

## RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor  
(a), o texto completo desta tese será  
disponibilizado a partir de

22/11/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**ALESSANDRA MANCHINI CARDOSO TARALLO**

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO E DA TERAPIA ANTI-HIPERTENSIVA  
SOBRE O METABOLISMO ÓSSEO: uma avaliação clínica e molecular**

2019

**ALESSANDRA MANCHINI CARDOSO TARALLO**

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO E DA TERAPIA ANTI-HIPERTENSIVA SOBRE O  
METABOLISMO ÓSSEO: uma avaliação clínica e molecular**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos clínicos e laboratoriais de materiais e técnicas endodônticas.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2019

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Renata Falchete do Prado**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Camila Porto de Deco**

Universidade do Vale do Paraíba (Unesp)

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Luciana Sassa Marocchio dos Santos**

Universidade Nove de Julho (Uninove)

Campus de São Paulo

**Prof. Titular Renato Sussumu Nishioka**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Associada Ana Paula Martins Gomes**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 22 de novembro de 2019.

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida: aos meus pais, Ervino da Paz Cardoso e Sonia Aparecida Manchini, pela formação humana, amor, incentivo e apoio incondicional. Ao meu marido, Fernando Lopes Tarallo, que pacientemente compreendeu minha ausência e minha dedicação à minha formação acadêmica; agradeço por cada palavra de incentivo e pelo companheirismo rotineiro. Aos meus irmãos, Renata Manchini Cardoso e Gustavo Benck Cardoso, pela alegria e leveza de cada momento compartilhado. Sou muito agradecida e não conseguiria andar tanto sem o apoio de vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus sogros, Dorival João Tarallo e Mara Lopes Tarallo, agradeço pelo apoio e incentivo durante essa etapa.*

*Aos meus queridos amigos, Felipe de Souza Matos e Laís Landim, pela parceria e cumplicidade; vocês foram fundamentais para a conclusão dessa fase.*

*Aos demais amigos e colegas da pós-graduação da UNESP, pela troca de experiências e aprendizado; pela amizade, motivação e momentos de descontração durante essa jornada.*

*A minha orientadora, Profa. Dra. Renata Falchete do Prado, que me acolheu num período turbulento mas com a sua positividade e determinação me fez acreditar e me incentivar; dotada de um pensamento rápido e objetivo, é uma referência a ser seguida.*

*Aos docentes da área de Endodontia, pelos ensinamentos que me foram concedidos. Em especial, a Profa Associada Ana Paula Martins Gomes, agradeço pelos conhecimentos e por ser uma inspiração pois além de ser uma excelente endodontista e professora, é uma pessoa simples e sempre disposta a ajudar.*

*Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca, Profa Dra Camila Porto de Deco, Profa. Dra Luciana Sassa Marocchio dos Santos e Prof. Titular Renato Sussumu Nishioka, muito obrigada por fazerem parte desse momento importante e acredito que agregarão muito ao meu trabalho.*

*Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, pela disposição em sempre ajudar e compartilhar seus conhecimentos em estatística, além de experiência clínica e científica.*

*A todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, seu corpo docente, direção e administração.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, na pessoa do coordenador Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para execução desta pesquisa.*

*"Pesquisa para constatar, constatando,  
intervenho, intervindo educo e me educo.  
Pesquisa para conhecer o que ainda não  
conheço e comunicar ou anunciar a novidade."*

*Paulo Freire*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 ARTIGO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Artigo – do Prado RF, Tarallo AMC, Vasconcellos LMR, Silva AM, Nogueira Junior L, Saavedra GSFA, Nishioka RS, Borges ALS. Correlações dos achados clínicos e moleculares em pacientes submetidos à cirurgia de implante dentário / <i>Clinical and Molecular findings correlations in patients under dental implant surgery</i></b> .....	<b>12</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Considerações metodológicas</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 Considerações sobre os resultados</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>



Tarallo AMC. Influência do tabagismo e da terapia anti-hipertensiva sobre o metabolismo ósseo: uma avaliação clínica e molecular [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

## RESUMO

Fatores locais e sistêmicos podem interferir no processo de osseointegração porém a susceptibilidade genética à falha do implante osseointegrado permanece desconhecida. Portanto, é de grande interesse realizar uma análise epidemiológica para avaliação da expressão gênica de alguns marcadores moleculares da inflamação e do metabolismo ósseo e correlacioná-los com tabagismo e terapia anti-hipertensão na população submetida à cirurgia de implante dentário, atendida no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos em 2017 e 2018. Foram obtidas 39 amostras ósseas durante a cirurgia de implante, utilizando-se sugador cirúrgico com coletor par osso de 32 pacientes. As reações em cadeia do polimerase em tempo real (RT-PCR) foram executadas para avaliar os genes: fosfatase alcalina (ALP), apolipoproteína, beta Actina, proteína morfogenética II, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, interleucina 6, integrina  $\beta 1$ , fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), osteocalcina, osteonectina, osteopontina, osterix, prostaglandina E2 sintase (PGE2), fator de transcrição relacionado ao Runx 2 (RUNX2) e fator de crescimento transformador beta (TFG- $\beta$ ). Os dados clínicos foram tabulados para caracterização demográfica. A análise estatística utilizando o teste de Mann-Whitney foi realizada com 5% de significância. Como resultados, 17 pacientes foram incluídos no grupo controle, 6 pacientes apresentavam terapia anti-hipertensiva, 3 pacientes fumavam cigarros e 3 pacientes utilizavam terapia anti-hipertensiva e fumavam cigarros e 3 pacientes fumaram cigarros durante pelo menos 10 anos e pararam pelo menos 5 anos atrás. A análise dos dados demonstrou redução dos genes no grupo da terapia anti-hipertensiva, com diferença significativa para RUNX2 e interleucina 6, quando comparado ao grupo controle. No grupo de pacientes fumantes, a transcrição da integrina foi significativamente maior. Os marcadores de diferenciação óssea foram mais expressos no grupo controle, mas sem diferença significativa quando comparados ao grupo fumante.

Palavras-chave: Osseointegração. Tabagismo. Marcadores moleculares. Terapia anti-hipertensiva. Ex-fumantes.

*Tarallo AMC. Influence of smoking and hypertensive therapy on bone metabolism: a clinical and molecular evaluation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

## **ABSTRACT**

Local and systemic factors may interfere in the osseointegration process but genetic susceptibility to osseointegrated implant failure remains unknown. The objective of this research was to perform an epidemiological analysis in which a convenience sample was used to evaluate the gene expression of some molecular markers of inflammation and bone metabolism and to correlate them with smoking and anti-hypertensive therapy in the population underwent dental implant surgery, attended at the São José dos Campos Institute of Science and Technology in 2017 and 2018. Thirty-nine bone samples were obtained during implant surgery, using surgical suction with collector from thirty-two patients. Real time Polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed for evaluate the genes: alkaline phosphatase (ALP), apolipoprotein, beta actin, bone morphogenetic protein II (BMP II), bone sialoprotein (BSP), type I Collagen, interleukin 6, integrin  $\beta$ 1, macrophage colony stimulating factor (M-CSF), osteocalcin, osteonectin, osteopontin, osterix, prostaglandin E2 synthase (PGE2), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and transforming growth factor beta (TFG- $\beta$ ). Clinical data were tabulated for demographic characterization. Statistical analysis using Mann-Whitney tests was performed at 5% of significance. As results, 17 patients were include in control group, 6 patients under antihypertensive therapy, 3 patients smoke cigarettes and 3 patients under antihypertensive therapy and smoke cigarettes and three patients smoked cigarettes during at least for 10 years and stop at least 5 fives ago. The follow up of prosthetic rehabilitation and implant success will be explored in another research. Data analysis demonstrated downregulation of the genes in the hypertensive group, with significant difference for RUNX2 and Interleukin 6, when compared to the control group. In the group of smoking patients, the integrin transcript was significantly higher. Bone differentiation markers were more expressed in the control group, but without significant difference when compared to the smoker group.

*Keywords: Osseointegration. Smoking. Molecular marker. Antihypertensive therapy. Former smokers.*

## 1 INTRODUÇÃO

Com o advento da implantodontia, a utilização dos implantes osseointegrados como parte do planejamento nas reabilitações orais possibilitou a realização de uma reabilitação mais satisfatória aos pacientes. Sua eficácia como método terapêutico, associada a protocolos cirúrgicos e protéticos apropriados, vem sendo constatada na literatura demonstrando índices de sucesso satisfatórios, apresentando, em média 94,4% de taxa de sucesso, podendo variar de 76,0% a 98,7% (Mavrogenis, 2009).

A osseointegração, que pode ser definida como uma conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo vivo e a superfície de um implante submetido à carga funcional, foi observada em 1956 pela primeira vez, quando Per-Ingvar Brånemark (ortopedista sueco) percebeu em um estudo da circulação sanguínea de coelhos, que as câmaras de titânio que ele usava em seus experimentos ficavam presas às tíbias dos animais. Mais tarde, com longo e minucioso trabalho de pesquisa, o autor demonstrou como o tecido ósseo aceitava e incorporava peças de titânio sem reações adversas (Brånemark et al., 1977).

Alguns fatores locais e sistêmicos podem influenciar na osseointegração, assim faz-se necessário identificá-los para que o profissional clínico possa estar atento a um planejamento mais adequado com menores riscos de falhas, evitando complicações e morbidades ao paciente (Hartmann et al., 2017).

O tabagismo apresenta forte associação tanto com a severidade da doença periodontal quanto com a perda óssea peri-implantar. Em um cigarro estão presentes mais de 4.000 toxinas. Estas incluem monóxido de carbono, substâncias cancerígenas (nitrosaminas) e substâncias psicoativas como a nicotina, que é considerada a substância farmacologicamente mais ativa e passível de ser absorvida pela mucosa oral (Chen, 2016).

Constata-se na literatura resultados desfavoráveis dos implantes em pacientes fumantes sendo estes atribuídos às alterações do sistema imunológico e da cicatrização. Observa-se que o tabaco proporciona efeitos citotóxicos na função dos fibroblastos (adesão e proliferação), interfere na quimiotaxia e na fagocitose dos neutrófilos, e influencia negativamente os linfócitos na produção de imunoglobulina. Além disso, relatou-se que o fumo aumenta os níveis de carboxihemoglobina, fibrinogênio e hemoglobina, o que resulta em uma alteração na integridade e no remodelamento do tecido conjuntivo e, assim, prejudica a cicatrização e a resposta do hospedeiro diante de uma agressão (Esposito et al., 1998).

A hipertensão arterial é um importante fator de risco para a morte prematura em todo o mundo, principalmente por causar complicações cardiovasculares. Indivíduos hipertensos apresentam metabolismo anormal de cálcio resultando em concentrações inferiores desse mineral, de vitamina D, magnésio e altas concentrações de hormônio da paratireoide (PTH), prejudicando a qualidade e a densidade do tecido ósseo (Tibazarwa, Damasceno, 2014).

Foi constatado importante avaliar a qualidade do tecido ósseo em pacientes hipertensos, em uso de terapia anti-hipertensiva, visando prever a capacidade de formação óssea em situações como a osseointegração após a instalação de implantes (Mulinari-Santos et al., 2018).

A quantificação relativa da expressão de mRNA pela transcrição reversa em real tempo da reação em cadeia de polimerase (RT-qPCR) transformou-se em um importante método de escolha para estudos da expressão de genes em vários organismos (Thellin et al., 2009). Estudos como o de Slotte et al. (2012) que propuseram uma metodologia como ferramenta de diagnóstico não-invasiva para o monitoramento de genes específicos da reparação óssea e avaliação do tecido peri-implante, complementando as avaliações clínicas e Hartmann et al. (2017) conduziram estudo molecular avaliando marcadores ósseos no processo de perda de próteses por afrouxamento asséptico, ambos utilizaram a RT-PCR como método para análise da expressão gênica.

A susceptibilidade genética à falha do implante osseointegrado permanece desconhecida. Portanto, julgamos de grande interesse realizar uma análise epidemiológica na qual uma amostra de conveniência serviu para avaliar a

expressão gênica de alguns marcadores moleculares da inflamação e do metabolismo ósseo em pacientes que receberam implantes dentários. Objetivou-se também correlacionar a expressão gênica com o tabagismo e a terapia anti-hipertensiva na população atendida no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos em 2017 e 2018.

### 3.2 Considerações sobre os resultados

O padrão epidemiológico ouro para estudos de prevalência é a probabilidade ou amostra aleatória. Neste trabalho, decidimos realizar uma amostra de conveniência, composta de amostras de pacientes de tratamento hospitalar, apesar do fato de apresentarem várias limitações, sendo a mais importante a falta de representatividade, ou seja, os resultados de tais estudos não podem ser generalizados para toda a população. No entanto, esse método é muito mais eficiente em termos de custo do que usar uma amostra aleatória.

O artigo de Becker et al. (2015) foi utilizado como uma inspiração, fornecendo os percentuais de 57,14% de fumantes que perderam ao menos um dos implantes no estudo, contrapondo 16,9% de não fumantes que perderam ao menos um dos implantes. Já que sabemos que fumantes perdem mais implantes, gostaríamos de mostrar geneticamente o porquê, por meio deste estudo epidemiológico.

Foram coletadas amostras de 40 pacientes, entretanto após análise molecular foi determinada a exclusão de 8 pacientes pois estes não apresentaram o gene constitutivo (Colágeno I) expressivo. Os 32 pacientes estudados foram divididos em grupos: a) Controle (17), b) Terapia anti-hipertensiva (6), c) Fumantes (3), d) Fumantes e Terapia anti-hipertensiva e e) Ex-fumantes (3).

A alta prevalência de pacientes em terapia anti-hipertensiva neste estudo motivou a inclusão desse grupo nas comparações. Os dados foram muito interessantes, uma vez que, no grupo de terapia anti-hipertensiva, as transcrições foram reduzidas, ocorrendo diferenças significativas na expressão de interleucina 6 e RUNX2; também foram reduzidas no grupo fumantes.

Também exploramos a expressão gênica em ex-fumantes, para observar seu comportamento após interromper o vício, e em um grupo de tabagistas e hipertensos. No entanto, o último grupo não expressou os genes de osterix, osteocalcina, apolipoproteína e PGE2 e não foram observadas diferenças significativas quando este grupo foi comparado ao grupo controle.

A comparação entre grupo controle e grupo hipertensivo e fumante apresentou significância limítrofe ( $P = 0.0647$ ) para a prostaglandina E2 sintase. Já os fumantes apresentaram maior expressão dessa citocina inflamatória. Estes dados foram esperados, uma vez que as citocinas inflamatórias têm um papel fisiológico no metabolismo ósseo. No entanto, altos níveis podem levar ao aumento da perda óssea, resultando em um desfecho menos favorável ou na falha do implante (Campos et al., 2005). Inversamente, IL-6 foi diminuída no grupo fumante e significativamente aumentada em ex-fumantes, comparando com fumantes. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem o antagonista do receptor da interleucina IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-1326 (Opal, DePalo, 2000). Parece razoável considerar a hipótese de que o tabagismo prejudica a homeostasia, já que diminuiu a expressão desta citocina anti-inflamatória de forma reversível, em caso interrupção do vício fumar.

A comparação entre o grupo tabagista e o ex-fumante apresentou significância limítrofe ( $P = 0,0992$ ) para TGF- $\beta$ 1. Já que o grupo controle expressou menos TGF- $\beta$ 1, soa como um padrão restaurativo da expressão. A formação óssea envolve várias etapas do recrutamento de células precursoras de osteoblastos para calcificação da matriz extracelular, e uma variedade de citocinas, fatores de crescimento e outras macromoléculas participam desses eventos (Campos et al., 2005). O fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ 1) é uma citocina pleiotrópica e onipresente envolvida no desenvolvimento ósseo e na remodelação (Saiganesh et al., 2019). Os osteócitos remodelam diretamente sua matriz perilacunar/canalicular controlando a qualidade óssea através da sinalização TGF- $\beta$  (Dole et al., 2017).

O efeito oposto ocorreu em BMP II, osteocalcina, osteopontina, Osterix, RUNX 2 e Sialoproteína óssea, que foram reduzidos no grupo fumante, comparando com o grupo controle, e aumentados quando o paciente deixou de fumar (significância borderline para osteocalcina e osteopontina,  $p = 0,0806$  para ambos). A expressão destas várias proteínas caracteriza o fenótipo ósseo, é induzida durante a diferenciação osteoblástica em cascata, sugestivo de fatores regulatórios múltiplos (Rodan, Noda, 1991).

A transcrição da integrina  $\beta$ 1 foi significativamente maior no grupo tabagista, comparando-se ao grupo controle. É um padrão gênico importante, uma vez que as

integrinas são extremamente importantes na função osteoclástica. Osteoclastos se ligarão à matriz óssea por meio de integrinas durante a reabsorção óssea. O bloqueio da integrina  $\beta 1$  resultou na inibição da reabsorção (Helfrich et al., 1996). O grupo hipertensivo e fumante apresentou maior nível de integrina  $\beta 1$ , comparando-se ao grupo controle, porém sem significância estatística.

A última evidência reabsortiva foi a desregulação do M-CSF no grupo de fumantes quando comparado ao grupo controle; no grupo hipertensivo e tabagista em comparação ao grupo controle e no grupo ex-fumante em comparação ao grupo fumante. A formação de osteoclastos envolve a interação entre células estromais e pré-osteoclastos que são derivados das linhagens dos monócitos. O M-CSF estimula a reabsorção do osso somente quando é dependente da geração de osteoclastos novos. O M-CSF não parece ter nenhum efeito na atividade de osteoclastos maduros. O mecanismo da ação pôde ser direto em precursores do osteoclastos ou indireto em vias de sinalização acessórias que influenciam a geração do osteoclastos (Corboz et al., 1992).

O RUNX 2 foi significativamente reduzido no grupo hipertensivo comparando com o grupo controle. Acreditamos que esse achado é extremamente importante com base na conclusão de Kim et al. de que a desregulação de Runx-2, BMP-II, receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo gama (pparg-2) e aumento da razão RANKL/OPG foram correlacionados com o início do perda óssea marginal peri-implante (Kim et al., 2019). Os autores isolaram e cultivaram células estromais mesenquimais alveolares humanas derivadas de osso obtidos pela perfuração durante a colocação do implante para fazer esta conclusão.

Nesse presente estudo, as amostras foram coletadas da região anterior da maxila (12,5%), da mandíbula (8,34%), posterior de maxila (35,41%) e posterior de mandíbula (43,75%), portanto com predominância do tipo ósseo I. Um parâmetro de extrema importância e que também influencia a osseointegração e o sucesso do tratamento com implantes é a análise óssea da área receptora do implante. A classificação de Misch 1990 é a mais encontrada na implantodontia e pode ser encontrada na literatura como: tipo I – osso cortical denso; tipo II – cortical denso e osso trabeculado grosso; tipo III – cortical óssea fina e trabeculado fino; tipo IV – osso trabecular fino. Como para a implantodontia é necessário uma boa estabilidade



primária, mas com irrigação sanguínea suficiente para que o metabolismo local não seja prejudicado e facilite a cicatrização e consequente osseointegração, os tipos ósseos I e IV desta classificação não são bons candidatos à colocação de implantes. O primeiro, por possuir uma cortical muito densa, dificulta a irrigação sanguínea, apesar de ser excelente para a estabilidade primária. O segundo, apesar da boa irrigação, por ser totalmente de osso trabecular fino, é desvantajoso em relação à estabilidade primária.

Apesar de todos os resultados significativos aqui apresentados, assumimos que as repetições em outras populações são obrigatórias para melhor elucidar o papel desses genes na influência da suscetibilidade individual à perda do implante dentário. No futuro, a terapêutica individual poderia ser desenvolvida, aumentando as taxas de sucesso do implante.

## REFERÊNCIAS\*

- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004, Aug 1;64(15):5245-50. PMID:15289330. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
- Anstaett OL, Brownlie J, Margaret E, Collins CJT. Validation of endogenous reference genes for RT-qPCR normalisation in bovine lymphoid cells (BL-3) infected with Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Vet Immunol Immunopathol.* 2010 Oct 15;137(3-4):201-7. Epub 2010 Jun 1. doi:10.1016/j.vetimm.2010.05.006
- Applied Biosystems [Internet]. Guide for Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments [cited 2019 Apr 04]. Disponível em: <http://appliedbiosystems.gene-quantification.info>, 2007
- Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Ö Hman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plastic Reconstruct Surg.* 1977;16:1-132
- Bustin AS, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods.* 2013 Nov;10(11):1063-7. PMID:24173381 doi: 10.1038/nmeth.2697
- Cheng LL. Limited evidence suggests higher risk of dental implant failures in smokers than in nonsmokers. *J Am Dent Assoc.* 2016 Apr;147(4):292-4. doi: 10.1016/j.adaj.2016.01.003. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26851818
- Hartmann ES, Kohler MI, Huber F, Redeker JI, Schmitt B, Schmitt-Sody M. Factors regulating bone remodeling processes in aseptic implant loosening. *J Orthop Res.* 2017;35:248-57. PMID:27116254 doi: 10.1002/jor.23274
- Kenkel CD, Aglyamova G, Alamaru A, Bhagooli R, Capper R. Development of gene expression markers of acute heat-light stress in reef-building corals of the genus *Porites*. *PLoS One.* 2011;6(10):e26914. doi: 10.1371/journal.pone.002691.
- Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 2013 Nov;54(4):391-406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
- Ling DJ. qPCR: Robust and Rapid Analysis of RT-qPCR Data in SAS. *Plos One.* 2012;7(1):e29788. doi: 10.1371/journal.pone.0029788

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- Luu-The V, Paquet N, Calvo E, Cumps J. Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction. *Biotechniques*. 2005;38:287–93. doi: 10.2144/05382RR05
- Matz MV, Wright RM, Scott JG. No Control Genes Required: Bayesian Analysis of qRT-PCR Data. *Plos One*. 2013 Aug;8(8):e71448. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071448>
- Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2009 Apr-Jun;9(2):61-71. PMID:19516081.
- Misch C. Classifications and treatment options of the completely edentulous arch in implant dentistry. *Dent Today*. 1990 Oct;9(8):26, 28-30. PMID:2132103
- Mulinari-Santos G, Batista FRS, Kirchweger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Impl Res*. 2018;29:1126–34. doi:10.1111/clr.13376
- Poletto R, Cheng HW, Meisel RL, Richert BT, Marchant-Forde JN. Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a beta-adrenoreceptor agonist. *Brain Res*. 2011;1381:11–20. doi:10.1016/j.brainres.2010.11.035
- Poletto R, Steibel JP, Siegford JM, Zanella AJ. Effects of early weaning and social isolation on the expression of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of piglets. *Brain Res*. 2006;1067:36–42. doi:10.1016/j.brainres.2005.10.001
- Regier N, Frey B. Experimental comparison of relative RT-qPCR quantification approaches for gene expression studies in poplar. *BMC Mol Biol*. 2010 Aug 11;11:57. doi: 10.1186/1471-2199-11-57
- Stephen A, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
- Taylor SC, Mrkusich EM. The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2014;24(1):46-52. doi: 10.1159/000356189
- Tibazarwa KB, Damasceno AA. Hypertension in developing countries. *Can J Cardiol*. 2014 May;30(5):527-33. doi: 10.1016/j.cjca.2014.02.020
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies.

Analytical Biochemistry. 2002 Oct;309( 2):293-300 [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00311-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00311-1)