GRACCO *et al.*, 2012; RADAN *et al.*, 2018).

1.3 Tipos de mini-implantes na prática ortodôntica

Os mini-implantes resultam em um sistema de ancoragem absoluto através de um procedimento simples de cirurgia para sua colocação. São considerados um sistema confiável de ancoragem, sendo crescente sua utilização na prática ortodôntica (LEMIEUX *et al.*, 2011). A utilização bem-sucedida destes mecanismos de força depende de um planejamento e plano de tratamento adequado pelo ortodontista. Após a realização do planejamento é necessário decidir qual o tipo de carga será aplicado:

direta (a carga é aplicada diretamente no mini-implante), ou indireta (o mini-implante é utilizado com a força sobre o elemento dentário, que dependendo do movimento pode ser unitário – um dente, ou em grupo de dentes) (VILELA *et al.*, 2004; FAVERO *et al.*, 2002).

No mercado existem vários tipos de implantes disponíveis, e vários tipos de materiais para sua confecção. Porém é sempre necessária que na sua confecção sejam utilizados materiais biocompatíveis, ou seja, atóxicos, com propriedades mecânicas favoráveis e capazes de resistir à deformação, corrosão e a tensão (FAVERO *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2005; MABILLEAU *et al.*, 2006; NINOMI, 1998).

Hoje existem três tipos de materiais biocompatíveis para produção de implantes (FAVERO *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2005; MABILLEAU *et al.*, 2006). Os biotolerantes (aço inoxidável e ligas de cromo), os bioinertes (titânio e carbono) e os bioativos (hidroxiapatita e fosfato de cálcio).

O mais utilizado na prática ortodôntica são os mini-implantes em titânio, por possuírem maior resistência a corrosão quando em contato com fluídos corporais. Porém, possuem dimensões reduzidas, ocasionando assim uma probabilidade de fratura durante a execução de mecanismos de remoção e ou inserção por exercerem forças de grandes magnitudes. Com isso, na ortodontia atual tem sido utilizado ligas de titânio que possuem características bioativas inferiores ao titânio puro, ocasionando uma resistência mecânica maior, com remoção mais facilmente no final do tratamento (MABILLEAU *et al.*, 2006). Atualmente são produzidos com liga de titânio grau V (Ti-6Al-4V) e possuem dimensões entre 1,2 e 2 mm de diâmetro com 6 a 12 mm de comprimento e são selecionados de acordo com o planejamento e o local de inserção e aplicação de força necessária (NINOMI, 1998).

Os mini-implantes possuem uma classificação de acordo com o local de sua inserção e técnica utilizada para inserção. Quanto ao local de sua inserção os mini-implantes são classificados como extra-radulares, que são inseridos fora do

processo alveolar que suporta as raízes dentárias e inter-radulares – inseridos no processo alveolar, entre as raízes dentárias ou próximo delas (SANTOS & SILVEIRA, 2019). Já em relação à técnica de inserção é classificada como auto-rosqueante, indicada para aqueles implantes que possuem a ponta não cortante, necessitando de um buraco piloto antes da sua inserção do mesmo comprimento que o mini-implante a ser utilizado. Causam mínimo dano ao tecido e não geram desvio. São considerados sistemas mais invasivos mesmo apresentando vantagem na perfuração do osso cortical; e auto-perfurante, indicada para os implantes que possuem a ponta cortante, necessitando em alguns casos de força elevada para perfuração do osso cortical. Possui algumas desvantagens como: maior grau de reabsorção, gerando falha no mini-implante na compressão do osso. Pode ocasionar desvio do trajeto do dispositivo devido à elevada força, além de gerar desconforto para o paciente. Apesar das suas desvantagens, possui uma melhor estabilidade primária em relação ao auto-rosqueante (BAUMGAERTEL *et al.*, 2008).

1.4 Superfícies de mini-implantes (convencional x porous)

A utilização e estudo de ferramentas como implantes e mini-implantes pela odontologia vem crescendo. A morfologia destas ferramentas possui importante papel no processo de osseointegração devido ao aspecto de contato osso-implante (LE GUÉHENNEC *et al.*, 2007; MANGANO *et al.*, 2014). Os implantes e mini-implantes precisam ser compatíveis na relação existente entre organismo humano e o seu material, ou seja, precisam possuir a característica de serem biocompatíveis. Entretanto, possuem algumas limitações para sua utilização, principalmente quando usado por pacientes com osteoporose, fumantes, pessoas com baixa densidade óssea e diabéticos (CHENG *et al.*, 2014; TEXEIRA *et al.*, 2012).

A superfície dos implantes/mini-implantes e seu *design* são fatores de grande

relevância para o sucesso da mecânica osso-implante (XIE *et al.*, 2017; SCARANO *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016). As modificações nas estruturas dos implantes são realizadas para provocar uma osteogênese mais rápida ao seu redor. Processos físicos e químicos como exposição a ácidos, jateamento convencional, utilização de pasta de fosfato de cálcio, oxidação eletrolítica e revestimento de apatita, são tipos de tratamento dados a essas estruturas para melhorar a osseointegração do titânio (HARTJEN *et al.*, 2018; ITO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2017; YAGI *et al.*, 2017; CAMPANELLI *et al.*, 2019; JAGGESSAR *et al.*, 2018; SU *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2018.,YADAV *et al.*, 2017).

O *design* dessas estruturas pode ocasionar um auxílio na relação existente entre o osso e o implante, como na estabilidade primária, e no seu grau de fixação. A apresentação dos implantes/mini-implantes está relacionado com a biomecânica. O tratamento e seu ideal posicionamento está correlacionado pela quantidade de roscas e o formato do implante/mini-implante utilizados (SCIASCI *et al.*, 2018; GEHRKE *et al.*, 2016).

Regularmente a superfície dos implantes vem recebendo maior atenção no meio acadêmico. Inúmeros estudos são realizados referente ao tratamento dessas superfícies para avaliação da relação de integração óssea. Nesses estudos os pesquisadores detectaram que as superfícies rugosas proporcionam maior contato osso-implante (TRISI *et al.*,1999; OYONARTE *et al.*, 2005; ALDIKAÇTI *et al.*, 2004). As modificações na topografia, mobilidade e energia da superfície geram modificações na resposta osteoblástica referente ao número de células adsorvidas na superfície, atividade da fosfatase alcalina e a osteocalcina, acelerando a osteogênese e por consequência a osseointegração e a estabilidade secundária (LEE *et al.*, 2012; ZANIVAN *et al.*, 2009).

A superfície do tipo porosa tem sido avaliada como excelente escolha para

revestimentos rugosos. Isso ocorre devido a superfície porosa contribuir mais para osseointegração por possuir uma maior superfície de contato, culminando em um aperfeiçoamento da relação material-osso proporcionando uma melhor fixação do implante devido a interdigitação do tecido ósseo ao implante aumentando desta forma a adesão celular (BRENTTEL *et al.*, 2006). Os implantes do tipo porous possuem um aumento da área superficial ativa produzindo com isso uma melhor bioadesão das células osteogênicas no implante, criando uma estabilidade mecânica maior do sistema implante/ mini-implante ao tecido ósseo (ELIAS *et al.*, 2008). A deposição óssea ocorre livremente em superfícies polidas ou texturizadas, porém as superfícies texturizadas, como a tipo porous, contribuem para uma maior relação de contato entre osso-implante e a neoformação óssea em tempo hábil (COSTA *et al.*, 2015). Segundo Chakravorty *et al.*, (2013) a estimulação coordenada das vias de TGF β , Wnt e NOTCH pelas superfícies modificadas de implantes de titânio é responsável pelo aumento das propriedades osteogênicas e de osseointegração **(Figura 3)**.

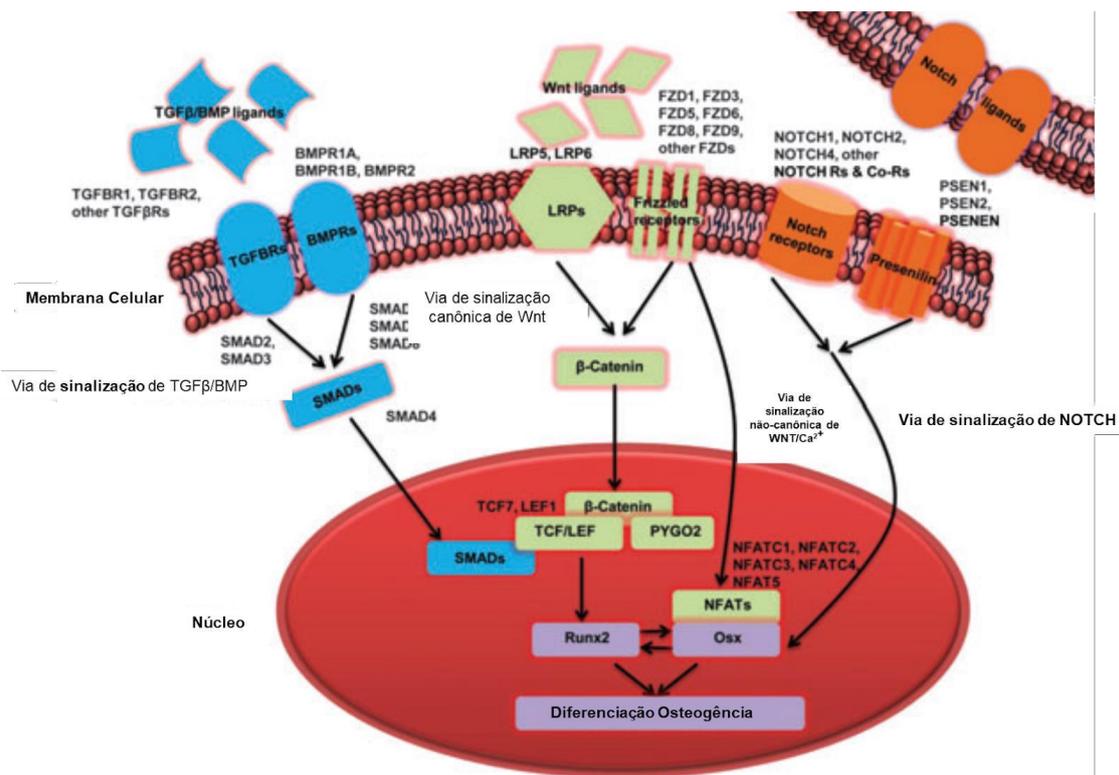


Figura 3: Diagrama esquemático demonstrando o crosstalk entre as vias TGFβ/BMP, Wnt, e NOTCH que levam à diferenciação osteogênica em superfícies de titânio modificadas. A interação das células ósseas com as superfícies de titânio modificadas induz a um aumento de expressão dos ligantes e dos receptores dessas vias iniciando a cascata de eventos. A ativação da via de sinalização de TGFβ/BMP leva à translocação das SMADs para o núcleo das células. A via canônica Wnt/β-catenina causa a translocação da forma fosforilada de β-catenina para o núcleo. A atividade dessas duas vias leva à ativação de RUNX2. A via não-canônica de Wnt e a via de NOTCH levam à ativação de Osterix (Osx). Fonte: Chakravorty *et al.*, (2013) modificada.

1.5 Osseointegração dos implantes ortodônticos

A definição de osseointegração refere-se à ancoragem de um implante no tecido ósseo. A obtenção desse mecanismo depende de sua estabilidade, que pode ser primária agrupando fatores como: densidade óssea, técnica cirúrgica e morfologia do implante e estabilidade secundária, relacionado a resposta do tecido ósseo à cirurgia e a superfície do implante. Após a fixação do implante ao osso, as proteínas plasmáticas aderem à superfície do implante e formam um coágulo que será então

substituído pela aposição óssea imatura ao longo do osso vivo, resultando na formação de um osso lamelar (MORENO-SANCHES *et al.*, 2016; MATTIS *et al.*, 2016).

O osso lamelar representa o tecido mineralizado capaz de suportar as cargas mecânicas do implante, a sua formação se dá através da transformação do osso reticular (mais frágil) e pobre em cristais de fosfato de cálcio em osso rico em fibras paralelas e depois em osso lamelar (JUNKER *et al.*, 2009; TERHEYDEN *et al.*, 2012).

A remodelação óssea ocorre a partir do processo de reabsorção óssea, essa função é realizada pelos osteoclastos, o osso reabsorvido é constantemente substituído por tecido novo, realizado pelas células osteoblásticas, que possuem a função de síntese de tecido ósseo (função osteogênica) (GRISALES *et al.*, 2020).

Esse processo ocorre em três fases (NAKASHIMA e CROMBRUGGHE, 2003):

- Fase de ativação: o RANKL possui sua expressão aumentada através da ativação das células de revestimento, com isso o RANKL interage com o seu receptor RANK, provocando a diferenciação dos osteoclastos.
- Fase de reabsorção: os fatores geralmente armazenados na matriz, BMPs, TGFB, FGFs são liberados pela reabsorção do osso pelos osteoclastos que recrutam osteoblastos na área reabsorvida.
- Fase de formação: nesta fase é finalizado o processo de remodelação óssea. Os osteoblastos recrutados para área reabsorvida produzem a nova matriz proporcionando a sua mineralização.

Existem fatores que são responsáveis por uma possível alteração da arquitetura óssea, como a idade, as drogas, os hormônios, a genética e as doenças existentes (TYROVOLA, 2015; LORICH *et al.*, 1998).

1.6 Epigenética, metabolismo ósseo e movimentação ortodôntica

Conrad Waddington em 1942 introduziu e definiu o termo epigenética como: “ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que trazem o fenótipo ao ser” (WADDINGLON,1942). Atualmente a definição dada a epigenética é “o estudo das alterações na função do gene que podem ser herdadas por mitose ou meiose e que não envolvem mudança na sequência de nucleotídeos do DNA” (WU; MORRIS, 2001). Alterações epigenéticas são definidas como “memórias” moleculares e celulares que são responsáveis por gerar mudanças no padrão de expressão gênica sem que ocorra modificação na sequência primária de DNA (JIANG *et al.*, 2008).

Nos dias atuais a epigenética se instituiu como uma área importante de pesquisa e estudo sobre diferenciação e sinalização celular dos osteoblastos e osteoclastos durante o processo de remodelação óssea (HUSAIN; JEFFRIES, 2017). As alterações epigenéticas atuam como agente na função e desenvolvimento do tecido ósseo e das doenças ligadas a remodelação óssea (HUSAIN; MATLOCK, 2017). A epigenética estuda os estímulos ambientais como: estressores mecânicos, citocinas inflamatórias, envelhecimento, obesidade e dietas na alteração da expressão gênica, além de descrever fenômenos como: modificação do DNA via metilação, modificações nas cadeias laterais de histonas e sequências curtas de RNA não codificantes (JEFFRIES; SAWALHA, 2015; LOUGHLIN; REYNARD, 2015; HUSAIN; MATLOCK, 2017).

O estudo pela epigenética nos ncRNAs como os microRNAs vem se tornando cada vez mais importante para os ortodontistas, pois, o movimento dentário ortodôntico (MDO) é o resultado do sistema biomecânico complexo, coordenado pelas forças ortodônticas através de estímulos mecânicos (HUANG *et al.*,2014; KAPPOR *et*

al., 2021; CHEN & ZHANG, 2023). A relevância do estudo do ncRNAs ocorre devido a existência de alterações do próprio ncRNA aos estímulos mecânicos que ocasionam alteração na sua expressão em células efectoras, incluindo células-tronco, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e osteócito. Esses estímulos mecânicos também originam cascatas de remodelação diferenciada no periodonto, os ncRNAs regulam a proliferação celular, autofagia, inflamação, respostas imunes e neurovasculares, proliferação celular, osteoclastogênese e a osteogênese (**Figura 4**). Além dos ncRNAs provocarem cisalhamento, tensão e deformação do periodonto (CHEN & ZHANG 2023; LI *et al.*, 2021).

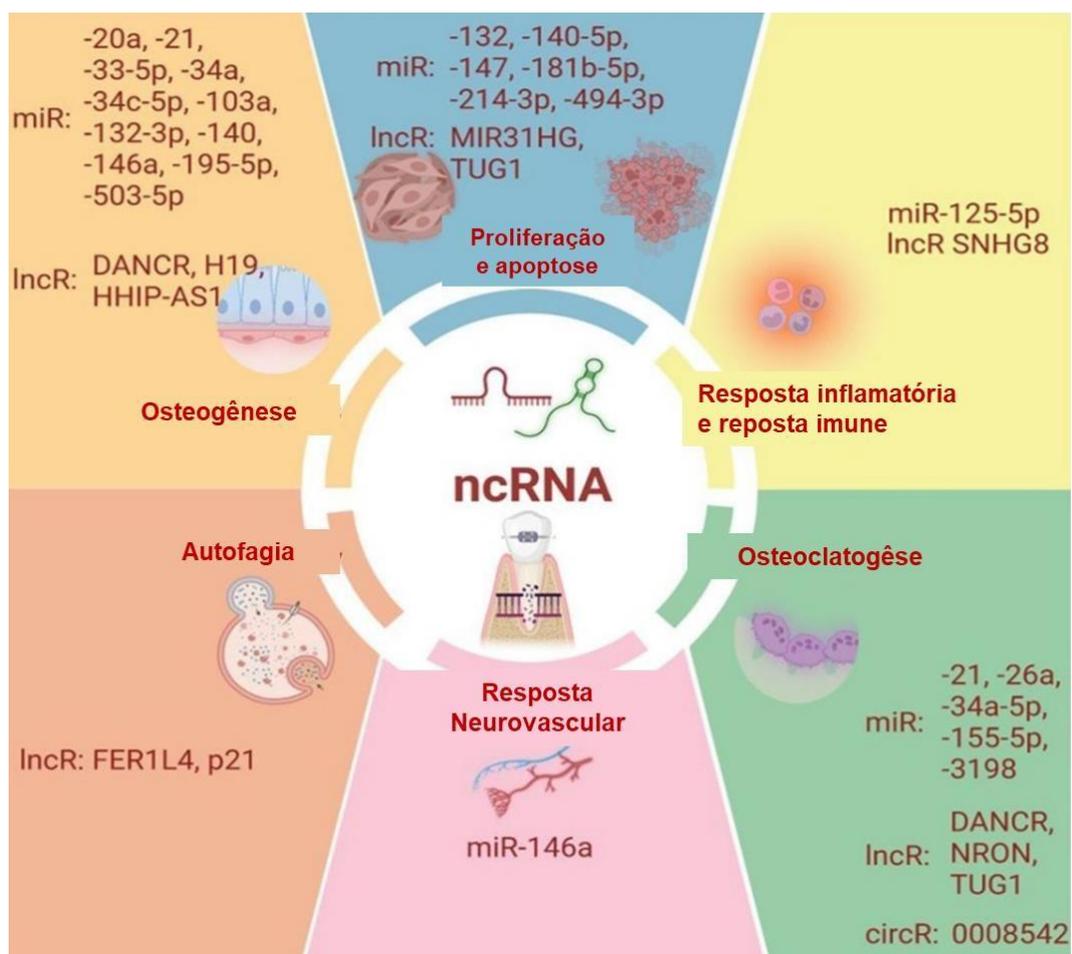


Figura 4: Participação ativa dos RNAs não-codificantes (ncRNAs) na proliferação celular, respostas inflamatórias, imunes e neurovasculares, autofagia e diferenciação durante a movimentação dentária ortodôntica (MDO). Fonte: CHEN e ZHANG, 2023 (adaptada).

Outra função relacionada a molécula de ncRNA é a de mediar os sinais de mecanossensibilidade e mecanotransdução na MDO, com ênfase na adesão focal (FA), citoesqueleto e canais iônicos. O citoesqueleto é responsável pela transmissão e percepção da carga mecânica, essa estrutura recebe a atuação das cargas ortodônticas através do FA, remodelando a MEC modulando assim o estresse celular e a morfologia (WANG *et al.*, 2009; GEIGER *et al.*, 2001). Esses ncRNAs atuam na diferenciação e na função dos osteoclastos além de ajudar na atividade reabsortiva da fase catabólica durante a MDO. As células osteoclásticas sofrem ação positiva do ncRNAs promovendo osteoclastogênese e quando reguladas negativamente aliviam seus efeitos anti-osteoclásticos (CHEN & ZHANG, 2023).

Os ncRNAs possuem papel importante nas várias etapas da osteoclastogênese (**Figura 5**). No decorrer da diferenciação precursora de osteoclastos alguns ncRNAs diferencialmente expressos atuam nas interações citocina-receptor (RANK-RANKL) e fatores de transcrição (NFATc1), além de regular a diferenciação de osteoclastos por meio de sinais em cascata. Em estágio tardio ocorre interação de algumas moléculas de ncRNAs com a TRAP, CTSK e Jagged1, neste último caso com miR-34a ativando indiretamente essa molécula e desta forma participando da maturação dos osteoclastos e da reabsorção óssea (JI *et al.*, 2022).

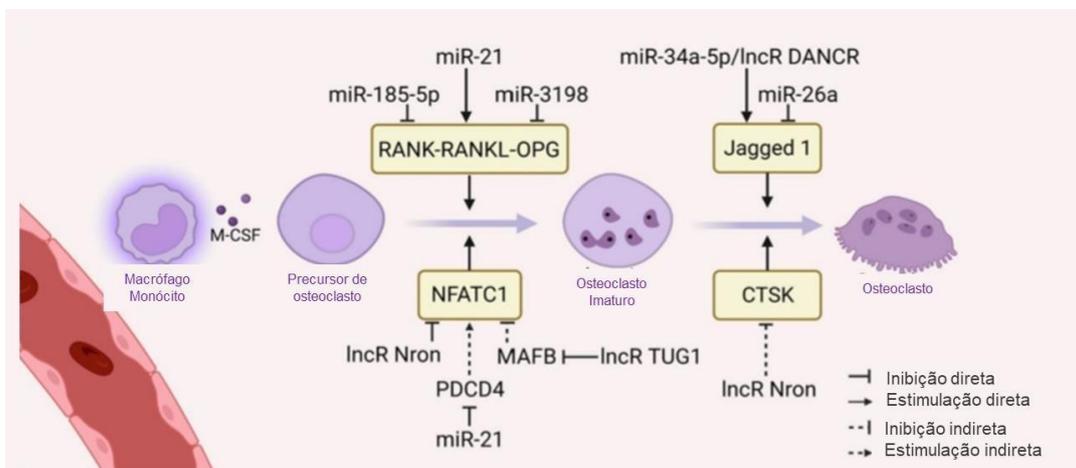


Figura 5: ncRNAs mecanossensíveis regulam a diferenciação inicial de osteoclastos e suas funções. Fonte: CHEN e ZHANG, 2023 (adaptado).

Por isso, são cada vez mais estudadas as ações /intervenções dos ncRNAs durante a MDO, pois possuem como vantagem serem moléculas existentes naturalmente com seleção de alvo, por atuarem direta ou indiretamente em vários níveis em sinais e genes, originando resposta ampla e única na remodelação do periodonto e pelo ncRNAs possuir o papel de biomarcador de OIIRR (Reabsorção Radicular Inflamatória Induzida Ortodonticamente), auxiliando desta forma preventivamente os ortodontista a reduzirem a OIIRR em estágio inicial, melhorando a eficácia clínica, além de incluir a exploração da força ortodôntica ideal **(Figura 6)** (GARBO *et al.*, 2022; WU *et al.*, 2019).

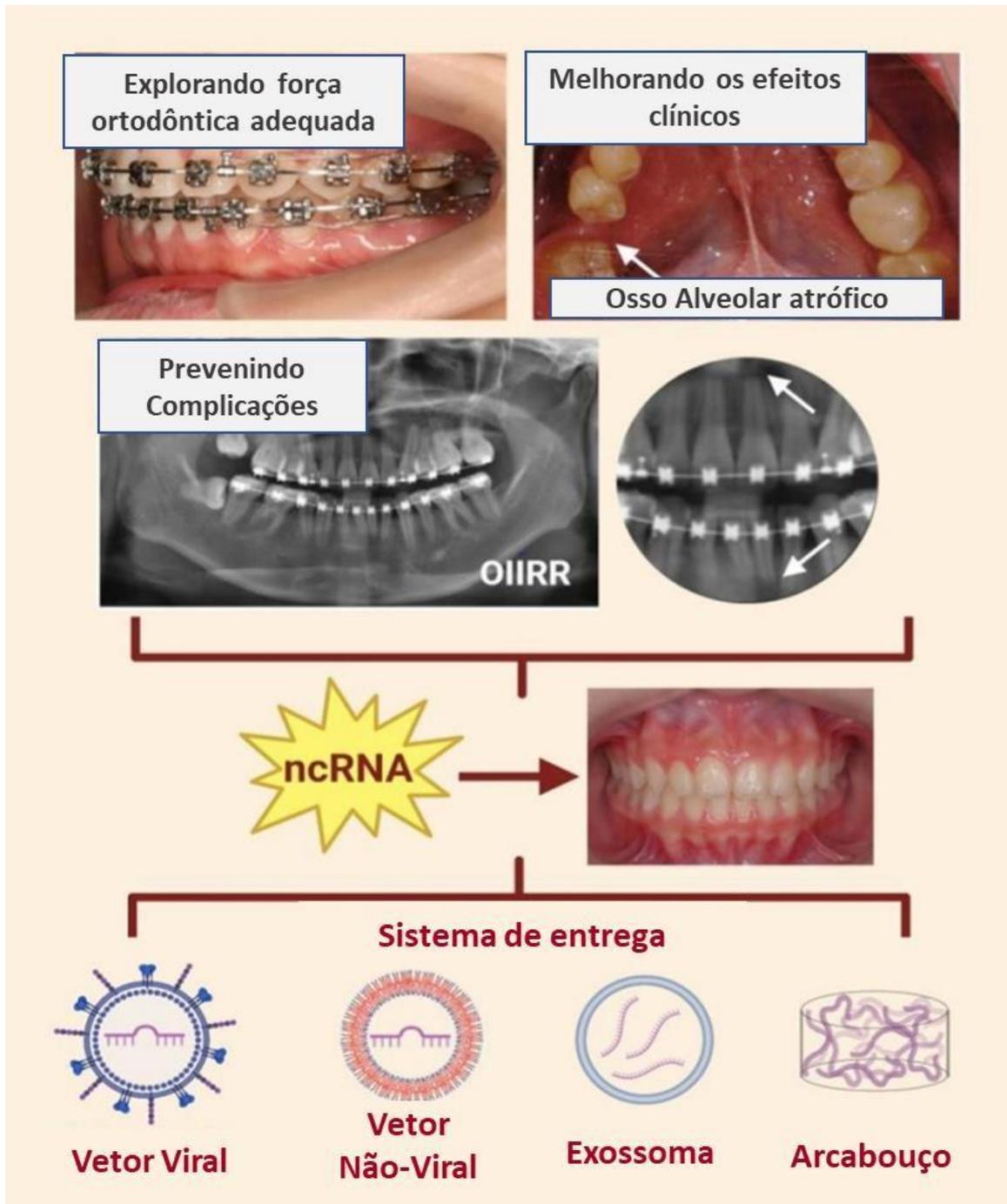


Figura 6: Implicações clínicas baseadas em ncRNAs em Movimentação Ortodôntica Dentária (MDO). A entrega eficiente de ncRNAs pode ser usada para explorar as forças ortodônticas ideais, melhorar os resultados clínicos e prevenir complicações para alcançar o MDO desejado com efeitos colaterais mínimos. Fonte: CHEN e ZHANG, 2023 (adaptado)

1.7 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA com aproximadamente 22 de comprimento, são endógenos, evolutivamente conservados, estão envolvidos na regulação de numerosos processos biológicos, como desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação, apoptose, transdução de sinal, ciclo celular e angiogênese, regulam a expressão gênica de uma maneira pós transcricional ligando-se aos mRNAs alvo, reprimindo assim sua tradução ou induzindo sua degradação (O'BRIEN *et al.*, 2018; AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; FILIPOWICS *et al.*, 2008; SAYED e ABDELLATIF, 2011; LENKALA *et al.*, 2014; IVEY e SRIVASTAVA, 2012; CHAN *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2015; INUI *et al.*, 2010; BUENO e MALUMBRES, 2011; WÜRDINGER *et al.*, 2008).

Alguns miRNAs possuem como função mediar a proliferação e diferenciação de MSCs (células tronco mesenquimais), que possuem o papel importante de auto renovação e diferenciação de linhagens como: osso, cartilagem e músculo. Os miRNAs são importantes para a utilização de cicatrização óssea, como o processo de osseointegração por possuir controle da formação óssea e no tratamento de doenças clínicas, como o câncer (ZUO *et al.*, 2013; EGUCHI, 2013; ESAU *et al.*, 2004; GOFF *et al.*, 2008). RNAs não codificantes (ncRNAs) é um termo comum empregado para RNAs que não são transcritos em proteínas. A grande família de ncRNAs é composta por RNAs de transferência (tRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs), microRNAs (miRNAs), RNAs que interagem com PIWI (piRNAs), pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), pequenos RNAs interferentes (siRNAs) e os RNAs não codificantes longos (lncRNAs). Os ncRNAs participam de diversas e variadas vias biológicas, incluindo o controle da expressão gênica e no processo de desenvolvimento (MATTICK, 2009; ESTELLER, 2011). Os transcritos de ncRNA exibem expressão específica de tecido como os mRNAs (RAVAS *et al.*, 2006).

A transcrição no núcleo celular pela polimerase II ocasiona o início da biogênese do miRNA, porém o posterior papel da clivagem do miRNA primário pelo complexo DROSHA, constitui o miRNA precursor (pré miRNA) em formato de *hairpin* (BARTEL, 2004; WINTE *et al.*, 2011; NAVEED *et al.*, 2017). Esse miRNA precursor é transportado para o citoplasma através da Ran-GTPase exportina-5, após esse transporte o pré miRNA é quebrado dando origem a uma dupla fita de 22 nucleotídeos aproximadamente. Essa quebra ou clivagem é ocasionada pelo complexo formado pela enzima *Dicer*. Após esse mecanismo, uma das fitas origina o miRNA maduro, que acaba sendo incorporado ao complexo indutor de silenciamento de RNA (Risc, do inglês *RNA-induced silencing complex*) (BARTEL, 2004; WINTE *et al.*, 2011; NAVEED *et al.*, 2017) (**Figura 7**).

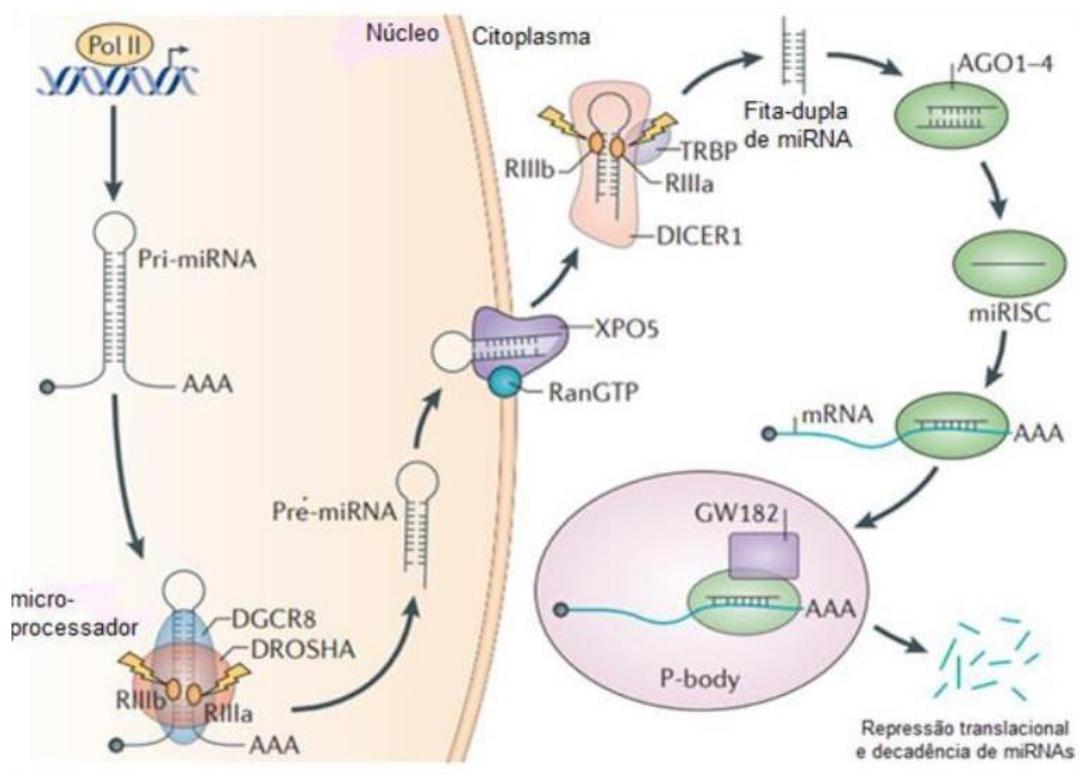


Figura 7: Biogênese de miRNAs. Primeiramente o miRNA é traduzido no núcleo da célula e uma estrutura denominada de miRNA primordial (Pri-miRNA), logo depois ele sofre a primeira clivagem sendo convertido em Pre-miRNA, depois ele é exportado para o citoplasma da célula onde sofre a segunda clivagem e por último a fita madura é incorporada ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex). Quanto este complexo identifica o RNAm alvo ocorre a repressão transcricional. Fonte: (BARTEL; 2004; WINTE *et al.*, 2011; NAVEED *et al.*, 2017)

Os miRNAs tornaram-se particularmente atraentes como biomarcadores devido à sua disponibilidade e estabilidade em uma variedade de amostras biológicas, permitindo seu uso como ferramenta não invasiva para detecção de câncer (TOIYAMA *et al.*, 2013; HANKE *et al.*, 2010).

1.8 miR-34a e o metabolismo ósseo

Embora a ortodontia e suas técnicas tenham avançado ao longo dos anos, melhorar a qualidade da condição alveolar continua sendo um desafio para prática ortodôntica. Estudos realizados (KRZESZINSKI *et al.*, 2014 & SUN *et al.*, 2014) relataram a expressão de miRNA-34a em estágios diferentes de crescimento dentário, remodelação óssea, diferenciação de células-tronco dentárias e sua função endogenamente de inibição de osteoclastos resultando na supressão da osteoclastogênese e expressão de TGIF2 reforçando a capacidade de miRNA-34a de atenuar a perda óssea local e a remodelação óssea alveolar, ocasionando assim estabilidade para realização de ancoragem e tratamento ortodôntico.

Durante o tratamento ortodôntico ocorre um complexo processo de diferenciação e *crosstalk* celular que regula o equilíbrio entre formação e reabsorção do tecido. Esse processo ocorre através de fatores locais e sistêmicos, como o ativador do receptor do fator kappa-B (RANK), RANKL e osteoprotegerina (OPG) (YASUDA *et al.*, 1998). O processo de reabsorção óssea ocorre através da expressão pelos osteoblastos de RANKL que se liga a RANK na superfície de osteoclastos, gerando assim a diferenciação osteoclástica (UDAGAWA *et al.*, 1999). Os miRNAs fazem parte de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais que regulam a formação de osteoclastos mediada por RANKL. O miR-34a dentre outros (29b, -124, -148a e -155) desempenha o papel fundamental na diferenciação osteoclástica. O miR-34a é

considerado um regulador fisiológico significativo da reabsorção, atuando como supressor no desenvolvimento de osteoclastos, aumentando assim a massa óssea. Em conformidade com isso é observado uma menor expressão de RANKL quando é presente uma maior expressão de miR-34a (MIZUNO Y *et al.*, 2009; ITOH *et al.*, 2009; UDAGAWA *et al.*, 1999; KRZESZINSKI *et al.*, 2014).

O gene do miRNA-34 foi encontrado pela primeira vez em *C. elegans* onde codifica um único miR. A família do miR-34 em mamíferos, isso inclui o homem, consiste em três transcritos homólogos miR-34a, miR-34b e miR-34c; o gene miR-34a mapeia para o cromossomo 1p36 localizado dentro do segundo éxon e o genes dos miR-34b e miR-34c mapeiam para o cromossomo 11q23 e estão localizados dentro do íntron 1 e do exon 2. Esses cromossomos são constantemente observados em estudos de alguns tipos de câncer, como: de mama, pulmão, colo do útero, próstata, neuroblastoma, glioma, melanoma e colorretal. A família do gene miRNA-34 é alvo direto do gene supressor tumoral p53 e induz apoptose e parada do ciclo celular quando regulado positivamente (LAU *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2013; TARASOV *et al.*, 2007; HENRICH *et al.*, 2012; HEL *et al.*, 2007; BOMMER *et al.*, 2007).

A regulação de miR-34a é realizada pelo gene supressor tumoral *TP53* em condições fisiológicas. Entretanto, outros mecanismos independentes de *TP53* podem atuar na regulação de miR-34a podendo este miRNA por exemplo, ser inibido por moléculas como ZEB1, SNAIL e STAT3 (SLABÁKOVÁ *et al.*, 2017) (**Figura 8**):

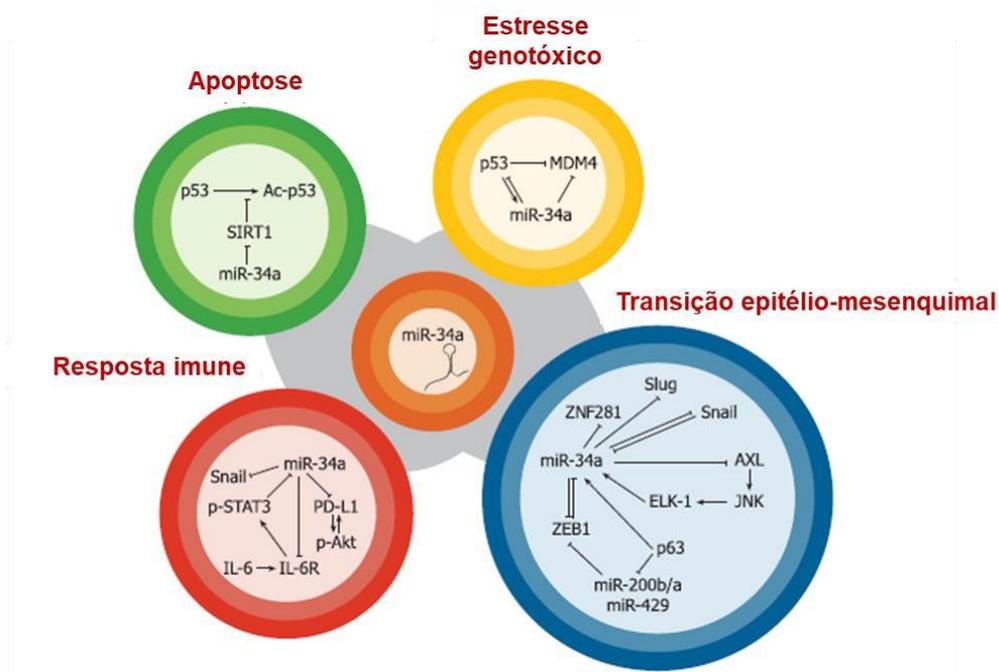


Figura 8: Regulação e vias envolvendo miR-34a. Após dano ao DNA a transcrição de miR-34a é induzida por p53. miR-34a também é capaz de regular p53 direta ou indiretamente (amarelo). miR-34a regula p53 através de SIRT1 no apoptose (verde). Eixo de inibição de miR-34a, IL-6R e STAT3 na inflamação (vermelho). miR-34a está envolvido na regulação do fenótipo de transição epitélio- mesenquimal com múltiplos reguladores como snail, Zeb1 e AXL. Fonte: SLABÁKOVÁ *et al.*, 2017 (adaptada).

Dados obtidos por meio de experimentos de transfecção com miR-34a *in vitro* e *in vivo* realizados por Yu e colaboradores (2017), indicaram que miR-34a promovia a diferenciação osteogênica *in vitro* e a formação de osso *in vivo* durante a aplicação de movimentação ortodôntica. Segundo esses autores, miR-34a foi capaz de inibir GSK-3B um inibidor da ativação de b- catenina, um marcador essencial para a ativação de genes envolvidos na diferenciação de osteoblastos como *RUNX2*, *COL 1* e *ALP*.

A expressão de miR-34a também foi avaliada no fluido gengival de jovens de 12 a 18 anos submetidos à movimentação ortodôntica (ZHANG *et al.*, 2020). Os dados deste estudo revelaram que miR-34a estava diminuído e inversamente correlacionado com a expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-14. A expressão reduzida de miR-34a também foi observada em um experimento que analisou a expressão deste miRNA

em células tronco do ligamento periodontal submetidas à diferenciação osteogênica e submetidas à estiramento mecânico cíclico (MENG *et al.*, 2022).

Considerando que miR-34a está relacionado com uma série de processos envolvidos na homeostase óssea e que até a presente data, não existe nenhum estudo que avalie a expressão de miR-34a diretamente no tecido ósseo em contato com mini-implantes de diferentes superfícies, este estudo teve por objetivo avaliar a expressão de miR-34a em amostras de tíbia de coelhos que receberam mini-implantes com superfície convencional e superfície porosa, na ausência ou presença de carga ortodôntica.

2. JUSTIFICATIVA

A movimentação ortodôntica aceitável necessita de uma resposta biológica tecidual às forças externas. O fator limitante para determinar esse tipo de movimentação ocasionada é gerado por uma cascata de reações bioquímicas, que influenciam na força mecânica e nos fatores de ordem genéticos, como os genes de osteoclastos e osteoblastos (KRISHNAM *et al.*, 2017).

A epigenética é uma área da biologia molecular que estuda as variações não genéticas que são transmitidas de uma geração para outra, sem alteração do DNA. Um dos mecanismos estudados por essa área é a regulação desempenhada pelos miRNAs (MOHR; MOTT, 2015).

Os microRNAs são moléculas de RNA pequenas que não codificam proteínas e que possuem função reguladora pós transcricionais. Alguns miRNAs mediam a proliferação e a diferenciação de MSCs que são importantes para o processo de osseointegração (MOHR; MOTT, 2015; ZUO *et al.*, 2013; EGUCHI *et al.*, 2013).

O miRNA-34a é um tipo de miRNA presente na remodelação óssea que possui a característica de atenuar o processo de perda óssea, por possuir função endógena de inibição dos osteoclastos resultando na supressão da osteoclastogênese e expressão de TGIF2, tornando assim uma ferramenta de estabilidade e ancoragem para ortodontia (KRZESZINSKI *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2014). O miRNA-34a possui papel importante na supressão de osteoclastos, ocasionando assim aumento da massa óssea. Quanto maior a expressão de miR- 34a menor a expressão de RANKL (UDAGAWA *et al.*, 1999).

Portanto, o objetivo do estudo é avaliar a expressão de miRNA-34a através da utilização de mecanismos ortodônticos de tracionamento, utilizando mini-implantes de apresentação distintas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

O objetivo deste presente trabalho foi avaliar a expressão de miR-34a em amostras ósseas de coelhos que receberam mini-implantes de titânio com diferentes superfícies e na ausência/presença de carga.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliou se miR-34a está presente em amostras de tíbia de coelhos que receberam dois implantes após 4 semanas na ausência ou presença de carga (1N) utilizando a técnica por PCR em Tempo Real;
- Avaliou a existência de variação na expressão de miR-34a entre as cinco condições (controle, CD1, CD3, CE1 e CE3) individualmente e entre os grupos de animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Descrição das amostras

Nesta pesquisa foi utilizado o método experimental *in vivo* e todos os procedimentos obedeceram às recomendações éticas e legais especificadas para a experimentação animal (*Canadian Council on Animal Care* e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob protocolo ODONTO (013) **(ANEXO I)**.

Neste presente estudo foram utilizados 6 coelhos Nova Zelândia *Oryctolagus cuniculus*, machos, hígidos e com massa de aproximadamente 3 Quilogramas (3kg). Os animais tiveram como origem a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro) e foram mantidos no biotério do Centro de Cirurgia Experimental do Departamento de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a assistência de três tratadores de animais e dois médicos veterinários.

Cada animal recebeu dois mini-implantes (MI) ortodônticos tipos *porous* (tratados com condicionamento ácido) inseridos na tíbia direita (D) e um mini-implante do tipo convencional inseridos na tíbia direita (E). Dos dois MI instalados em cada tíbia, o implante proximal foi submetido à aplicação de força de 1N através de mola fechada de níquel-titânio, enquanto o mini-implante mais distal permaneceu sem carregamento.

Os MIs que receberam carga com a mola foram numerados como 1 e aqueles MIs que não receberam carga foram numerados como 3. Ao todo foram 5 condições:

MI porous com carga, MI porous sem carga, MI convencional com carga, MI convencional sem carga e amostra controle sem mini-implante (C).

A separação dos grupos e a descrição dos tipos de tratamentos estão descritas no **Quadro1**.

Quadro 1: Categorização das amostras de tíbia de acordo com o tipo de tratamento

Classificação	Condição experimental
C1	Amostra de tíbia do animal 1 sem mini-implante
C2	Amostra de tíbia do animal 2 sem mini-implante
C3	Amostra de tíbia do animal 3 sem mini-implante
C4	Amostra de tíbia do animal 4 sem mini-implante
C5	Amostra de tíbia do animal 5 sem mini-implante
C6	Amostra de tíbia do animal 6 sem mini-implante
C1D1	Coelho 1 – Tíbia direita (MI porous com carga)
C1D3	Coelho 1 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C1E1	Coelho 1 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C1E3	Coelho 1 – Tíbia (MI convencional s/ carga)
C2D1	Coelho 2 – Tíbia direita (MI porous com carga)
C2D3	Coelho 2 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C2E1	Coelho 2 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C2E3	Coelho 2 – Tíbia esquerda (MI convencional s/ carga)
C3D1	Coelho 3 – Tíbia direita (MI porous com carga)
C3D3	Coelho 3 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C3E1	Coelho 3 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C3E3	Coelho 3 – Tíbia esquerda (MI convencional s/ carga)
C4D1	Coelho 4 – Tíbia direita (MI porous com carga)

C4D3	Coelho 4 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C4E1	Coelho 4 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C4E3	Coelho 4 – Tíbia esquerda (MI convencional s/ carga)
C5D1	Coelho 5 – Tíbia direita (MI porous com carga)
C5D3	Coelho 5 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C5E1	Coelho 5 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C5E3	Coelho 5 – Tíbia esquerda (MI convencional s/ carga)
C6D1	Coelho 6 – Tíbia direita (MI porous com carga)
C6D3	Coelho 6 – Tíbia direita (MI porous sem carga)
C6E1	Coelho 6 – Tíbia esquerda (MI convencional c/ carga)
C6E3	Coelho 6 – Tíbia esquerda (MI convencional s/ carga)

4.2 Colocação dos implantes

Para o procedimento de inserção dos MI, os coelhos foram previamente submetidos à sedação e anestesia. Após tricotomia e antisepsia a incisão na tíbia foi realizada com lâmina nº 11 no aspecto plano da região ântero-medial. Sendo a tíbia do coelho um osso que apresenta pouca região medular, dispondo, portanto, de região cortical, foi realizada perfuração óssea com broca helicoidal de 1,2 mm de diâmetro (1,2 x 5 INP – Sistema de Implantes Ltda., São Paulo, Brasil) foi realizada previamente à inserção sob irrigação copiosa com soro fisiológico. O intuito da perfuração prévia, apesar dos MI serem autoperfurantes, foi que não ocorresse fratura óssea durante a inserção. Em cada tíbia, foram realizadas três perfurações, de forma que os dois orifícios mais proximais se situam a distância de 5 mm, e o orifício mais distal ficou 10 mm abaixo do segundo orifício. Além das quatro condições (tratamentos) propostos, foi inserido um segundo implante em cada tíbia (entre C1 e C3 e E1 e E3), porém,

esta condição não entrou em nossas análises e será objeto de análise futuras (**Figura 9**). A padronização dessas distâncias foi realizada com a confecção de “template” com fio de aço inoxidável 0.028.



Figura 9: Mini-implantes instalados em tíbias de coelhos. Foram realizadas perfurações para a colocação dos mini-implantes, de forma que os dois orifícios mais proximais se situam a distância de 5 mm, e o orifício mais distal ficou 10 mm abaixo do segundo orifício. O segundo implante (implante do meio) que aparece na imagem não foi analisado neste estudo e será objeto de análises futuras. Fonte: acervo pessoal.

Após a perfuração, os MI foram inseridos perpendicularmente à cortical óssea de forma manual com a utilização de chave de implante do mesmo fabricante (Conexão Sistemas de Próteses, Arujá, São Paulo, Brasil) até o completo rosqueamento da parte ativa. Em cada tibia, conforme explicado anteriormente, foram rosqueados apenas MI com o mesmo tipo de superfície. A mola de níquel-titânio foi então aplicada sobre o MI mais proximal de forma que quando distendida a distância de 5 mm liberasse 1 N de força.

Decorridas quatro semanas, os animais foram submetidos à sedação e

anestesia, via intramuscular, através da associação de 5 mg/kg de Cloridrato de Xilazina, 50 mg/kg de Cloridrato de Ketamina e 0,75 mg/kg de Acepromazina. A tricotomia, antissepsia, e aplicação de lidocaína foram novamente realizadas. A incisão da região plana no longo eixo do aspecto medial da tíbia foi realizada para que os mini-implantes ficassem expostos e a mola retirada.

A remoção do conjunto osso-MI foi realizada através da utilização de trefina com diâmetro de 4,3 mm acoplada a motor de bancada sob irrigação copiosa com soro fisiológico resfriado. Em cada tíbia foram então removidos dois blocos osso-MI. Cada bloco, imediatamente após a remoção, foi congelado em nitrogênio líquido, sendo seguidamente depositado em tubo Eppendorf e armazenado em freezer a -70°C. Para a realização das análises moleculares também foi obtida uma amostra de osso normal sem a presença de implantes (tíbia sem mini-implante).

Após a remoção dos seis blocos, o animal foi submetido à eutanásia. Para tanto, com o coelho ainda em profunda anestesia e sedação, foi aplicada na veia auricular dose letal de Cloridrato de Tiopental, a qual gira em torno de 90 mg/kg.

4.3 Análises moleculares

Os mini-implantes foram extraídos dos animais, juntamente com o osso subjacente. O RNA total destas amostras foi extraído e a expressão de marcadores envolvidos com a ação de osteoclastos como o miR-34a foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real.

4.3.1 Extração do RNA total e confecção do cDNA

A extração dos RNAs das amostras foi realizada pelo método do Trizol (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA), segundo recomendações do

fabricante. Basicamente, cada amostra foi homogeneizada com 800 μL de Trizol e 1 μL de glicogênio (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e em seguida incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta incubação foi adicionado 160 μL de clorofórmio e após centrifugação por 5 minutos para separar as fases, a fase superior foi transferida para um tubo e novamente extraídas com 800 μL de Trizol e 160 μL de clorofórmio. Após nova centrifugação por 5 minutos para separar as fases, a fase superior foi novamente transferida para um novo tubo e os RNAs foram precipitados pela adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado e incubação a 20° C, durante a noite. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 4° C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 500 μl de etanol 70%. O *pellet* foi seco (10 minutos, temperatura ambiente) e dissolvido em 40 μl de água livre de RNAase.

Para a confecção das moléculas de cDNAs, cerca de 2,0 μg de RNA total foram submetidos ao tratamento com DNase para remoção de DNA genômico, submetidos à ação da enzima *SuperScript III* (Thermo fisher Scientific, Waltan, MA, USA) conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, ao RNA serão adicionados 1 μL de primer Oligo dT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1 μL de dNTPs (10 mM) e água DEPC (dietil-piro-carbonato) suficiente para 13 μL . Essa mistura foi incubada a 65°C durante 5 min. Em seguida, adicionou-se 4 μL de 5x *First Strand Buffer*, 1 μL de DTT (0,1 M), 1 μL de RNAse out (40U/mL) e 1 μL da enzima *SuperScript III* (200 U/ μL) perfazendo um volume final de reação de 20 μL . A reação foi incubada a 50° C por 1 hora e depois inativada através de incubação a 70° C por 15 min. Terminada a reação, o produto da síntese foi diluído 10 X pela adição de 180 μL de água livre de RNAse.

4.3.2 Avaliação da expressão de miR-34a

Para a avaliação da expressão de miR-34a, cDNAs a partir dos RNAs extraídos foram confeccionados utilizando o sistema *Taqman* que consiste na utilização de 1 par de primers e uma sonda específica para miRNA. As reações foram realizadas em triplicata, sempre com a presença de um controle negativo de reação e um controle endógeno (RNU48), no aparelho *QuantStudio 7* da *Applied Biosystems*® (*LifeTechnologies, Carlsbad, USA*). O método para o cálculo da quantificação relativa do nível de expressão foi o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Livak e Schmittgen (2001).

4.4 Análise de Dados

Os registros das informações referentes aos resultados das análises de expressão gênica foram armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha do Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para computador *SPSS version 22.0* e *GraphPad Prism 9.5.1*. Para a análise da expressão de miR-34a entre os três grupos analisados neste presente estudo, foi utilizado o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e os valores de corte para considerar diferença de expressão foram ± 2 . Foram utilizados os testes de *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov* para verificar se os dados das amostras apresentavam distribuição normal. Para a comparação entre os grupos foram utilizados os testes estatísticos *Kruskal Wallis* e teste de mediana. Para avaliação da correlação foi utilizado a Correlação de Spearman. Foi considerado o nível de significância para valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análises moleculares

5.1.1 Extração e quantificação do RNA total das amostras

Foram extraídos os RNAs de um total de 30 amostras de coelhos. As amostras extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro *DeNovix DS-11 (Uniscience)* para avaliação da concentração do RNA total e da densidade óptica a 260nm e 280nm (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação do RNA total extraído das amostras de coelhos

Amostra	260/230	260/280	ng/MI
C1	0,76	1,89	742,17
C2	0,31	1,59	2682,05
C3	0,55	1,44	580,84
C4	0,41	1,59	614,88
C5	0,55	1,44	574,59
C6	0,46	1,23	415,39
C1D1	0,53	1,57	1296,84
C1D3	0,29	1,59	2093,60
C1E1	0,35	1,58	2500,18
C1E3	0,55	1,35	908,46
C2D1	0,34	1,59	2519,96
C2D3	0,30	1,60	2924,39
C2E1	0,33	1,57	2140,70
C2E3	0,32	1,59	2863,39
C3D1	0,26	1,62	937,15
C3D3	0,60	1,79	470,55

C3E1	0,39	1,70	1657,45
C3E3	0,77	1,88	728,01
C4D1	0,27	1,56	1.695,40
C4D3	0,34	1,59	2.466,95
C4E3	0,30	1,58	2.016,56
C5D1	0,55	1,55	1.140,65
C5D3	0,41	1,58	693,43
C5E1	0,49	1,76	964,01
C5E3	0,47	1,47	798,37
C6D1	0,41	1,59	596,53
C6D3	0,65	1,39	673,25
C6E1	0,50	1,37	971,94
C6E3	0,57	1,40	1.113,10

5.1.2 Avaliação da qualidade dos cDNAs

Após a quantificação do RNA total foram confeccionados os cDNAs das amostras. Entretanto, antes de iniciar as avaliações por PCR em tempo real, a qualidade dos cDNAs foi avaliada após PCR com o normalizador GAPDH e eletroforese em agarose a 1,5% (**Figura 10**).

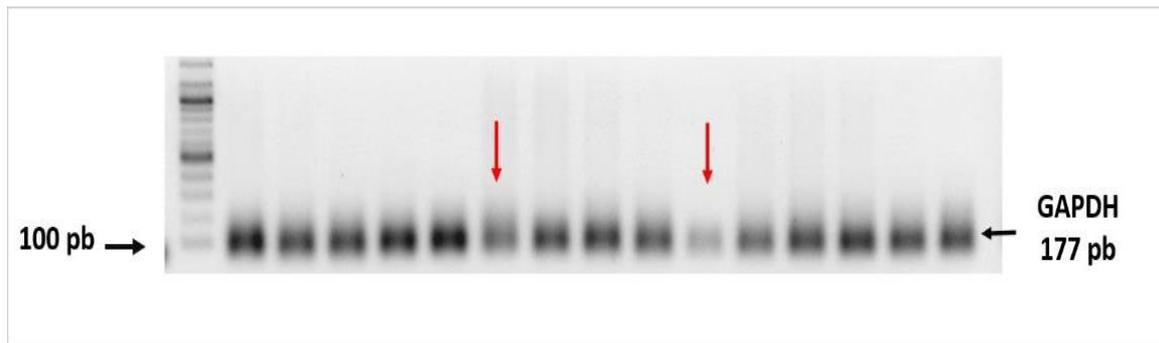


Figura 10: Análise da qualidade dos cDNAs das amostras de coelho. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) demonstrando amplificação do gene *GAPDH*. As amostras que não apresentaram uma boa amplificação (assinaladas pela seta em vermelho) foram descartadas e confeccionados novos cDNAs.

5.1.3 Resultado da expressão de miR-34a por PCR em tempo real nas amostras de coelho de acordo com o tipo de implante e tratamento

Após a confecção dos cDNAs, o próximo passo foi avaliar a expressão de miR-34a nas amostras de coelho de acordo com o tipo de mini-implante e ausência e presença de força aplicada (1N). Os resultados da expressão de miR-34a estão dispostos na tabela 2 em forma de *fold change*. Para a interpretação do método aplicado ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram utilizando os valores de corte +2 para indicar aumento de expressão do miRNA (resultados em vermelho) e 0,5 para resultados de hipossupressão (resultados dispostos em verde). Os valores descritos em preto demonstram que não houve variação de expressão de miR-34a. De acordo com os resultados podemos observar que a expressão de miR-34a entre os animais variou de 0,49 a 60,30 vezes mais expresso comparado aos controles (amostras de tibia sem mini-implante). As amostras que apresentaram maior variação de expressão para miR-34a foram aquelas que receberam o implante do tipo porous, sendo que na condição CD3 (porous sem carga) miR-34a estava aumentado nos seis animais analisados. Já na condição CD1 (mini-implante porous com carga) podemos observar um aumento de expressão de miR-34a em 4 dos 6 animais analisados. Importante

notar também que exceto no animal 6, os valores de fold change de miR-34a para CD3 foram superiores quando comparados com o CD1 (**Tabela 2**):

Tabela 2: Valores de *Fold Change* para miR-34a nas amostras de coelho analisadas em relação aos seus controles

ANIMAIS	TRATAMENTO			
	CD1	CD3	CE1	CE3
ANIMAL 1	0,71	2,38	0,51	1,21
ANIMAL 2	2,10	4,68	1,91	0,64
ANIMAL 3	1,23	3,98	2,10	1,69
ANIMAL 4	2,19	2,77	0,49	4,49
ANIMAL 5	2,52	21,18	8,85	60,30
ANIMAL 6	19,33	2,32	0,63	1,17

Legenda: CD1 – Implante porous com carga (1N) em tibia direita; CD3 - Implante porous sem carga em tibia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tibia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tibia esquerda. As amostras controle (C) não aparecem na tabela. Elas foram usadas para o cálculo da expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$

5.1.4 Comparação da expressão de miR-34a entre as amostras e grupos analisados

O próximo passo foi comparar estatisticamente os valores de expressão de miR-34a entre os grupos animais. Na **Figura 11** podemos observar graficamente a variação da expressão de miR-34a entre os 6 animais analisados nas diferentes condições de tratamento. Não encontramos diferença estatisticamente significativa quando comparamos os diferentes tipos de tratamento aplicados entre seis animais e o grupo controle ($p= 0,054$).

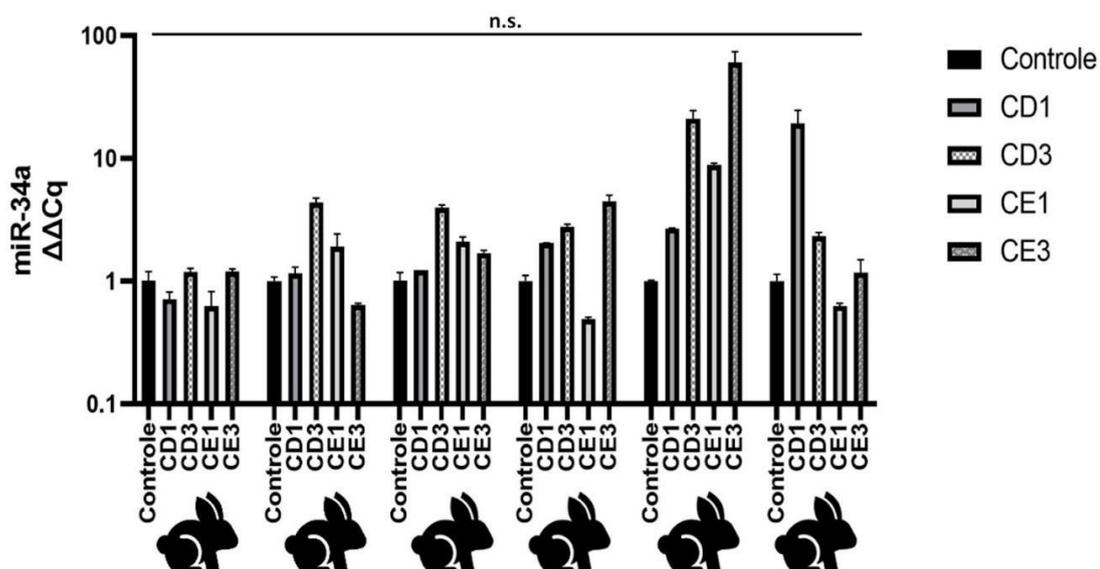


Figura 11: Análise global da expressão de miR-34a em diferentes tratamentos, nos seis animais avaliados neste estudo. Legenda: Controle - tíbia sem mini-implante; CD1 – Implante poroso com carga (1N) em tíbia direita; CD3 - Implante poroso sem carga em tíbia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tíbia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tíbia esquerda. Os valores de fold change (eixo y) estão dispostos na escala log10. Teste de Kruskal-Wallis.n.s. significa não significante.

5.1.5 Avaliação da expressão de miR-34a em cada animal analisado

O próximo passo foi analisar se existe diferença na expressão de miR-34a para cada animal (**Figura 12**). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de tratamento analisados em cada animal analisado (**Figura 12A-12F**).

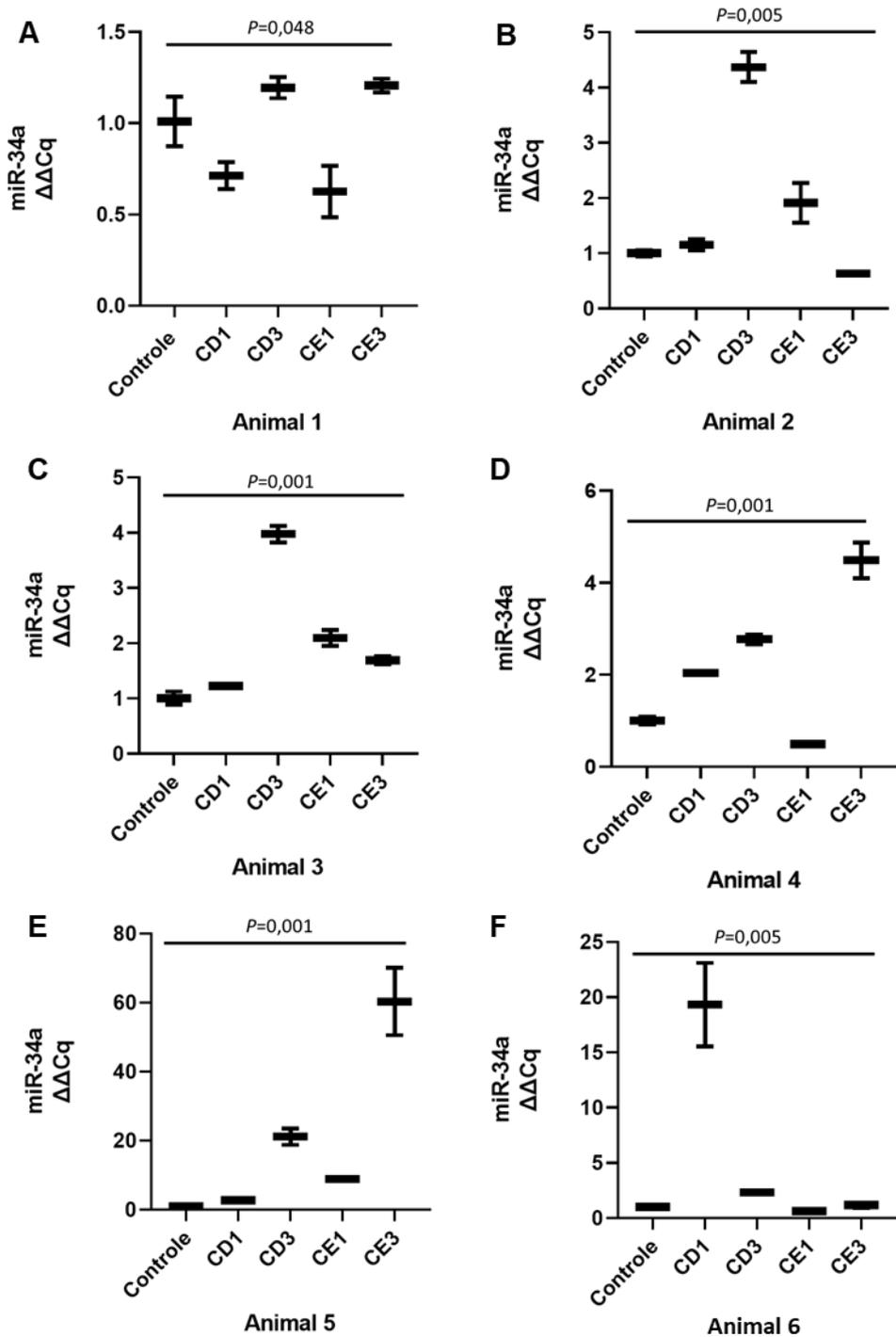


Figura 12: Análise da expressão de miR-34a em diferentes tratamentos individualmente nos seis animais avaliados. Legenda: CD1 – Implante poroso com carga (1N) em tibia direita; CD3 - Implante poroso sem carga em tibia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tibia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tibia esquerda. Os valores de fold change (eixo y) estão dispostos na escala linear. Teste de Kruskal Wallis.

5.1.6 Avaliação da expressão de miR-34a entre os animais analisados

A próxima análise teve por objetivo avaliar a variação da expressão de miRNA-34a para visualizar a heterogeneidade da expressão de miR-34a observada em cada animal utilizado no estudo. Podemos observar que o animal 5 apresentou valores de expressão de miR-34a aumentados na maioria dos tratamentos analisados. Uma expressão mais homogênea de miR-34a foi observada nos animais no grupo experimental CD3 (**Figura 13**).

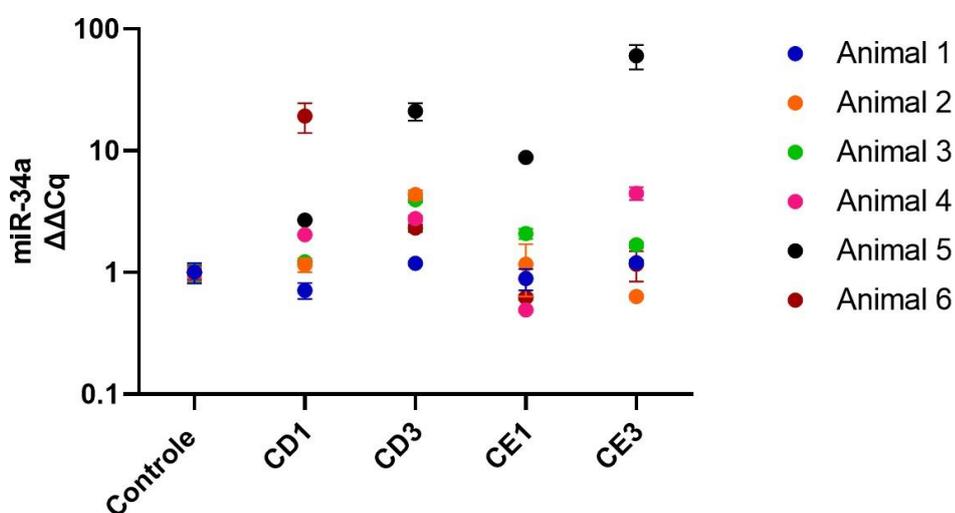


Figura 13: Avaliação da variação da expressão de miR-34a em diferentes tratamentos nos seis animais analisados. Legenda: CD1 – Implante porous com carga (1N) em tibia direita; CD3 - Implante porous sem carga em tibia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tibia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tibia esquerda. Os valores de fold change (eixo y) estão dispostos na escala log10.

5.1.7 Avaliação da expressão de miR-34a entre os grupos de tratamento

Com a finalidade de investigar se havia diferença significativa na expressão de miR-34a entre os tipos de tratamento foi feita a comparação entre os grupos. Não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de miR-34a entre os grupos, exceto, entre o tratamento CD3 e o grupo controle ($p=0,002$) (**Figura 14 e Figura 15**).

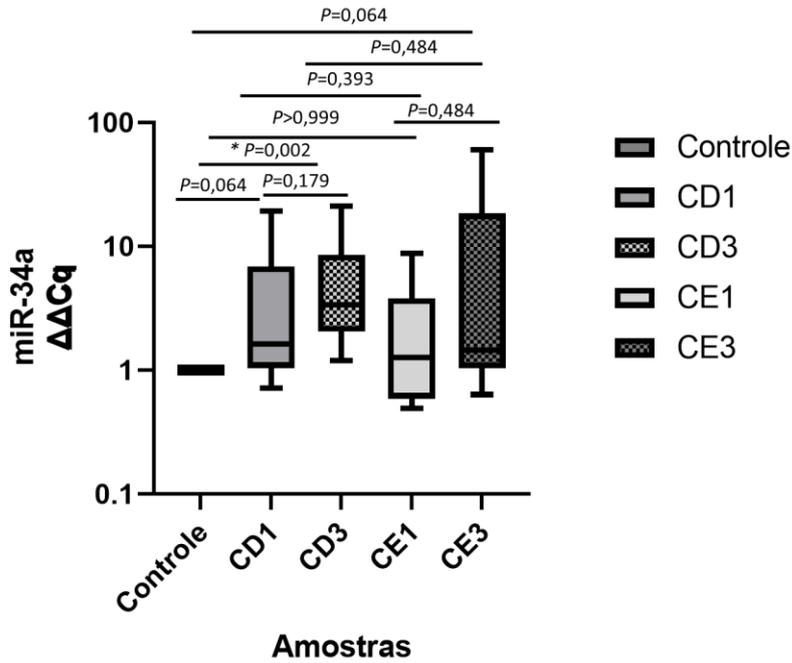


Figura 14: Comparação da expressão de miR-34a nos diferentes tratamentos realizados. Legenda: CD1 – Implante porous com carga (1N) em tibia direita; CD3 - Implante porous sem carga em tibia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tibia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tibia esquerda. Os valores de fold change (eixo y) estão dispostos na escala log10. Teste de *Kruskal Wallis* e *Mann-Whitney*.

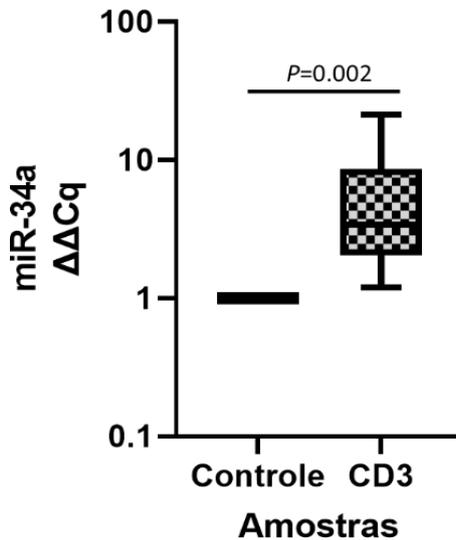


Figura 15: Expressão de miR-34a em CD3 comparado com o grupo controle. Legenda: CD1 – Implante porous com carga (1N) em tibia direita; CD3 - Implante porous sem carga em tibia direita, CE1 – implante convencional com carga (1N) em tibia esquerda; e CE3 – implante convencional sem carga em tibia esquerda. Os valores de fold change (eixo y) estão dispostos na escala log10. Teste de *Mann-Whitney*.

6. DISCUSSÃO

O trabalho seminal do médico sueco Branemark (1960) foi essencial para a introdução dos implantes na rotina odontológica e o estabelecimento do conceito de osseointegração. Os resultados desse estudo demonstraram a estabilidade do mecanismo de implante durante aplicação de força, possibilitando a aplicabilidade desta técnica como forma de ancoragem na ortodontia durante a movimentação dentária. Uma vez que o movimento ortodôntico está baseado biologicamente no processo de remodelamento no periodonto (CHEN & ZHANG, 2023), os mecanismos envolvidos na estabilidade dos mini-implantes utilizados na movimentação ortodôntica permanecem ainda obscuros.

Visto que os miRNAs, pequenas moléculas de RNA com atividades de regulação gênica, possuem um papel importante na homeostase periodontal e participam de diversos processos celulares como diferenciação celular, apoptose, osteoclastogênese e osteogênese, este estudo teve por objetivo investigar a expressão de miR-34a em mini-implantes de titânio com diferentes tipos de superfície (convencional e porous) implantados em tibia de coelho e submetidos à presença/ausência de carga (1N).

Para isso, primeiramente avaliamos se o miR-34a estava presente nas amostras ósseas analisadas. Os dados obtidos pelo método de PCR em tempo real demonstraram que miR-34a estava aumentado em determinadas amostras com valores de chegando até 60 vezes (CE3 - animal 5). A avaliação dos valores de *fold change* de miR-34a nas diferentes condições analisadas demonstraram que a expressão do miR-34a estava aumentada, nas amostras de tibia que receberam o implante porous sem carga (CD3) em relação ao grupo controle (variando de 21,18 a

2,32 vezes) em todos os seis animais. Análises estatísticas demonstraram que esse aumento de expressão de miR-34a foi estatisticamente significativo ($p=0,002$) neste tipo de condição comparado às demais condições analisadas.

Diante desses resultados formulamos a seguinte pergunta: “Qual seria a explicação biológica para o aumento de miR-34a neste tipo de condição?” Para auxiliar na resposta a essa pergunta, foi necessária uma busca minuciosa na literatura com a finalidade de compreender o papel que este miRNA desempenha no tecido ósseo.

Em condições fisiológicas miR-34a é regulado pelo gene supressor tumoral *TP53*. Entretanto, após um dano ao DNA, o gene *TP53* também pode sofrer regulação por miR-34a diretamente pela interação com seu transcrito e indiretamente tendo como alvo MDMX, o inibidor de TP53. Outros mecanismos independentes de TP53 podem atuar na regulação de miR-34a, como por exemplo a hipometilação da região promotora de miR-34a (SLABÁKOVÁ *et al.*, 2017). Uma vez que a expressão de miR-34a é induzida por p53, miR-34a tem sido considerado uma importante regulador da supressão tumoral, inibindo diversas vias envolvidas na tumorigênese como ciclo celular e o fenótipo epitélio mesenquimal e promovendo processos que inibem a tumorigênese como apoptose e senescência (ROKAVEC *et al.*, 2014; SLABÁKOVÁ *et al.*, 2017).

Além de seu papel já reconhecido na prevenção à carcinogênese, outros trabalhos têm demonstrado a atuação de miR-34a em outros processos fisiológicos como Wan *et al.* (2012) que utilizaram diversos métodos de análise como qPCR, *western blot*, imunofluorescência e microarray e evidenciaram que miRNA-34a desempenha um papel importante na diferenciação das células da papila dentária durante o desenvolvimento do órgão dentário através da modulação de diversas vias

como as vias de WNT, FGF, NOTCH e Sonic Hedgehog (Shh). Estes autores também demonstraram que a expressão deste miRNA variava significativamente durante o desenvolvimento dentário.

Quando consideramos o envolvimento deste miRNA no metabolismo ósseo, verificamos que embora esse assunto tenha sido objeto de vários estudos, os dados disponíveis são conflitantes. Experimentos com ganho e perda de função realizados *in vivo* indicaram que outros membros da família miR-34, como miR-34 b/c afetavam o desenvolvimento esquelético em camundongos inibindo STAB2, uma proteína de matriz fundamental para a diferenciação (WEI *et al.*, 2012). Já o papel de regulador-chave de miR-34a no processo de diferenciação osteoblástica foi demonstrado por Chen *et al.*, 2013. Em organismos adultos a formação óssea é mediada através do recrutamento de células tronco mesenquimais (também conhecidas como células tronco esqueléticas) derivadas da medula óssea situada perto das superfícies de formação óssea (CHEN *et al.*, 2013). Com o objetivo de identificarem os miRNAs envolvidos nas diferentes etapas de formação óssea, estes autores utilizaram a técnica de *microarray* em células-tronco humanas (hMSCs) induzidas a diferenciação em osteoblastos quando cultivadas em meio específico para diferenciação. Após os 14 dias de indução *in vitro*, os autores verificaram um aumento na expressão de miR-34a. Estes resultados foram confirmados por PCR em tempo real tanto em cultura 3D como em cultura em monocamada-2D. Para avaliar a função biológica de miR-34a na indução da diferenciação osteoblástica de hMSCs, estes mesmos autores transfectaram essas células com pré-miR-34a e anti-miR-34a. Durante a indução osteoblástica dessas células foi observado uma inibição significativa de ALP, assim como, uma inibição da mineralização em células que superexpressavam miR-34a. Além disso, outros marcadores de expressão gênica de osteoblastos como colágeno tipo I (Col I), osteopontina (OPN) e osteonectina (ON)

foram inibidos pela superexpressão do miR-34a, enquanto seus níveis mostraram-se aumentados em presença de anti-miR-34a. Posteriormente, avaliações *in silico* com confirmação por PCR em tempo real foram realizadas com a finalidade de determinarem os alvos de miR-34a durante a diferenciação osteoblástica, destacando dentre estes JAG1, um ligante da via de NOTCH. Estes autores também demonstraram a inibição do crescimento ósseo em um modelo *in vivo* de formação de osso heterotópico em camundongos. Utilizando células hMSC transfectadas subcutaneamente, os autores observaram que nas células contendo miR-34a aumentado ocorria uma redução de 60% na formação óssea comparado aos controles. Por outro lado, a inibição de miR-34a levava a um aumento de 200% na formação óssea.

Apesar das evidências demonstrando miR-34a como inibidor da proliferação e da diferenciação osteogênica em hMSC, outros estudos demonstraram que miR-34a foi capaz de aumentar a osteogênese. Por exemplo Sun e colaboradores (2014) demonstraram que miR-34a foi capaz de promover a diferenciação osteogênica em células tronco da papila apical. Células-tronco da papila apical são células mesenquimais/progenitoras que residem no ápice radicular de dentes permanentes imaturos. Nesse estudo a transfecção de células tronco da papila apical com mimicos de miR-34a demonstraram um aumento de RUNX2, OSX, and OCN e que este miRNA apresentou-se como um regulador negativo da via de Notch, mas um regulador positivo da mineralização e da diferenciação celular.

Fan et al. (2016) demonstraram que miR-34a estava aumentado durante o processo de diferenciação de células tronco derivadas de adipócitos. E que essa superexpressão significativamente aumentava a expressão da fosfatase alcalina, a capacidade de mineralização e a expressão de genes relacionados com a

osteogênese *in vitro* como RUNX2, osterix (OSX) e osteocalcina (OC). Nesse mesmo estudo, miR-34a induziu a formação de osso *in vivo*.

Grilli *et al.*, (2015) avaliaram as modificações transcricionais na linhagem celular de osteossarcoma, Saos-2, comparada à clones transfectados com CD99, uma molécula de superfície presente em osteoblastos, que está ausente em osteossarcomas e que tem a capacidade de induzir a diferenciação dessas células. Após a transfecção de Saos-2 com CD99, estes autores observaram uma variação na expressão de alguns miRNAs, sendo que 22 miRNAs apresentavam uma importante associação com as fases de diferenciação celular. miR-34a e miR-26b foram os principais reguladores nas fases inicial (dias 0 e 7) e tardia (dia 14) da diferenciação celular. A análise de bioinformática realizada neste estudo demonstrou que miR-34a apresenta-se como o principal regulador da via TGF-beta, uma via importante na carcinogênese, tendo como alvo SMAD4. Os dados revelados neste estudo apontam para o papel de miR-34a na regulação do processo de osteogênese em osteossarcomas, revertendo o fenótipo malignidade e reativando a diferenciação de células de osteossarcoma pela modulação descendente da sinalização TGFbeta.

Segundo Fan *et al.*, (2016) os resultados contraditórios para a participação de miR-34a na osteogênese podem ser parcialmente atribuídos às características variadas das diferentes linhagens celulares e à regulação pós-transcricional distinta da diferenciação osteogênica tecido específica. Em nosso estudo, os dados gerados não são suficientes para explicar qual seria a explicação biológica para justificar esse aumento na produção de miR-34a. Para responder se miR-34a estaria envolvido no aumento da massa óssea em torno desse tipo de implante serão necessários experimentos adicionais para avaliar a produção de marcadores de osteogênese.

Esse aumento significativo na expressão de miR-34a no implante porous sem carga (superfície modificada) comparado com a amostra controle trouxe um segundo

questionamento: “O tipo de superfície do mini-implante poderia estar contribuindo para o aumento de expressão de miR-34a?”

Nas últimas décadas houve um aumento notável no número de trabalhos publicados destinados ao estudo da melhoria da topografia dos implantes, de suas propriedades osteogênicas e osseointegráveis com a finalidade de obter o sucesso clínico e a utilização dessas estruturas como mecanismos de ancoragem na ortodontia (CHAKRAVORTY *et al.*, 2013).

A morfologia do implante possui um papel crítico na superfície de contato osso-implante e pode contribuir para o processo de osseointegração. A manipulação de propriedades mecânicas e topográficas de implantes de titânio, como por exemplo, implantes micro e nanoporosos, têm sido propostos como alternativas promissoras para aplicações odontológicas (Wally *et al.*, 2015). Além disso, estudos têm demonstrado que a estrutura e o método de fabricação do material implantado são capazes de modular as interações das células ósseas. Uma superfície de implante porosa tem uma área de superfície alta que deve permitir que mais células se fixem em comparação para uma superfície plana (Wally *et al.*, 2015).

Até a presente data não existe nenhum estudo que associe a expressão de miR-34a e a superfície dos mini-implantes ortodônticos. No entanto, é importante citar neste contexto o estudo de Chakravorty *et al.*, (2013). Estes autores avaliaram superfícies de implantes de titânio com topografias modificadas e verificaram que a morfologia celular se apresentava significativamente diferente nos implantes microrrugados em comparação com os implantes de superfícies lisas. A expressão dos transcritos para vários genes das vias de Wnt, Notch e TGFb/BMP, mas não para a via Hedgehog, foi modulada pela modificação das superfícies de titânio. Esses achados foram correlacionados com uma expressão aumentada de marcadores de osteogênese como osteocalcina e de diferenciação óssea como os fatores BMP2,

BMP6 e GDF15 que foram observados nas superfícies modificadas.

Estudos *in vitro* desenvolvidos por He *et al.*, (2022) demonstraram que a superfície dos biomateriais é crucial para a osseointegração. Esses autores confirmaram através de suas observações que o implante de titânio nanoporoso apresentava uma melhor osseointegração devido ao recrutamento de macrófagos ao redor do implante e limitando a diferenciação e a quimiotaxia dos osteoclastos. Neste estudo, eles demonstraram que a topografia nanoporosa pode inibir significativamente a diferenciação dos osteoclastos por meio do bloqueio da via integrina β 1/FAKpY397/MAPK alterando a população de citocinas relacionadas aos osteoclastos e macrófagos proporcionando um ambiente osteogênico mais favorável. Dentro do contexto da diferenciação de osteoclastos, ressalta-se o papel de Tgif2 (transforming growth factor-beta-induced factor 2) uma proteína que está aumentada durante a diferenciação dessas células. Krzeszinski *et al.*, 2014 demonstraram que Tgif2 é um alvo direto de miR-34a e que este miRNA é um potencial inibidor da osteoclastogênese e da reabsorção óssea.

Baseado nestes dados, o aumento de expressão de miR-34a observado no implante tipo porous, mas não no implante convencional neste presente estudo poderia estar sendo induzido por este tipo de superfície. Uma vez que implantes porosos ativam diversas vias para formação óssea e inibição de osteoclastogênese e que já foi mencionado que miR-34a pode atuar também nessas vias, provavelmente essa superfície poderia estar proporcionando um aumento de massa óssea mediado por miR-34a.

Porém, para responder tanto a primeira pergunta, quanto a segunda, serão necessários experimentos adicionais voltados para a avaliação dos marcadores moleculares como RUNX2, OC, OPG e ALP com a finalidade de demonstrar se miR-34a estaria induzindo a osteogênese neste tipo de superfície de implante.

Apesar desse aumento de expressão ter sido observada no implante tipo porous sem carga, ela apresentou-se reduzida no implante tipo porous submetido a 1N de carga (CD1). Porém, esses valores de expressão demonstram uma diferença de expressão nesta condição quando comparada com a amostra controle ($p = 0,064$). Surgiu então o terceiro questionamento do estudo: “O tracionamento ortodôntico estaria modulando a expressão de miR-34a?”

Apesar da regulação insuficiente da formação óssea por miR-34a, Yu e colaboradores (2017) demonstraram que miR-34a poderia atenuar a perda óssea local ou no remodelamento do osso alveolar em osso submetido à movimentação ortodôntica. Estes autores estabeleceram um modelo *in vitro* de células-tronco da medula óssea (BMSCs) submetidas à força mecânica e um modelo *in vivo* de movimento dentário ortodôntico em ratos, com o intuito de investigar o potencial de miR-34a como um alvo terapêutico local para tratamento ortodôntico. No estudo *in vivo* estes autores utilizaram um dispositivo para movimentação ortodôntico composto por uma mola em níquel-titânio em espiral fechada exercendo uma força de 50 N do incisivo superior ao primeiro molar superior do animal, com o intuito de mover o primeiro molar mesialmente. A retenção de mola foi monitorada diariamente para garantir resistência estável e contínua, uma vez estabelecido esse modelo, a expressão de genes relacionados com o metabolismo ósseo foi avaliada. Genes relacionados com o processo de diferenciação óssea como Runx2, Col1, e ALP apresentaram um aumento de expressão. Houve um aumento de expressão significativo de miR-34a no sétimo dia de aplicação de carga ortodôntica. De acordo com os autores, a variação de expressão de miR-34a foi consistente com a expressão dos fatores de diferenciação óssea. Logo depois, foi realizada a transfecção de miR-34a agomiR (pré-miR-34a) e de miR-34a antagomiR (anti-miR-34a) e realizada a comparação com animais controle, também submetidos à movimentação ortodôntica.

Os autores investigaram o efeito de miR-34a na remodelação óssea local e na movimentação ortodôntica por caracterização morfológica, ensaio de microCT e PCR em tempo real e verificaram que os animais tratados com miR-34a-antagomiR apresentaram uma diminuição da massa óssea, ao contrário de miR-34a-agomiR cujos animais aumentaram a osteogênese e a formação de massa óssea no osso local submetido à movimentação dentária. Ainda nesse estudo, para entender o mecanismo de atuação de miR-34a na diferenciação osteogênica induzida por força, os autores investigaram a expressão das proteínas relacionadas com a via Wnt/ β -catenina em células rBMSCs transfectadas com miR-34a-agomiR e com miR-34a-antagomiR. Eles observaram que a proteína GSK-3 β encontrava-se diminuída e que β -catenina encontrava-se ativa após a transfecção com miR-34a agomiR. GSK3 β tem como função impedir a ativação da via Wnt inibindo a ativação de β -catenina. Os autores formularam uma hipótese de que, uma vez estando β -catenina ativada, ela se acumularia no núcleo das células e iniciaria a via Wnt/ β -catenina, ativando por sua vez, uma série de genes relacionados com a diferenciação osteogênica como RUNX2, Col1 e ALP. Os autores concluíram que miR-34a tem um efeito positivo na diferenciação osteogênica em condições de força.

Em nosso estudo a força aplicada (1N) foi inferior à utilizada por Yu e colaboradores (2017) (50N). Mas como explicar a menor expressão da condição CD1 (mini-implante porous com carga) versus CD3 (mini-implante sem carga)? A nossa hipótese é que na condição CD3 há o favorecimento da osteogênese pois não há aplicação de carga, já na condição CD1 esse processo poderia estar sendo prejudicado pela aplicação de força e consequente indução do processo de reabsorção óssea. Provavelmente durante o processo de reabsorção óssea pode estar havendo a liberação de alguma molécula capaz de regular negativamente a expressão de miR-34a. Zhang *et al.* (2020) em uma avaliação com 12 pacientes de

12 a 18 anos de idade submetidos à tratamento ortodôntico demonstraram uma redução na expressão de miR-34a no fluido gengival após aplicação de força ortodôntica. Essa expressão de miR-34a foi negativamente correlacionada com a expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-14, proteínas que estão geralmente aumentadas em áreas de pressão. Outro estudo investigou uma redução na expressão de miR-34a em células tronco de ligamento periodontal. Essas células foram submetidas à diferenciação com meio osteogênico por 3 semanas. Os autores mimetizaram a aplicação de força ortodôntica nessas células e verificaram que ALP, osteopontina, COL1 e RUNX2 estavam aumentados, enquanto miR-34a encontrou-se diminuída (Meng *et al.*, 2022). Importante mencionar que a proteína STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) exerce um papel importante na diferenciação e na atividade de osteoclastos via catepsina k (DAVIDSON *et al.*, 2020). STAT3 é capaz de induzir a expressão de NFATc1, o regulador principal da diferenciação e da formação de osteoclastos (YANG *et al.*, 2019). STAT3 exerce um papel importante na remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica através do crosstalk osteoblasto/osteoclasto (GONG *et al.*, 2023). Foi demonstrado em células de câncer colorretal que STAT3 constitui uma via alternativa de regulação de miR-34a (ROKAVEK *et al.*, 2014). Uma hipótese para a redução na expressão de miR-34 sob movimentação ortodôntica é que nesse processo haveria uma maior produção de STAT3 e que essa molécula poderia estar regulando negativamente miR-34a.

Uma vez que os dados encontrados neste presente estudo apontam uma possível relação entre miR-34a e os mini-implantes tipo porous, e que a literatura aponta para um importante papel de miR-34a no processo de osteogênese, análises adicionais deverão ser realizadas com a finalidade de elucidar o papel deste miRNA no tecido ósseo quando em contato com implantes ortodônticos com superfície porosa.

7. CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos neste presente estudo nós podemos concluir que:

- miR-34a apresentou-se superexpresso nas amostras de tíbia contendo MI tipo porous, sendo essa expressão presente em 100% nas amostras que receberam o MI tipo porous sem carga e 66,7% nas amostras que receberam MI tipo porous sem carga. O aumento de expressão de miR-34a neste tipo de implante possivelmente pode ser justificado pelo processo de osteointegração induzida por este tipo de superfície. Porém, para esclarecer a função biológica de miR-34a nesse processo serão necessários experimentos adicionais.
- Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão de miR-34a nas amostras que receberam o MI tipo porous sem carga comparada com o grupo controle. Dados da literatura apontam para uma expressão aumentada de marcadores de osteogênese como osteocalcina e de diferenciação óssea como os fatores BMP2, BMP6 e GDF15 em superfícies de implantes modificadas. Além disso, a topografia nanoporosa parece inibir significativamente a diferenciação dos osteoclastos. Foi demonstrado que o miR-34a tem como alvo Tgif2 uma proteína relacionada com a reabsorção óssea e a diferenciação de osteoclastos. Diante desses dados, o aumento na expressão de miR-34a induzida por este tipo de superfície parece sugerir que este miRNA pode estar sendo requisitado para os processos de osteogênese e inibição da osteoclastogênese.
- A expressão de miR-34a mostrou-se menor nas amostras que receberam os MIs tipo porous com carga, em comparação aos MIs tipo porous sem carga.

Dados da literatura demonstraram que uma expressão de miR-34a após

tracionamento tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Provavelmente durante o processo de reabsorção óssea induzida pela movimentação ortodôntica pode estar havendo a liberação de alguma molécula capaz de regular negativamente a expressão de miR-34a, como por exemplo STAT3, uma molécula crucial para a movimentação ortodôntica e com papel conhecido de inibidor de miR-34a.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355

Akça, K.; Cehreli, M.C.; Iplikçioğlu, H (2003). Evaluation of the mechanical characteristics of the implant-abutment complex of a reduced-diameter morse-taper implant. A nonlinear finite element stress analysis. *Clinical Oral Implants Research*, Copenhagen, v. 14, n.4, p. 444-45.

Aldikaçti M, Açikgoz G, Turk T, Trisi P (2004). Avaliação de longo prazo de jato de areia e implantes gravados com ácido usados como âncoras ortodônticas em cães. *Am J Orthod Ortopedia Dentofacial* 125,139-147

AVINASH, S.; BIDRABDS, K.A. Mini implants for definitive prosthodontic treatment: A systematic review (2013). *The Journal of Prosthetic Dentistry, United States* (v.109, n.3),156-164.

Bain CA (1996). Smoking and implant failure--benefits of a smoking cessation protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants*,11,756-759.

Bartel, David P (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function *Cell* (v. 116, n. 2) 281-297.

Batisse, C. et al (2017). Predictive Parameters of Oral Health Quality of Life in Complete Mandibular Denture Wearers Stabilized by Mini-Implants: A Two-Year Follow-up Study. *Materials, Switzerland*, v.10, n.10, p.1197.

Baumgaertel S., Razavi M. R, & Hans, M. G (2008). Mini-implant anchorage for the orthodontic practitioner. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133(4), 621-627.

Bezerra, F. et al (2004). Ancoragem absoluta utilizando microparafusos ortodônticos de titânio. Planejamento e protocolo cirúrgico (Trilogia – Parte I). *Implant News* (v. 1, n. 6) 469-475.

Block MS, Hoffman DR (1995). A new device for absolute anchorage for orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.,n.; 107, 251-8.

Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR and Fearon ER (2007). p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology: CB*. 17(15):1298-1307.

Bousquet, F. et al (1996). Use of an impacted post for anchorage. *J. Clin. Orthod. Boulder*, v.30, n.5, p.261-265.

Brånemark PI (1964). Bone marrow, structure and function. *Adv in Microcirc*. 1964; 1: 1-42.

Brånemark PI (1983). Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*,50(3):399-410. doi: 10.1016/s0022-3913(83)80101-2. PMID: 6352924.

Bränemark P et al (1997). An experimental and clinical study of osseointegrated in treatment of the edentulous jaws. Experience from a 10-year period. *Scand J PlastReconstr Surg*, v.,n.;16:11-8.

Brentel AS et al (2006). Histomorphometric analysis of pure titanium implants with porous surface versus rough surface. *J Appl Oral Sci* ; 14(3):213-218.

Bueno MJ, Malumbres M (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *BiochimBiophys Acta* 1812: 592–601.

Campanelli, L.C. et al (2019) . Fatigue resistance, electrochemical corrosion and biological response of Ti-15Mo with surfacemodified by amorphous TiO₂ nanotubes layer. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, United States*, v.107, n.1, p.86-96, January.

Chakravorty N, Hamlet S, Jaiprakash A, Crawford R, Oloyede A, Alfarsi M, Xiao Y, Ivanovski S (2014). Pro-osteogenic topographical cues promote early activation of osteoprogenitor differentiation via Enhanced TGFB, WnT and Notch signaling. *Clin Oral Implants Res*. 25(4):475-86.

Chang HP, Tseng YC (2014). Miniscrew implant applications in contemporary orthodontics. *Kaohsiung J Med Sci*. Mar;30(3): 111-5.

Chen L, Holmstrøm K, Qiu W, Ditzel N, Shi K, Hokland L, Kassem M (2014). MicroRNA-34a inhibits osteoblast differentiation and in vivo bone formation of human stromal stem cells. *Stem Cells*. Apr;32(4):902-12.

Chen Y, Zhang C (2023). Role of noncoding RNAs in orthodontic tooth movement: new insights into periodontium remodeling. *J Transl Med*. Feb 9;21(1):101.

Cheng, A.; Humayun, A.; Cohen, DJ; Boyan, BD; Schwartz, Z (2014). Construções porosas de Ti-6Al-4V 3D fabricadas com aditivo imitam a estrutura óssea trabecular e regulam a proliferação osteoblástica, a diferenciação e a produção de fator local de maneira dependente da porosidade e rugosidade da superfície. *Biofabricação* , doi:10.1088/1758-5082/6/4/045007.

Cheng, A. et al (2018). Surface modification of bulk titanium substrates for biomedical applications via low-temperature microwave hydrothermal oxidation. *Journal of biomedical materials research. Part A, United States*, v.106, n.3, p.782-796 .

Costa LJ, Sousa ET, Lucena FL, Souza RCV (2015). Superfície de implantes de titânio e sua capacidade de estímulo na formação óssea: Uma revisão de literatura. *Odontol. Clín.-Cient.*, Recife, 14(4) 797 – 800.

Consolaro A, Silva E, Cardoso MA (2022). O que muda na biologia do movimento ósseo induzido com miniimplantes/miniplacas é a sincronicidade. *Dental Press J Orthod*. 27(3).

Consolaro A (2014). A remodelação óssea explica os resultados dos mini-implantes e miniplacas. *Rev. Clin Ortod Dental Press*. 13(5):31-8.

Consolaro A (2014). Mini-implantes e miniplacas geram ancoragem subabsoluta e absoluta. *Dental Press J Orthod*.19(3):20-3.

Consolaro A (2014). A distribuição da força é mais importante do que a sua intensidade. *Dental Press J Orthod*;19(1):5-7.

Consolaro A (2012). *Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas*. 3ªed. Maringá: Dental Press.

Consolaro A, Furquim L (2011). Mecânica intrusiva gera forças de inspiração e estímulos ortopédicos com reposicionamento duradouro e remodelação homogênea simultânea ou na mecânica intrusiva não se aplica forças de intrusão, mas obtém-se o efeito intrusivo. *Dental Press J Orthod. Out* ;16(5):20-9.

Dabrowski, B.; Swieszkowski, W.; Godlinski, D.; Kurzydowski, KJ (2010). Andaimos de titânio altamente porosos para aplicações ortopédicas. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 95, 53–61.

Davidovitch Z (1991). Movimento dentário. *Crit Rev Oral Biol Med*.2(4):411–50.

Davidson RK, Himes ER, Takigawa S, Chen A, Horn MR, Meijome T, Wallace JM, Kacena MA, Yokota H, Nguyen AV, Li J (2020). The loss of STAT3 in mature osteoclasts has detrimental effects on bone structure. *PLoS One*. Jul 30;15(7):e0236891.

Dhaliwal, J.S. et al (2017). Osseointegration of standard and mini dental implants: a histomorphometric comparison. *International journal of implant dentistry, Germany*, v.3, n.1, p.15.

Elias CN, Oshida Y, Lima JHC, Muller C A (2008). Relação entre superfície. propriedades (rugosidade, molhabilidade e morfologia) de titânio e dentes torque de remoção do implante. *J Mech Behav Biomed Mat*; 1:234-42.

Esau C, Kang X, Peralta E, et al (2004). MicroRNA-143 regulate adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 279:52361-52365.

Esteller, Manel (2008). Epigenetics in evolution and disease. *The Lancet*, v. 372, p.S90- S96.

Esteller M (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12: 861–874.

Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T, Calderwood SK (2013). OsteoMiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cells. *PLoS One*,8: e58796.

Fan C, Jia L, Zheng Y, Jin C, Liu H, Zhou Y (2016). MiR-34a Promotes Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells via the RBP2/NOTCH1/CYCLIN D1 Coregulatory Network. *Stem Cell Reports*, 9;7(2):236-48

Favero, L. et al (2002). Orthodontic anchorage with specific fixtures: related study analysis. *Am J OrthodDentofacialOrthop*, v.122, n.1, p.84-94.

Ferreira, F.V (1998). *Ortodontia – Diagnóstico e Planejamento clínico*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 503 p.

Fernandes, E. M. S (2009). Efecto del movimiento ortodóncico em el tratamiento de los defectos periodontal es, Universidad central de Venezuela facultad de Odontología Postgrado de Periodoncia, pp. 1-73.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008). Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9: 102–114.

Fritz, U.; Ehmer, A.; Diedrich, P (2004). Clinical suitability of titanium microscrews for orthodontic anchorage: preliminary experiences. *J Orofac Orthop, München*, v. 65, n. 5, p. 410-418.

Garbo S, Maione R, Tripodi M, Battistelli C (2022). Próxima terapêutica de RNA: a mina da não codificação. *Int J Mol Sci.* 23(13):74.

GEHRKE, S.A. et al (2016). Influence of Implant Design (Cylindrical and Conical) in the Load Transfer Surrounding Long (13mm) and Short (7mm) Length Implants: A Photoelastic Analysis. *The open dentistry journal, United Arab Emirates*, v.10, p.522-530, September.

Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM (2001). Transmembrana crosstalk entre a matriz extracelular-citoesqueleto crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2(11):793–805.

Goff LA, Boucher S, Ricupero CL, et al (2008). Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis. *Exp Hematol*, 36:1354-1369.

Gong X, Sun S, Yang Y, Huang X, Gao X, Jin A, Xu H, Wang X, Liu Y, Liu J, Dai Q, Jiang L (2023). Osteoblastic STAT3 Is Crucial for Orthodontic Force Driving Alveolar Bone Remodeling and Tooth Movement. *J Bone Miner Res.* Jan;38(1):214-227.

Gracco A, Giagnorio C, Parenti SI, Bonetti GA, Siciliani G (2012). Effects of thread shape on the pullout strength of miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* Aug;142(2):186-90.

Gray JB, Smith R (2003). Transitional implants for Orthodontic Anchorage. *J Clin Orthod.* 11(34):659-65.

Grisales, R. F., Grajales, L. J., Villegas, C. V., Zapata, S. M., & Manrique, R. D. (2020). Knowledge, attitudes, and practices of dentists in Colombia regarding bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *CES Odontologia.* 33(1): 15-21.

Krzeszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, Xie XJ, He L, Mangala LS, Lopez-Berestein G, Sood AK, Mendell JT, Wan Y (2020). Retraction Note: miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*,582(7810):134.

Hanke, M.; Hoefig, K.; Merz, H.; Feller, A.C.; Kausch, I.; Jocham, D.; Warnecke, J.M.; Sczakiel, G (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA- 182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*, 28, 655–661.

- Hartjen, P. et al (2018). Plasma Electrolytic Oxidation of Titanium Implant Surfaces: Microgroove- Structures Improve Cellular Adhesion and Viability. In vivo, Greece, v.32, n.2, p.241-247, March-April.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA and Hannon GJ (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148):1130-1134.
- He Y, Li Z, Ding X, Xu B, Wang J, Li Y, Chen F, Meng F, Song W, Zhang Y (2021). Nanoporous titanium implant surface promotes osteogenesis by suppressing osteoclastogenesis via integrin β 1/FAKpY397/MAPK pathway. *Bioact Mater*, 1;8:109-123
- Henrich KO, Schwab M and Westermann F (2012). 1p36 tumor suppression a matter of dosage? *Cancer Res.* 72(23):6079-6088.
- Huang, L. H. et al (2005). Dental implants for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.127, n.6, p.713-22.
- Huang H, Williams RC, Kyrkanides S (2014). Dente ortodôntico acelerado movimento: mecanismos moleculares. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*,146(5):620– 32.
- Husain, Ali; Jeffries, Matlock A (2017). Epigenetics and Bone Remodeling. *Current Osteoporosis Reports*. –. doi:10.1007/s11914-017-0391-y
- Inui M, Martello G, Piccolo S (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 252–263.
- Ito, T. et al (2018). Promotion of bone regeneration on titanium implants through a chemical treatment process using calcium phosphate slurry: Microscopic analysis, cellular response, and animal experiment. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, United States*, v.106, n.7, p.2716-2724.
- Itoh T, Nozawa Y, Akao Y (2009). MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J. Biol. Chem.*284:19272-19279.
- Ishii T, Nojima K, Nishii Y, Takaki T, Yamaguchi H (2004). Evaluation of the implantation position of mini-screws for orthodontic treatment in the maxillary molar area by a micro-CT. *Bull Tokyo Dent Coll*, 45(3):165-72. doi: org/10,2209/tdcpublication.45.165.
- Ivey KN, Srivastava D (2010). MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell* 7: 36–41.
- Jaffin RA, Berman CL (1991). The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5- year analysis. *J Periodontol.*62:2-4.

Jaggessar, A. et al (2018). Mechanical, bactericidal and osteogenic behaviours of hydrothermally synthesised TiO₂ nanowire arrays. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Netherlands, v.80, p.311-319, April, 2018.

Ji L, Li X, He S, Chen S (2022). Regulação da reabsorção óssea mediada por osteoclastos por microRNA. *Cell Mol Life Sci.*79(6):287.

Jiang, Y., et al (2008). "Epigenetics in the nervous system". *J Neurosci* 28(46): 11753-11759.

Jeffries MA, Sawalha AH (2015). Doença autoimune na era epigenética: como a epigenética mudou nossa compreensão da doença e como podemos esperar que o campo evolua? *Especialista Rev Clin Immunol*, 11:45–58. [PubMed: 25534978]

Junker, R. et al (2009). Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: A systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20(4), pp. 185–206.

Kanzaki H, Wada S, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, Fukaya S, Miyamoto Y, Narimya T, Noda K, Nakamura Y (2019). Compression and tension variably alter Osteoprotegerin expression via miR-3198 in Periodontal ligament cells. *BMC Molecular and Cell Biology*. 20:6.

Kapoor P, Chowdhry A, Bagga DK, Bhargava D, Aishwarya S (2021). MicroRNAs em fluidos orais (saliva e fluido crevicular gengival) como biomarcadores em ortodontia: revisão sistemática e análise bioinformática integrada. *Prog Orthod.*22(1).

Krishnan V, Davidovitch Z. Reações celulares, moleculares e em nível de tecido para 6. força ortodôntica. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 129(4):469. e461-432, 2006.

Krishnan, V., Sanford, R. L. e Davidovitch, Z. (2017). Tooth movement biology and laboratory experiments: How useful are they to orthodontic practitioners?, *Seminars in Orthodontics*, 23(4), pp. 373-381.

Krzyszinski JY, Wei W, Huynh H, Jin Z, Wang X, Chang TC, Xie XJ, He L, Mangala LS, Lopez-Berestein G, Sood AK, Mendell JT, Wan Y (2014). MiR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature.* 512:431-435.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG and Bartel DP (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294(5543):858- 862.

Le Guéhennec, L.; Soueidan, A.; Layrolle, P.; Amouriq, Y (2007). Tratamentos de superfície de titânio dental implantes para osseointegração rápida. *Dente. Mate.*23, 844–854.

Lee JH, Ogawa T (2012). The biological aging of titanium implants. *Implant Dent*, 21(5): 415-21.

Lee, J.T.; CHO, S.A (2016). Biomechanical evaluation of laser-etched Ti implant surfaces vs. chemically modified SLA Ti implant surfaces: Removal torque and resonance frequency analysis in rabbit tibias. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, Netherlands, v.61, p.299-307.

Lemieux, G., Hart, A., Cheretakis, C., Goodmurphy, C., Trexler, S., McGary, C., & Retrouvey, J (2011) Computed tomographic characterization of mini-implant placement pattern and maximum anchorage force in human cadavers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 140(3), 356-365.

Lenkala D, LaCroix B, Gamazon ER, Geeleher P, Im HK, Huang RS (2014). The impact of microRNA expression on cellular proliferation. *Hum Genet* 133: 931–938.

Li Y, Zhan Q, Bao M, Yi J, Li Y (2021). Respostas biomecânicas e biológicas do periodonto na movimentação dentária ortodôntica: atualização em uma nova década. *Int J Oral Sci.* 13(1):20.

Li, JP; de Wijn, JR; van Blitterswijk, CA; de Groot, K (2015). Andaimos porosos de Ti6Al4V fabricados diretamente pela técnica de deposição de fibras 3D: efeito do diâmetro do bocal. *J. Mater. ciência Mate. Med.* 16, 1159–1163.

Loughlin J, Reynard LN (2015). Osteoartrite: Epigenética da cartilagem articular na OA de joelho e quadril *Nat Rev Rheumatol*, 11:6–7. Boa revisão curta de estudos epigenéticos da cartilagem da osteoartrite. [PubMed: 25366188]

Mabilleau, G., Bourdon, S., Joly-Guillou, M., Filmon, R., Baslé, M., & Chappard, D (2006). Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater* 2(1), 121-129, 2006.

Mangano, F.; Chambrone, L.; van Noort, R.; Miller, C.; Hatton, P.; Mangano, C (2014). Implantes dentários de titânio de sinterização direta a laser de metal. *Int. J. Biomater.* doi:10.1155/2014/461534.

Massarelli (2011). E.E., *Biologia Molecular da Movimentação Ortodôntica*. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Universidade Cidade de São Paulo.

Marassi, C., Marassi, C., & Cozer, T. B (2016). Miniimplantes Ortodônticos. Em *Ortodontia e Ortopedia Funcional dos Maxilares*, pp. 199-206.

Marassi, C. et al (2005). O uso de miniimplantes como auxiliares do tratamento ortodôntico. *Ortodontia SPO*, v. 38, n. 3, p. 256-265.

Marassi C, Leal A, Herdy JL (2004). Clinical applications of mini-screws as anchorage. In: *American Association Orthodontistis. 104th Annual Session*, Maio, Orlando, Florida: AAO.

Marcello-Machado, R.M (2018). Mini-implants and narrow diameter implants as mandibular overdenture retainers: A systematic review and meta-analysis of clinical and radiographic outcomes. *Journal of oral rehabilitation*, England, v.45, n.2, p.161-183.

Mattick JS (2009). The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet.* Apr;5(4):e1000459.

Mattis, F., Gomes, F. V., & Mayer, L. (2016). Perda tardia de implante dentário devido a osteonecrose associada ao uso de bisfosfonatos: relato de caso clínico. *Revista Academia Brasileira de Odontologia.* 5(1): 1-8.

- Melsen B, Verna C (2005). Miniscrew implants: The Aarhus System. *Seminars in Orthodontics*,11(1):24-31.
- Meng X, Wang W, Wang X (2022). MicroRNA-34a and microRNA-146a target CELF3 and suppress the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under cyclic mechanical stretch. *J Dent Sci*,17(3):1281-1291
- Migliorati M, Benedicenti S, Signori A, Drago S, Cirillo P, Barberis F, et al (2013). Thread shape factor: evaluation of three different orthodontic miniscrew stability. *Eur J Orthod*,35(3):401-5.
- Miyawaki S, Koyama I, Inoue M (2003). Factors associated with the stability of titanium screw placed in the stability of titanium screw placed in the posterior region for orthodontic anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 124(4):373-8. doi:org/10.1016/S0889-5406(03)00565-1.
- Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al (2009). miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett*.583:2263-2268.
- Mohr, Ashley M.; MOTT, Justin L (2015). Overview of microRNA biology. In: *Seminars in liver disease*. Thieme Medical Publishers, p. 003-011.
- Moreno -Sánchez, M., Florencio, M. G., González-García, R., & Zaldívar, D. M. S. (2016). Are bisphosphonates and dental implants compatible? A review of the literature. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*. 38(3): 128-135.
- Nakashima, K. e Crombrugghe, B. De (2003). Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in genetics : TIG*, 19(8), pp. 458–466.
- Naveed, Ahsan et al (2017). A concise review of MicroRNA exploring the insights of MicroRNA regulations in bacterial, viral and metabolic diseases. *Molecular biotechnology*, v. 59, n. 11, p. 518-529.
- Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, GoldschmittJ (2016). Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblast and osteoblast. *Clin Oral Investig*.9: 1-9.
- Niinomi, M (1998). Mechanical properties of biomedical titanium alloys. *Mater Sci Eng A* 243(1-2), 231-236.
- Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T (2002). Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. *Anat Rec. Apr* 1;266(4):218-25.
- O'Brien,J.,Hayder,H., Zayed, Y. e Peng,C., (2018). Visão geral da biogênese do microRNA, mecanismo de ação e circulação. *Fronteiras em Endocrinologia*, vol.9, pp.402. PMID:30123182
- Otaño Lugo R (2014). *Ortodontia* [Internet]. Havana: Editorial de Ciências Médicas. [citado em 2 de outubro de 2020].

Oyonarte R, Pilliar RM, Deporter D, Woodside D G (2005). Osso peri-implantar resposta à carga ortodôntica: Parte 2. Geometria da superfície do implante e seu efeito na remodelação óssea regional. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*; 128:182-9.

Radan ES, Montasser MA, Maher A (2018). Influence of geometric design characteristics on primary stability of orthodontic miniscrews. *J Orofac Orthop*. May;79(3):191-203.

Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, Okunishi R, Fukuda S, Ru K, Frith MC, Gongora MM, Grimmond SM, Hume DA, Hayashizaki Y, Mattick JS (2006). Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res*, Jan;16(1):11-9.

Roberts W.E. et al (1984). Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*;86:95-111.

Roberts WE, Nelsen CL, Goodacre CJ (1994). Rigid implant anchorage to close a mandibular first molar extraction site. *J Clin Orthod*.38:693-704.

Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler PK, Schwitalla S, Slotta-Huspenina J, Bader FG, Greten FR, Hermeking H (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*,124(4):1853-67.

Rungcharassaeng K, Kan JY (2000). Immediately loaded mandibular implant bar over denture: a surgical and prosthodontic rationale. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 20(1):71-9.

Scarano, A. et al (2017). Bone Response to Two Dental Implants with Different Sandblasted/Acid- Etched Implant Surfaces: A Histological and Histomorphometrical Study in Rabbits. *BioMed research international, United States*, v.2017, p.8724951.

Slabáková E, Culig Z, Remšík J, Souček K (2017/2018). Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis*. 2017 Oct 12;8(10):e3100. doi: 10.1038/cddis.2017.495. Erratum in: *Cell Death Dis*. 2018 Jul 16;9(8):783.

Su, E.P. et al (2018). Effects of titanium nanotubes on the osseointegration, cell differentiation, mineralisation and antibacterial properties of orthopaedic implant surfaces. *The bone & joint journal, England*, v.100-B(1 Supple A), p.9-16.

Sun F, Wan M, Xu X, Gao B, Zhou Y, Sun J, Cheng L, Klein OD, Zhou X, Zheng L (2014). Crosstalk between miR-34a and Notch Signaling Promotes Differentiation in Apical Papilla Stem Cells (SCAPS). *J Dent Res*, 93(6):589-95.

Spadari GS, Zaniboni E, Vedovello SAS, Santamaria MP, Amaral MEC, Santos GMT, et al (2017). A estimulação elétrica melhora a reorganização tecidual durante a movimentação dentária ortodôntica em ratos. *Clin Oral Investiga*, 21(1):111-20. PMID:26917494.

Santos, M. E., & Silveira, C. A. (2019), Mini-implantes interradiculares e mini-implantes extra-alveolares na movimentação ortodôntica. *Revista Científica FUNVIC* 4(2), 31-38.

Sayed D, Abdellatif M (2011). MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev* 91: 827–887.

Soko D, Everts V, de Vries TJ (2014). Role of periodontal ligament fibroblast in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res.*1-8.

Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q (2015). MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget* 6: 8474–8490.

Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G and Hermeking H (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 6(13):1586- 1593.

Terheyden, H. et al (2012). Osseointegration - communication of cells. *Clinical Oral Implants Research*, 23(10), pp. 1127–1135.

Teixeira, LN; Cripa, GE; Lefebvre, L.-P.; de Oliveira, PT; Rosa, AL; Beloti, MM (2012). A influência do tamanho dos poros na expressão do fenótipo osteoblástico em culturas cultivadas em titânio poroso. *Int. J. Oral Maxillofac. Cirurg*, 41, 1097–1101.

Temizel, S. et al (2017). Clinical and radiological investigations of mandibular overdentures supported by conventional or mini-dental implants: A 2-year prospective follow-up study. *The Journal of prosthetic dentistry, United States*, v.117, n.2, p.239-246.e2.

Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, Goel A (2013). Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 105: 849–859.

Trisi P, Rao W, Rebaudi A (1999). Uma comparação histométrica de liso e áspero implantes de titânio em mandíbula humana de baixa densidade. *Implantes Int J Oral Maxillofac*; 14:689-698.

Tyrovola, J. B (2015). The “mechanostat Theory” of Frost and the OPG/RANKL/RANK System. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(12), pp. 2724–2729.

Udagawa N, Takahashi N, Jimi E, et al (1999). Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone.* 25:517-523.

Villela, H., Villela, P., Bezerra, F., Labiossière Júnior, M. A., & Soares, A. P.,(2004) Utilização de mini-implantes para anco-ragem ortodôntica direta. *Innovation Journal*, 8(1), 5-12.

Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 10–13.

Wang N, Tytell JD, Ingber DE (2009). Mecanotransdução à distância: acoplado mecanicamente a matriz extracelular com o núcleo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(1):75–82.

- Winter, Julia; Diederichs, Sven (2011). MicroRNA biogenesis and cancer. *MicroRNA and Cancer*, p. 3-22.
- Wu Y, Ou Y, Liao C, Liang S, Wang Y (2019). Sequenciamento de alto rendimento análise do perfil de expressão de microRNAs e genes-alvo na diferenciação osteoblástica/cementoblástica induzida por força mecânica de células do ligamento periodontal humano. *Am J tradução Res.*11(6):3398–411.
- WU, C. T., Morris, J. R (2001). Genes, genetics, and epi-genetics: A correspondence. *Science* v. 293, n. 5532, p.1103-1105.
- Würdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, Weissleder R, Breakefield XO, Krichevsky AM (2008). miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell*. Nov 4;14(5):382-93.
- Yadav, A. et al (2017). Effect of Ultraviolet Irradiation on the Osseointegration of a Titanium Alloy with Bone. *Contemporary clinical dentistry, India*, v.8, n.4, p.571-578.
- Yagi, R. et al (2017). Characterization and Bone Response of Carbonate-Containing Apatite-Coated Titanium Implants Using an Aqueous Spray Coating. *Materials, Switzerland*, v.10, n.12, p.1416.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:3597-3602.
- Xie, Y. et al (2017). Nano modified SLA process for titanium implants. *Materials Letters*, v.186, p.38-41.
- Yang J, Chen D, He Y, Melendez A, Feng Z, Hong Q, Bai X, Li Q, Cai G, Wang J and Chen X (2013). MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene *atg9*. *Age (Dordr)*. 35(1):11-22.
- Yang Y, Chung MR, Zhou S, Gong X, Xu H, Hong Y, Jin A, Huang X, Zou W, Dai Q, Jiang L (2019). STAT3 controls osteoclast differentiation and bone homeostasis by regulating NFATc1 transcription. *J Biol Chem*, 18;294(42):15395-15407.
- Yu W, Zheng Y, Yang Z, Fei H, Wang Y, Hou X, Sun X, Shen Y (2017) AC-I-Leu-PEI- mediated miR-34a delivery improves osteogenic differentiation under orthodontic force. *Oncotarget*, 30;8(66):110460-110473
- Zhang, P. et al (2017). Ti-Based Biomedical Material Modified with TiOx/TiNx Duplex Bioactivity Film via Micro-Arc Oxidation and Nitrogen Ion Implantation. *Nanomaterials, Switzerland*, v.7, n.10, p.343.
- Zhang B, Yang L, Zheng W, Lin T (2020). MicroRNA-34 expression in gingival crevicular fluid correlated with orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*, 1;90(5):702-706.
- Zanivan DS, Elias CN, Daróz SR (2009). Análise da superfície de fratura de implante osseointegrado e mecanismos envolvidos na cicatrização. *Revista ImplantNews*; 6(1):39-46.

Zweers, J. et al (2015). Clinical and radiographic evaluation of narrow- vs. regular-diameter dental implants: a 3-year follow-up. A retrospective study. *Clinical oral implants research, Denmark*, v.26, n.2, p.149-56.

Zuo C, Wang Z, Lu H, Dai Z, Liu X, Cui L (2013). Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation. *Mol Med Rep*, 8:463-467.

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 04 de Dezembro de 2012

Prezado Professor Antônio Carlos de Oliveira Ruellas

A Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **“Estabilidade de Mini-Implante com Micro-Rosca em Diferentes Condições de Maturação Óssea e de Aplicação de Carga”**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão no dia **04/12/2012**, sob o número de referência **ODONTO013**, este protocolo tem validade de 3 anos.

Atenciosamente;

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comissão de Ética com Uso
de Animais em Pesquisa do CCS

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

*Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -
Cidade Universitária - CEP 21941-590 - Rio de Janeiro - Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br*