

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Mariana Correa Rossi

EFEITOS BIOLÓGICOS INDIRETOS
DISPARADOS POR IMPLANTES DENTÁRIOS
COMERCIAIS EM OSTEÓBLASTOS: *ESTUDO
IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP.

Botucatu
Novembro de 2014.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

Mariana Correa Rossi

EFEITOS BIOLÓGICOS INDIRETOS
DISPARADOS POR IMPLANTES DENTÁRIOS
COMERCIAIS EM OSTEÓBLASTOS: *ESTUDO
IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP.

Orientador Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Botucatu
Novembro de 2014

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 ADESÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIAIS: PRIMEIRO PASSO PARA OSTEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES.....	7
1.2 METABOLISMO CELULAR.....	7
1.3 TRANSDUÇÃO DE SINAIS.....	8
1.4 ATIVAÇÃO TRANSIENTE DE VIAS DEPENDE DO BALANÇO ENZIMÁTICO QUINASES E FOSFATASES.....	8
1.5 PROTEÍNAS FOSTASES VERSUS PROTEÍNAS QUINASES.....	9
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAIS.....	11
3.1. BIOMATERIAL.....	11
3.2. CULTURA DE CÉLULAS.....	12
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL:.....	12
4. MÉTODOS.....	12
4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE IMPLANTES DENTÁRIOS.....	12
4.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE FAK, Rac e Cofilina:.....	13
4.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
6. CONCLUSÃO:.....	17
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

RESUMO

As tendências atuais na terapia com implantes têm incluído a modificação de suas superfícies utilizando ferramentas de nanotecnologia e princípios de bioengenharia, aumentando seu desempenho quando implantado. Mesmo com algum avanço nesta área de modificações de superfície, ainda pouco se sabe quanto aos efeitos indiretos exercidos pelos implantes em células que compõem o tecido hospedeiro e que ainda não estão em contato direto com suas superfícies. Assim, decidiu-se verificar o efeito do meio condicionado de implantes comerciais em proteínas responsáveis pela adesão celular, em osteoblastos. Primeiro, avaliou-se se os implantes eram capazes de liberar substâncias tóxicas, capazes de lesar as células; para isso fez-se uso do ensaio de MTT, uma metodologia clássica na literatura e recomendada pela ISO para testes de citotoxicidade. Esses resultados mostraram não haver qualquer efeito citotóxico em 24 horas. Posteriormente, seguindo este mesmo racional experimental, coletaram-se amostras biológicas destas células para investigar o comportamento de FAK, Rac-1 e Cofilina, proteínas chave na composição da via de transdução de sinais responsáveis por mecanismos de adesão e morfologia celular. Os resultados evidenciam pequenas variações, sobretudo na fosforilação, sugerindo que os implantes testados favorecem, mesmo de forma indireta (sem contato), mecanismos de adesão celular, o que indica ser um ponto bastante positivo quanto a uma osteointegração mais eficiente.

Descritores: Osteoblastos; Adesão Celular; Implantes Dentários.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular	10
Figura 2: Implantes dentários avaliados neste projeto	11
Figura 3: Dados referentes ao Biomaterial utilizado.	12
Figura 4: Ensaio de citotoxicidade	15
Figura 5: Dosagem de proteínas	16
Figura 6: Resultados de Western Blotting.	17

1. INTRODUÇÃO

O entendimento da biologia do osso tem se tornado cada vez mais necessário para os dias atuais. Nas próximas décadas, o custo social da saúde no Brasil deverá enfrentar um crescimento populacional potencialmente perigoso, onde a evolução do perfil demográfico aponta para o aumento progressivo da idade média das populações humanas. Gera-se, assim, a necessidade de garantir cada vez mais a qualidade da vida através de um custo e carga social aceitáveis. Neste sentido, o número mundial de pacientes susceptíveis a receber terapia ortopédica associada com ferramentas de bioengenharia aproxima-se a um gasto anual de 40 bilhões de dólares, com o valor de biomateriais usados em terapias de 10 bilhões de dólares. Atualmente, a produção de biomateriais no Brasil é muito limitada e, em muitos casos, inexistente (p.ex. bio-polímeros), o que posiciona o mercado interno médico-odontológico a uma total dependência de sua importação.

Hoje em dia, a medicina regenerativa tem ganhado merecido destaque por oferecer alternativas terapêuticas sofisticadas e multifatoriais, visando regenerar o tecido lesado ou totalmente perdido. É de comum entendimento que enxertos ósseos são requeridos para o tratamento de perdas ósseas de origem traumática ou patologias (como ressecção de tumores ósseos). O padrão de tratamento atual é o osso autógeno obtido de áreas intra-orais e da crista ilíaca, o que reflete em uma significativa morbidade e custo para o paciente, além de afetar diretamente sistema de saúde público. Torna-se, assim, imprescindível o desenvolvimento e avaliação de biomateriais inteligentes capazes de estimular as células osteoprogenitoras que permitam mimetizar aquelas características osteogênicas do enxerto autógeno.

Sabe-se que para uma boa estabilidade mecânica do implante ósseo é necessário haver um bom contato entre a superfície do material e células do hospedeiro. É certo que parâmetros adicionais agregam novas características durante o desenvolvimento de novos materiais ou superfícies, aumentando o desempenho do material e diminuição do tempo de reabilitação do paciente.

1.1 ADESÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIAIS: PRIMEIRO PASSO PARA OSTEÓINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES

Atualmente, a adesão celular é alvo de intensa pesquisa nos processos biológicos bem como nas condições patológicas envolvendo interações célula-célula e célula-matriz. Recentes estudos têm demonstrado que a adesão celular participa de maneira ativa na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose. Por conseguinte, a adesão celular possui tanto efeito sinalizador como morfogenético o que faz jus ao seu impacto pleiotrópico, da biologia normal e patologia.

Durante o reparo de lesões ósseas através de implantes, sabe-se que a perfeita interação de osteoblastos na superfície de materiais implantados garante sua rápida osteointegração, principalmente pelos processos seqüenciais de proliferação e diferenciação. Estes mecanismos celulares são rigorosamente controlados por mecanismos de transdução de sinais, os quais respondem a estímulos diversos, como as propriedades químicas das superfícies de materiais (Bertazzo et al., 2009; Bertazzo et al., 2010). Neste sentido, foi centrado esforços para conhecer os mecanismos de transdução de sinais que regem a adesão de osteoblastos sobre superfícies físico-quimicamente conhecidas, para que possam servir de parâmetros de análises para outros testes, onde não se conhece a capacidade adesiva de determinados materiais. Em estudo recente, nossos resultados mostraram que nas primeiras 2 horas pós-plaqueamento o metabolismo dos osteoblastos culmina em diferentes vias de sinalização responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto, com sinais oriundos da ativação de proteínas como MAPKp38 e FAK (Zambuzzi et al., 2009) que são excelentes exemplos de proteínas envolvidas no processo da transdução de sinais. Embora algum progresso tenha sido alcançado neste sentido, muito ainda precisa ser descoberto sobre estes mecanismos em outras condições, para que haja uma transferência direcionada de conhecimento ao setor de desenvolvimento de materiais.

1.2 METABOLISMO CELULAR

A regulação do metabolismo é fundamental para que um organismo possa responder de modo rápido e eficiente a variações das condições ambientais, nutricionais ou ainda a condições adversas como traumas e patologias. A regulação metabólica é feita pela modulação de enzimas regulatórias de processos metabólicos-chaves, de tal modo que se possa ativar ou inibir reações químicas específicas para cada situação resultando

em respostas biológicas adequadas. Para garantir a eficiência necessária, o organismo lança mão de vários tipos de regulação enzimática que podem ocorrer simultaneamente. A regulação da função de proteínas ocorre por vários mecanismos tais como controle da expressão gênica, compartimentalização, moduladores alostéricos, interação proteína-proteína e modulação covalente. Em relação à modulação covalente, em células eucarióticas, a fosforilação/desfosforilação de proteínas, catalisada por proteínas quinases e fosfatases, é o principal mecanismo de regulação. Portanto, estas duas famílias de enzimas são desempenham papel de destaque no controle de vias de sinalização.

1.3 TRANSDUÇÃO DE SINAIS

Na biologia, transdução de sinal pode ser definida como um processo finamente regulado que permite que todo tipo celular seja capaz de responder a agentes específicos presentes no seu microambiente, culminando em diferentes respostas, como diferenciação, proliferação, migração, adesão, sobrevivência ou morte. Em outras palavras, os mecanismos de transdução de sinais se referem ao movimento de sinais de fora para dentro da célula.

Para tal, cascatas de reações químicas são ativadas transientemente as quais requerem a participação de vários componentes tais como proteínas (como canais iônicos, reconhecimento e enzimas), íons (como o cálcio e magnésio), lipídios (como o 1,2 diacilglicerol), além de outras moléculas, como (AMPC), localizados em diferentes compartimentos celular. Assim, mecanismos de transdução de sinais desempenham papéis cruciais para o bom funcionamento do organismo, uma vez que são essenciais para a comunicação célula-célula, resposta celular ao ambiente, homeostase intracelular, etc. de um modo geral, a transdução de sinal em organismos multicelulares é crucial para regular suas respostas fisiológicas frente a eventos externos determinados. Este mecanismo pode ser simples, como a resposta a acetilcolina, onde seus receptores constituem canais que, mediante interação com o ligante, permite o movimento de íons e altera o potencial elétrico destas células; ou mais complexos, quando há ativação/inibição de proteínas por modificações covalentes. Estas modificações são, em maioria, frutos de fosforilações sítio-específicas de proteínas, acoplando as interações receptor-ligante aos outros muitos eventos intracelulares em forma de cascatas de ativação/inibição.

1.4 ATIVAÇÃO TRANSIENTE DE VIAS DEPENDE DO BALANÇO

ENZIMÁTICO QUINASES E FOSFATASES

Mecanismo de ativação transiente de proteínas perfaz uma estratégia natural capaz de modificar covalentemente proteínas-alvo, alterando sua estrutura tridimensional de acordo com suas demandas. Estes mecanismos promovem a atividade/inibição de enzimas regendo o tempo e direção de determinadas cascatas de sinais. Neste cenário, quinases são as proteínas responsáveis pela incorporação do grupamento fosfato em seus substratos fisiológicos, alterando seu status de atividade. É condição *sine qua non* a presença de ATP, molécula responsável pela doação do grupamento fosfato. Em outras palavras, podemos assumir que as quinases, de uma forma geral, são transferases responsáveis pela transferência de fosfato da molécula de ATP para seu substrato. Estes eventos incluem fosforilações em resíduos específicos de seus substratos: tirosina e serina/treonina, classificando estas quinases em 2 grupos: Proteína Tirosina Quinases e Proteína Ser/Ther Quinases, respectivamente. Cabe reforçar que estes mecanismos representam modificações pós-traducionais capazes de modular as conformações estruturais de seus substratos.

1.5 PROTEÍNAS FOSTASES VERSUS PROTEÍNAS QUINASES

As células eucarióticas respondem aos diversos estímulos do microambiente através da modulação de vias de transdução de sinais, a qual é dependente da modificação pós-tradução de proteínas. Dentre as diferentes modificações pós-tradução, a fosforilação/ desfosforilação é a principal forma de modulação covalente rápida e reversível de proteínas (Manning *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004). A fosforilação de uma proteína pode criar um novo sítio de reconhecimento para interações proteína-proteína, controlar a estabilidade protéica e, mais importante, pode regular a atividade enzimática. Desta forma, a fosforilação de resíduos de tirosina, serina e treonina mediada pelo balanço entre a ação de proteínas quinases e proteínas fosfatases (**Figura 1**), é reconhecida como fator crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celulares. Nesse contexto, mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar conseqüências graves, que incluem neoplasias, diabetes, obesidade, inflamação, doenças imunológicas, neuro-degenerativas e doenças parasitárias (Ferreira *et al.*, 2006).

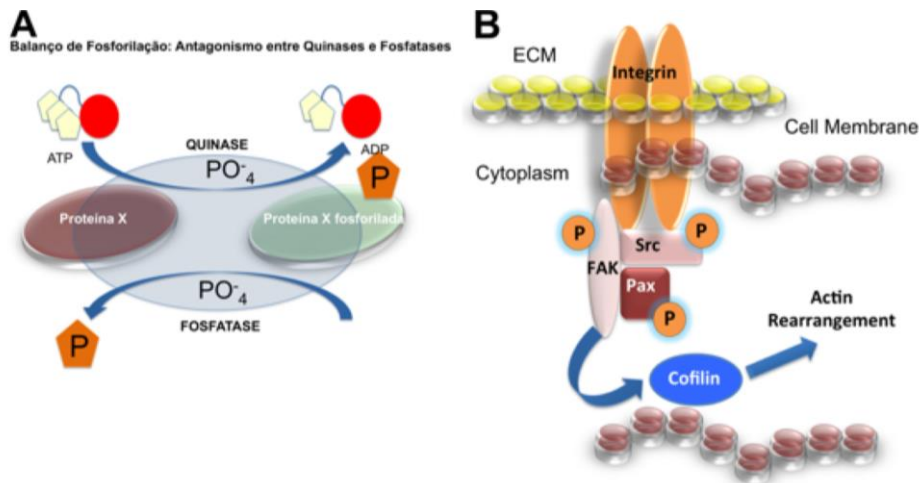


Figura 1: Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular. A) Note os papéis antagônicos de quinases e fosfatases: Enquanto as quinases transferem um grupamento fosfato do ATP para seu substrato fisiológico, gerando um produto fosforilado e ADP, as fosfatases fazem justamente o papel inverso, desfosforilando moléculas fosforiladas. Este mecanismo é finamente regulado e utilizado pelos mecanismos de transdução de sinais intracelulares. Em outras palavras, as células utilizam estas modificações covalentes pós-traducionais para regular as cascatas de sinalização, bem como definir seu tempo de ação. B) Note-se que as integrinas ligam o ambiente extracelular com o citoesqueleto, ancorando as células. Após a ativação das integrinas, moléculas de sinalização são recrutadas para estruturas de adesão focal que promovem a fosforilação de FAK, Src, paxilina e, ao final desta cascata, a cofilina. Em resposta a estímulos, cofilina promove a regeneração dos filamentos de actina, rearranjando-os. Estas alterações do citoesqueleto são responsáveis por adaptações celulares a superfícies diferentes. Adaptado de Zambuzzi et al., 2011.

Como descrito anteriormente, o avanço na prática da biologia permitiu que cientistas avançassem em diferentes direções, alcançando níveis do conhecimento que capazes de impactar o desenvolvimento de novos biomateriais. Por sua vez, a atividade de proteínas quinases é responsável pela regulação de muitos processos biológicos, tais como diferenciação, proliferação celular e apoptose, através de cascatas de sinalização que levam a diferentes efeitos celulares. Portanto, explorar o efeito de diferentes substratos no fenótipo diferencial de osteoblastos pode ter importantes implicações no entendimento dos mecanismos pelos quais as células respondem a diferentes substratos, auxiliando no desenvolvimento de novos biomateriais como eficazes substitutos artificiais do osso.

2. OBJETIVO: O objetivo geral deste foi compreender se efeitos indiretos de implantes dentários comerciais de titânio afetam a proteínas envolvidas com vias de transdução de sinais responsáveis pela adesão de osteoblastos. Especificamente, pretendeu-se:

- Analisar a citotoxicidade do material utilizado. Utilizou-se um método clássico para sua determinação (MTT) aplicado em linhagens celulares de osteoblastos;
- Com o meio condicionado, estabelecemos o perfil de expressão e ativação de proteínas envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto: FAK (Y397), Rac-1 e Cofilina (Zambuzzi et al., 2011).

3. MATERIAIS

3.1. BIOMATERIAL: Os implantes dentários (**Figura 2**) foram doados pela empresa S.I.N. Implantes (São Paulo, SP, Brasil), através de colaboração científica firmada com seu Diretor Científico, Dr. Fábio Bezerra.



Figura 2: Implantes dentários avaliados neste projeto. Implante STRONG SW Morse. Imagem Representativa. Fonte: www.dabiatlante.com.br.



Figura 3: Dados referentes ao Biomaterial utilizado.

3.2. CULTURA DE CÉLULAS: Utilizou-se da linhagem MC3T3-E1 (pre-osteoblastos, subclone 4). Resumidamente, após obtenção do tapete celular, as células foram submetidas e cultivadas em meio de cultura adequado para as duas linhagens contendo antibióticos (100U/ml penicilina, 100mg/ml estreptomicina), e 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Laborelin, Pinhais, PR, Brazil). Durante todo o experimento as células foram mantidas a 37°C e à atmosfera de 5% de CO₂.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL: Os implantes (n=6) foram incubados em meio de cultura adequado por 24h (ISO 10993-5), sem Soro Fetal Bovino, a fim de estabelecermos o meio condicionado. Este meio condicionado contém moléculas/partículas potencialmente liberadas pelos implantes. O meio condicionado foi utilizado para tratar as células, com o intuito de conhecermos sua citotoxicidade e capacidade de modular a ativação de proteínas envolvidas com a adesão celular.

4. MÉTODOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE IMPLANTES DENTÁRIOS: As células MC3T3 - E1 foram semeadas a 50000 células / poço em placas de cultura de 24 poços. A citotoxicidade dos implantes foi posteriormente avaliada através de um teste colorimétrico um sal de tetrazolium, solúvel em água e que pode ser utilizado em ensaios quantitativos de células de mamíferos, o qual recebe o nome de (3- (4,5- dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide). Resumidamente, O MTT, que tem sua estrutura molecular em forma de anel, é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan de coloração violeta e insolúveis. Para que seja possível a leitura do resultado, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido em um solvente específico (isopropanol acidificado – HCL 0,04N em isopropanol) e a leitura da intensidade de cor da solução é feita em um leitor de microplacas com um filtro de 570nm. A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para a amostragem de sobrevivência e proliferação celular. É clivado por todas as células vivas, metabolicamente ativas, que foram testadas, mas não pelas células mortas ou por eritrócitos. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células (população homogênea). Células ativas produzem mais formazan

que as células adormecidas o que poderia permitir a mensuração até mesmo na ausência da proliferação.

A principal vantagem do ensaio colorimétrico é a rapidez com que as amostras podem ser processadas. O substrato não interfere com a mensuração do produto e podem ser encontradas condições nas quais os componentes do meio não interferem. Isso permite o ensaio ser lido sem qualquer remoção ou com qualquer passo de lavagem, o que aumenta a velocidade do ensaio e ajuda a minimizar a variabilidade entre as amostras.

Antes da leitura das amostras, o meio de cultura foi suavemente removido e 1 ml de solução de MTT (1 mg de MTT / ml de meio de cultura) foi adicionada a cada poço, mantido durante 3h a 37 ° C. Após a incubação, o meio foi removido e o formazan formado foi suspenso em 1 mL de DMSO. Assim, foi possível a leitura da absorbância das amostras.

4.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE FAK, Rac e Cofilina: As células foram tratadas com o meio condicionado e, após 24h, foram lisadas para estudo do envolvimento de FAK, Rac-1 e Cofilina por western blotting. Após serem lisadas (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Tween 20, 0,25% desoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM *O*-Vanadato, 1 mM NaF, e inibidores de proteases [1 µg/mL de aprotinina, 10 µg/mL de leupeptina e 1 mM 4-cloridrato de fluoreto aminoetil benzosulfonila] por 2h em gelo. Os extratos protéicos foram centrifugados e a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry. Aos extratos foi adicionado tampão de amostra na proporção 1:1 (Tampão de amostra: 2X dodecil sulfato de sódio (SDS), 100 mM Tris-HCl [pH 6,8], 200 mM de ditiotreitol (DTT), 4% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 20% de glicerol. Os extratos celulares, correspondendo a 3×10^5 células, foram resolvidos por eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (PAGE), o qual define-se como sendo o movimento de partículas carregadas eletricamente em um meio líquido elétrico, sob a influência de um campo elétrico. Dentro do compartimento a onde ocorre o movimento dessas partículas, existe uma solução tampão que é usada no preenchimento de uma coluna, denominada de coluna capilar, feita de Sílica, local a onde ocorre o processo de eletroforese (separação). Para tal movimento das partículas, é necessário a existência de eletrodos, que ficam instalados dentro dos reservatórios, que fazem conexão elétrica e a aplicação do campo elétrico através da coluna.

Quando a amostra é introduzida em um lado da coluna, em especial no lado anódico, seus componentes migram com a aplicação do potencial. A direção e a velocidade de migração dependem da carga e do tamanho da molécula e no final do processo são transferidas para membranas de Transferência de fluoreto de polivinidileno (PVDF).

Antes do processo, as células foram bloqueadas em 1% de leite desnatado e incubados overnight a 4°C com anticorpos primários específicos. Após a lavagem em TBS-Twen 20 (0,05%), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase por 1h. A detecção foi feita através por quimioluminescência.

4.3 ANÁLISES DOS RESULTADOS: As bandas obtidas pela técnica de western blotting foram analisadas através da metodologia densitométrica (Image pro-puls). Os valores arbitrários foram confrontados empregando-se o teste t-student, onde todas as medidas *serão* de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística será considerada para valores de $p < 0,05$. Os ensaios paramétricos serão submetidos ao teste de normalidade e, dependendo do resultado, submetidos à análise de variância ou teste de Kruskal-Wallis, considerando significativas diferenças quando p for $< 0,05$. Os gráficos foram construídos pelo programa GraphPad Prism Software, Versão 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO: Inicialmente, decidimos verificar se os meios condicionados de implantes dentários comerciais exerciam alguma citotoxicidade. O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos ao nível celular. Este teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais. A liberação de substâncias tóxicas pelo material pode lesar as células ou reduzir a taxa de crescimento celular da cultura. Assim, incubamos estes implantes em meio de cultivo celular por 24h (0,1g/mL), como instruído pela ISO 10993-5. Após este período, tratamos osteoblastos que foram plaqueados em placas de cultivo de 24 poços, na densidade de 50.000 células/mL. Após tratamento, aplicamos a metodologia de redução do MTT (Mossman, 1983) para verificar o potencial citotóxico do meio condicionado dos implantes. A técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazam, produto formado pela redução de tetrazolium MTT (Mossman, 1983). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial. Nossos resultados mostraram que não houve nenhum indício de citotoxicidade neste modelo experimental, uma vez que nossos resultados mostraram um comportamento semelhante entre o grupo tratado e seu respectivo grupo controle, onde as células foram tratadas por meio de cultivo convencional (**Figura 3**).

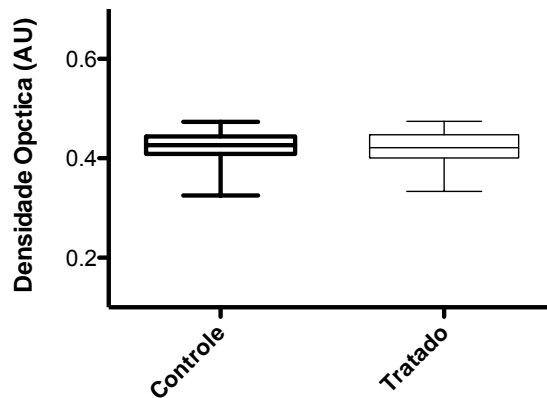


Figura 4: Ensaio de citotoxicidade. Osteoblastos foram tratados por 24h com meio condicionado a partir de implantes comerciais nacionais. Para avaliar a citotoxicidade, após o tratamento, as células foram incubadas por 4h com meio de cultivo contendo sal de MTT (1mg/mL). Após este período, todo o meio de cultivo foi aspirado e o azul de formazam formado foi dissolvido em álcool absoluto e a absorbância medida em 550 nm.

Uma vez identificada a não toxicidade do meio condicionado por implantes comerciais, decidimos investigar se este modulava o comportamento de proteínas intracelulares de osteoblastos capazes de orquestrar mecanismos biológicos de rearranjo de citoesqueleto. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado nos últimos anos que, durante adesão de osteoblastos, há um intenso rearranjo dos filamentos de actina que, por sua vez, define uma melhor adesividade ao substrato ao mesmo tempo que há alteração morfológica das células. Assim, se o meio condicionado de implantes modular estes mecanismos em osteoblastos, poderiam interferir, de forma positiva ou negativa, nas células que estão ao redor de implantes, impactando mecanismos importantes de osteointegração e sua consequente reabilitação do paciente.

Assim, tratamos osteoblastos com meio condicionado por 24h e coletamos amostras para análise de FAK, Rac-1 e Cofilina, por Western Blotting (WB). Antes das análises por WB, dosamos a concentração de proteínas: nossos resultados mostraram que não haver grande variação (**Figura 5**); esta etapa é importante e decisiva para que apliquemos no Western Blotting a mesma quantidade de proteína para o grupo controle e tratado.

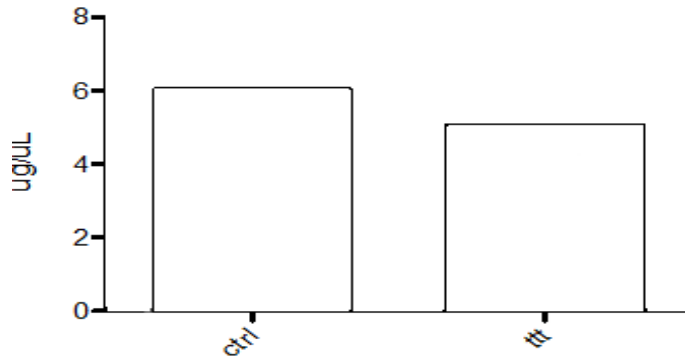


Figura 5: Dosagem de proteínas. Após as células serem tratadas com o meio condicionado (ttt) e meio convencional (CTRL) por 24h, as células foram lisadas com tampão de lise (descrito em Materiais e Métodos). Após, um volume de 10 uL foi separado para a dosagem de proteínas (em duplicata, sendo 5 uL para cada dosagem) utilizando kit de dosagem da Bio-Rad (*Bio-Rad DC Protein Assay Kit II*) e fazendo leitura de Absorbância à 660 nm.

Os resultados referentes ao envolvimento de FAK, Rac-1 e cofilina estão apresentados na **Figura 5**. Nossos resultados a partir do western blotting mostraram que houve pequena variação entre o grupo condicionado e seu respectivo controle (onde as células foram mantidas em meio de cultivo convencional) quanto a fosforilação de FAK. Posteriormente, ao analisar o comportamento de expressão de Rac-1 verificamos não haver diferença. Curiosamente, cofilina estava menos fosforilada em células tratadas com o meio condicionado, significando que componentes liberados pelos implantes podem atuar de maneira a estimular mecanismos de adesão de osteoblastos, através do rearranjo do citoesqueleto. Cofilina, quando fosforilada na serina 03 está inibida, ou seja, quanto menos fosforilada, temos maiores indícios de atividade. Sabe-se que células aderem ao substrato através da interação entre integrinas e componentes da matriz extracelular (MEC). Quando os complexos de adesões focais são formados, eles são acompanhados por moléculas de sinalização intracelular e proteínas adaptadoras. Quinase de adesão focal (FAK) é um dos componentes que organiza a adesão focalizada da célula. Após a ativação da integrina moléculas sinalizadoras são recrutadas nas estruturas de adesão focal, promovendo fosforilação transitória de FAK em diversos resíduos de tirosina (Y). Além disso, com base na literatura atual, podemos especular que uma boa interação entre

células e superfícies podem ser preditas através dos níveis de fosforilações destas PTKs. O resultado desta via de sinalização, como já discutido antes, é disparado via integrina, chega a outras moléculas como Rac-1 e posteriormente cofilina, comprometendo o rearranjo dos filamentos de actina.

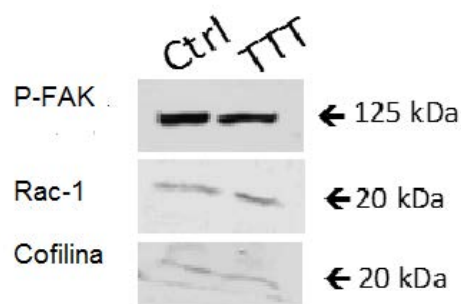


Figura 6: Resultados de Western Blotting. Após as células serem tratadas com o meio condicionado (ttt) e meio convencional (CTRL) por 24h, as células foram lisadas com tampão de lise adequado e as proteínas dosadas pelo Kit da Bio-Rad (ver Figura 4). Após a mesma concentração de proteínas foram aplicadas (60 ug/lane) em gel de bis-Acrilamida 10 %. Após corrida sob voltagem constante de 100V, as proteínas foram transferidas em membrana de PVDF por 45 minutos, sob corrente de 400 mA. As membranas foram especificamente incubadas com anticorpo primário (1:1000) contra as proteínas em questão por 12 horas a 4°C. Após, estas membranas foram lavadas e incubadas com Anticorpo secundário (1:5000) por 1h a temperatura ambiente. Após, foram incubadas com ECL (Pierce) e reveladas em filmes de Raios-x utilizando revelador e fixador Kodac em sala escura.

6. CONCLUSÃO: Em conjunto, nossos resultados mostram que o meio condicionado a partir de implantes dentários comerciais não apresenta caráter citotóxico, além de intensificar mecanismos de sinalização celular responsáveis pela adesão, em osteoblastos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17(5):536-43.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004 Jun 11;117(6):699-711.

- Anamika, K & Srinivasan, N (2007) Comparative kinomics of plasmodium organisms: unity in diversity. *Protein Pept. Lett.*, 14:509-517.
- Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials *Biomaterials*, 21:667–81, 2000.
- Aranda, B, Achuthan, P, Alam-Farouque, Y, Armean, I, Bridge, A, Derow, C, Feuermann, M, Ghanbarian, At, Kerrien, S, Khadake, J, Kerssemakers, J, Leroy, C, Menden, M, Michaut, M, Montecchi-Palazzi, L, Neuhauser, N, Orchard, S, Perreau, V, Roechert, B, Van Eijk, K, Hermjakob, H (2009) The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Res., Database Issue* 38:525-531.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ferreira CV, Bertran CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Dec;21(12):1411-3.
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010 Jul 1;78(2):177-84.
- Buser D, Broggini N, Wieland M. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83(7):529-33.
- Diks, S, Kok, K, O'toole, T, Hommes, D, Van Dijken, P, Joore, J, Peppelenbosch, M (2004) Kinome profiling for studying lipopolysaccharide signal transduction in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Biol. Chem.* 279:49206-49213.
- Ferreira CV, Justo GZ, Souza AC, Queiroz KC, Zambuzzi WF, Aoyama H, Peppelenbosch MP. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochimie.* 2006 Dec;88(12):1859-73.
- Gibas, C & Jambeck, P (2001) *Developing Bioinformatics Computer Skills*. 1ed. Sebastopol: O'Reilly.
- Gomase, V & Tagore S (2008) Kinomics. *Current Drug Metabolism*, 9:255-258.
- HUNTER, T & COOPER, JA (1985) Protein-Tyrosine Kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:897-930.
- <http://graduacao.iqsc.usp.br/files/CE-CFBiodisciplinaAI2.pdf>.
- Hunter, T & Johnson, SA (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods*, 2:17-25.
- Irish, J, Hovland, R, Krutzik, P, Perez, O, Bruserud, Ø, Gjertsen, B, Nolan, G (2004) Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. *Cell*, 118:217-228.
- Jensen, Lj, Kuhn, M, Stark, M, Chaffron, S, Creevey, C, Muller, J, Doerks, T, Julien, P, Roth, A, Simonovic, M, Bork, P, Von Mering, C (2009) STRING 8 – a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res., Database Issue* 37:412-416.
- Locci P, Marinucci L, Lilli C, Belcastro S, Staffolani N, Bellocchio S, Damiani F, Becchetti E. Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res A* 2000; 51(4):561-8
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-34.

- Milani R, Ferreira CV, Granjeiro JM, Paredes-Gamero EJ, Silva RA, Justo GZ, Nader HB, Galembeck E, Peppelenbosch MP, Aoyama H, Zambuzzi WF. Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. *J Cell Biochem.* 2010 Apr 1;109(5):957-66.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
- Puckett SD, Lee PP, Ciombor DM, Aaron RK, Webster TJ. Nanotextured titanium surfaces for enhancing skin growth on transcutaneous osseointegrated devices. *Acta Biomater.* 2010 Jun;6(6):2352-62.
- Sohn SH, Jun HK, Kim CS, Kim KN, Chung SM, Shin SW, Ryu JJ, Kim MK. Biological responses in osteoblast-like cell line according to thin layer hydroxyapatite coatings on anodized titanium. *J Oral Rehabil.* 33(12):898-911, 2006
- Song JH, Kim JH, Park S, Kang W, Kim HW, Kim HE, Jang JH Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab.* 26(2):138-142, 2008
- Trojani C, Weiss P, Michiels J, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carles GF, Rochet N. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 26: 5509–5517, 2005.
- van Baal, J, Diks, S, Wanders, R, Rygiel, A, Milano, F, Joore, J, Bergman, J, Peppelenbosch, M, Krishnadath, K (2006) Comparison of kinome profiles of Barrett's esophagus with normal squamous esophagus and normal gastric cardia. *Cancer Res.*, 66:11605-11612.
- Webster TJ, Ejiófor JU. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 2004;25(19):4731-9.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2000;21(17):1803-10.
- Xenarios, I, Rice, Dw, Salwinski, L, Baron, Mk, Marcotte, Em, Eisenberg, D (2000) DIP: the Database of Interacting Proteins. *Nucleic Acids Res.*, 28:289-291.
- Xiao J, Zhou H, Zhao L, Sun Y, Guan S, Liu B, Kong L. The effect of hierarchical micro/nanosurface titanium implant on osseointegration in ovariectomized sheep. *Osteoporos Int.* 2011 Jun;22(6):1907-13.
- Zambuzzi WF, Coelho PG, Alves GG, Granjeiro JM. Intracellular signal transduction as a factor in the development of "smart" biomaterials for bone tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Jun;108(6):1246-50.
- Zambuzzi WF, Milani R, Teti A. Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: lessons from mice. *Biochimie.* 2010 Apr;92(4):327-32.
- Zambuzzi WF, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. Src activity modulation by the Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatase during osteoblasts differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 22(5-6):497-506, 2008.

Zambuzzi WF, Yano CL, Cavagis AD, Peppelenbosch MP, Granjeiro JM, Ferreira CV. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem.* 322(1-2):143-50, 2009.

Zambuzzi, WF (2008) Mecanismos de Transdução de Sinal Envolvidos com a Diferenciação de Osteoblastos e Osteócitos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.