

Mariana Correa Rossi

Titânio liberado por implantes dentários promovem melhor performance na adesão de pre-osteoblastos aumentando a liberação de H₂O₂ e modulando a fosforilação de FAK/Cofilina

MARIANA CORREA ROSSI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração *Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal*.

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Titânio liberado por implantes dentários promovem melhor
performance na adesão de pre-osteoblastos aumentando a
liberação de H₂O₂ e modulando a fosforilação de
FAK/Cofilina**

MARIANA CORREA ROSSI

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, *Campus* de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de
concentração *Biotecnologia aplicada à saúde
humana e animal*.

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rossi, Mariana Correa.

Titânio liberado por implantes dentários promovem melhor performance na adesão de pre-osteoblastos aumentando a liberação de H₂O₂ e modulando a fosforilação de FAK/Cofilina / Mariana Correa Rossi. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 20801017

1. Células - Adesão. 2. Titânio. 3. Implantes dentários.
4. Fosforilação. 5. Peróxido de hidrogênio.

Palavras-chave: Adesão celular; EROs; PTK; PTP; Sinalização celular.

DEDICATÓRIA

Para minha Família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe, pai e irmã, que estiveram sempre ao meu lado me apoiando.

Ao Evandro Monaes Alves, que se fez presente nos últimos anos, me apoiando e me incentivando. Espero tê-lo sempre comigo.

Ao Professor Willian Fernando Zambuzzi, que me proporcionou todos esses anos de trabalho, e conhecimento, mostrando a importância do respeito e do trabalho em equipe.

Aos meus colegas do laboratório (técnicos, alunos de graduação, mestrados e doutorandos) pela assistência no desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Valber de Albuquerque Pedrosa, e Pedro de Magalhães Padilha juntamente com seus respectivos laboratórios, pela parceria e auxílio durante o trabalho.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu (CME/IBB) junto à Professora Margarida Juri Saeki pelo apoio e atenção durante a coleta de dados.

Ao programa de Pós- Graduação em Biotecnologia.

Há pelo menos um problema filosófico pelo qual todos os homens pensantes se interessam: o problema de como compreender o mundo onde vivemos (e, portanto a nós mesmos, que fazemos parte dele, e o nosso próprio conhecimento).

Karl Raimund Popper

RESUMO

O uso de implantes com sua superfície modificada (ataque ácido, usinado) em pacientes que sofreram algum tipo de lesão no decorrer do tempo ou até mesmo por conta do envelhecimento são largamente utilizados. Para isso, conta-se com o auxílio de diversas áreas, como a nanotecnologia, bioengenharia e físico-química, que dão suporte para o desenvolvimento destes biomateriais aumentando seu desempenho quando implantado. No entanto, por mais que haja avanço nesta área de desenvolvimento e produção, o conhecimento sobre como o organismo responde e quais os estímulos produzidos indiretamente por esses biomateriais em células ainda são motivos de discussão. Dessa maneira, decidimos investigar o efeito do meio condicionado de implantes comerciais em proteínas responsáveis pela adesão celular, em pré-osteoblastos. Inicialmente, avaliamos se os implantes eram capazes de liberar substâncias tóxicas, através do ensaio colorimétrico de MTT. Esses resultados mostraram não haver qualquer efeito citotóxico em 24 horas. Posteriormente, através da metodologia de cristal violeta, que detecta células aderidas, mostramos que há um aumento significativo na adesão celular em resposta ao meio condicionado nas primeiras 24 horas de adesão, quando comparados ao imediato grupo controle. Além disso, mostramos o comportamento de pre-osteoblastos aderidos sobre superfícies de implantes dentários através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Fazendo uso de diferentes metodologias, mostramos que, em resposta ao meio condicionado, pre-osteoblastos aumentam os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), culminando na peroxidação lipídica e modulação na atividade de PTP-1B, uma fosfatase capaz de manter os níveis de fosforilação de FAK, aumentado em resposta ao meio condicionado, impactando a adesão celular. Assim, concluímos que o implantes a base de titânio promovem, indiretamente, uma melhor performance na adesão de pre-osteoblastos modulada pela sinalização de EROs.

Descritores: Adesão Celular; Sinalização Celular; EROs; PTP; PTK; Implantes Dentários; Osteoblastos; Osteointegração.

ABSTRACT

The use of implants with a modified surface (acidic attack, Machined) in patients who have suffered some kind of lesion in course of time or even age account are extensively used. For this, it counts with the help of different areas, such as nanotechnology, bioengineering and physical chemistry, that support for the development of these biomaterials increasing their performance when deployed. However, while there progress in this area of development and production the knowledge about how the body responds and what stimuli indirectly produced by these biomaterials cells are still discussing reasons. This way, we decided to investigate the effect of conditioned medium from commercial implants proteins responsible for cellular adhesion, in pre-osteoblasts. Initially, we assessed whether the implants were able to release toxic substances through the colorimetric MTT assay. These results showed no cytotoxic effect in 24 hours. Later, by crystal violet methodology that detects adhered cells, show that there is a significant increase in cell adhesion in response to the conditioned medium in the first 24 hours of adhesion, when compared to the control group immediate. Also, we show the pre-osteoblasts adhered behavior on dental implant surfaces by Scanning Electron Microscopy (SEM). Utilizing different methodologies we showed that, in response to the conditioned, pre-osteoblasts increase levels of reactive oxygen species (ROS), resulting in lipid peroxidation and modulation of the PTP-1B activity a phosphatase capable of maintaining levels FAK phosphorylation increased in response to the conditioned media impacting cell adhesion. Thus, we conclude that the implants titanium base promote, indirectly, better performance in adherence to pre-osteoblasts modulated by ROS signaling.

Keywords: Cell Adhesion; Cell Signaling; Dental implants; Osteoblasts; Osseointegration; ; PTK; ROs.

SUMÁRIO

RESUMO	12
1.1. CARACTERÍSTICAS DE IMPLANTES À BASE DE TITÂNIO	14
1.2 ADESÃO CELULAR	15
1.3 ADESÃO DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIAIS: PRIMEIRO PASSO PARA OSTEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES	17
1.4. ADESÃO CELULAR EM IMPLANTES DENTÁRIOS	18
1.5. METABOLISMO CELULAR	19
1.6. TRANSDUÇÃO DE SINAIS	19
1.7. ATIVAÇÃO TRANSIENTE DE VIAS DEPENDE DO BALANÇO ENZIMÁTICO QUINASES E FOSFATASES	21
1.8. EFEITOS CELULARES DESENCADEADOS POR ESTRESSE OXIDATIVO	22
2. OBJETIVO	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. BIOMATERIAL E ANTICORPOS	24
3.2. CULTURA DE CÉLULAS	26
3.3. DESENHO EXPERIMENTAL:	26
3.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE IMPLANTES:	28
3.5. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE FAK, Rac, Cofilina e PTP1B:.....	29
3.6. ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR:	29
3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	29
3.8. ENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE H ₂ O ₂	30
3.9. ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL	31
3.11. ANALISE DOS DADOS	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. IMPLANTES LIBERAM ELEMENTOS TITÂNIO QUANDO EM SOLUÇÃO AQUOSA.	32
4.2. MEIO CONDICIONADO DE IMPLANTE NÃO PROMOVE CITOTOXICIDADE.	34
4.3. MEIO CONDICIONADO POR IMPLANTES PROMOVE UMA MAIOR ADESÃO DE PRE-OSTEÓBLASTOS.	35
4.4. COMPORTAMENTO DE PRE-OSTEÓBLASTOS SOBRE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES.	36
4.5. MEIO CONDICIONADO PROMOVE ATIVAÇÃO DA VIA FAK-RAC-1-COFILINA.	38
4.6. MEIO CONDICIONADO PROMOVE <i>DOWN</i> FOSFORILAÇÃO DE PTP-1B.	

.....	39
4.7. TITÂNIO LIBERADO POR IMPLANTES PROMOVE UM AUMENTO NO ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRE-OSTEOBLASTOS	40
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAS: Espectroscopia de Absorção Atômica
ASTM: Sociedade Americana para Testes e Materiais
ADP: Adenina difosfato
AMPc: Adenina monofosfato cíclico
ATP: Adenina trifosfato
AuNPs: Nanopartículas de Ouro
C: Carbono
CpTi: Ligas de Titânio Comercialmente Puro
CTRL: Controle
DDP: Diferença de Potencial
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
ECL: Eletroquimioluminescente
EDS: Espectrometria de Raios X por Energia Dispersiva
EDX: Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
FAAS: Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
FAK: Quinase de Adesão Focal
HRP: Enzima Peroxidase
MC: Meio Condicionado
MC3T3-E1: Linhagem Celular precursora de um osteoblasto derivado do Tecido Muscular da Calvaria de Camundongos
MEC: Matriz Extra Celular
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT: (3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide)
PEG: Poli Etileno Glicol
p-PTP1B: Proteína Tirosina Fosfatase 1-B Fosforilada
PTKs: Proteínas Tirosina Quinases
PTP1B: Proteína Tirosina Fosfatase 1-B
PVDF: *Polyvinylidene difluoride*
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
SDS: Sulfato de Sódio Dodecyl em Gel de Eletroforese de Poliacrilamida
SFB: Soro Fetal Bovino
SLA: Jateamento com areia e ataque ácido
SRC: Sarcoma Homology protein
TBS: Solução Salina Tamponada com Tris
Ti: Titânio
Ti6Al4V: Liga de Titânio
WB: Western Blot

LISTA DE FIGURAS

Fig.1: Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular.	21
Fig.2: Implantes dentários avaliados neste projeto.	25
Fig.3: Desenho Experimental.	28
Fig.4: Implantes liberam Ti ao meio.	34
Fig.5: Meio condicionado por implantes não promove citotoxicidade.	35
Fig.6. Ti liberado pelo implante dentário afeta significativamente a adesão de pre-osteoblastos.	36
Fig.7: Comportamento de pre-osteoblastos na superfície de implantes.	37
Fig.8. Meio condicionado de implante dentário promove uma aumento na adesão celular através da ativação do eixo FAK→Rac-1→Cofilin.	39
Fig.9. PTP-1B está <i>down</i>-fosforilada em resposta ao meio condicionado.	40
Fig.10. Curva de Calibração plotada pela Redução da Corrente Vs Tempo de leitura das amostras.	42
Fig.11. Ti induz Estresse Oxidativo em MC3T3-E1.	43
Fig.12. Ti induz peroxidação lipídica em MC3T3-E1.	44

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, aumentando, assim, efeitos na saúde, como é o caso de doenças que afeta a população idosa, tais como osteoporose, além de fraturas decorrentes de queda. Sabe-se que 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. Neste cenário, há necessidade de garantir a qualidade da vida desta população a custo social aceitável.

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 (Langer & Vacanti, 1993), sendo 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. Este procedimento acaba retardando o reingresso deste paciente à suas atividades de rotina. 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. Esse raciocínio aplica-se ao desenvolvimento de materiais osteosubstitutos, bem como a materiais metálicos, com superfícies bioativas, capazes de estabelecer uma boa performance na interface implante/tecido do hospedeiro, como ocorre em implantes.

Sabe-se que para uma boa estabilidade mecânica do implante ósseo, por exemplo, é necessário haver um bom contato entre a superfície do material e células do hospedeiro, favorecendo um metabolismo celular adequado e neo-deposição de tecidos ao redor do implante. 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, como discutido antes.

Assim, aventamos que implantes dentários influencia o tecido reacional, interferindo no desempenho biológico. Para trabalharmos este raciocínio, decidimos investigar proteínas intracelulares envolvidas com adesão celular e responsável pelo rearranjo do citoesqueleto.

1.1. CARACTERÍSTICAS DE IMPLANTES À BASE DE TITÂNIO

Os implantes osteointegráveis têm sido utilizados para reabilitação de pacientes nas últimas décadas com índices crescentes de sucesso clínico e evidência científica, impactando positivamente na qualidade de vida dos mesmos, do ponto de vista social, funcional e estético. Dentro desta realidade, o conhecimento aprofundado da biomecânica e biologia peri-implantar possibilitou a utilização de novos conceitos e tecnologias para preservação do nível ósseo ao redor dos implantes, aumentando assim o prognóstico de sucesso clínico, sobretudo em casos de alta demanda estética ou funcional.

A composição química da superfície de implantes de titânio pode ser diferente, dependendo de sua composição e de seu tratamento. A composição e suas propriedades são elementos críticos para a adsorção de proteínas e adesão celular. Os implantes são normalmente feitos de titânio e/ou de ligas de titânio comercialmente puro. O titânio comercialmente puro (cpTi) tem vários graus de pureza (graduado de 1 a 5), sendo esta pureza caracterizada pela presença de oxigênio, carbono e teor de ferro (Steinemann, 1998). A maioria dos implantes comerciais são confeccionados a base de grau 4 cpTi, uma vez que é mais resistente do que outros graus; no entanto, ligas de titânio composta por Ti6Al4V (grau 5) apresentam maiores propriedades de fadiga do que o titânio puro (Steinemann, 1998). Além disso, propriedades da superfície dos implantes afeta sua hidrofiliabilidade. Atualmente sabe-se que superfícies hidrofílicas são mais desejáveis do

que as hidrofóbicas em vista de suas interações com os fluidos biológicos, células e tecidos (Buser *et al.*, 2004). Em um estudo em animais, Buser *et al.* descobriram que uma superfície hidrofílica tratada com ataque ácido, ou por jateamento (SLA), apresentaram maior eficiência de contato osso-implante (Buser *et al.*, 2004, Carlsson *et al.*, 1989, Wennerberg *et al.*, 1991)

Por outro lado, ainda se tratando de superfície de implantes, há relatos de que a rugosidade da superfície de implantes de titânio afeta a taxa de osteointegração e a sua fixação biomecânica (Cochran *et al.*, 1998; Wennerberg *et al.*, 1998). A rugosidade da superfície pode ser dividida em três níveis, dependendo da escala: macro, micro e topologias de tamanho nano. O nível macro está relacionado com a implantação da geometria do tipo parafuso, onde vários relatos demonstram que tanto a fixação precoce e em longo prazo pode ser melhorado através de um perfil de alta rugosidade em comparação com superfícies lisas (Buser *et al.*, 1991; Gotfredsen *et al.*, 1995; Wennerberg *et al.*, 1996). O perfil micro de implantes é definido pela máxima rugosidade da sua superfície. A principal indicação clínica da utilização de um implante com uma superfície áspera é a baixa qualidade e o volume do osso hospedeiro. Nestas situações clínicas desfavoráveis, o contato precoce e de alta interação osso-implante torna-se mais adequado. Nos casos de baixo volume ósseo ou limitações anatômicas, os implantes projetados com uma superfície áspera têm demonstrado resultados clínicos superiores às superfícies lisas (Testori, *et al.*, 2001; Conner *et al.*, 2003). Já a superfície nanométrica desempenha um papel importante na adsorção de proteínas, na aderência de células osteoblásticas e, assim, a taxa de osteointegração (Brett *et al.*, 2004). No entanto, a rugosidade da superfície nanométrica apresenta dificuldades em se produzir com tratamentos químicos. Além disso, a topografia da superfície nano para a adsorção seletiva de proteínas que conduzem à adesão de células osteoblásticas e aposição óssea rápida é ainda pouco conhecida.

1.2 ADESÃO CELULAR

A adesão celular está envolvida em vários fenômenos naturais tais como a embriogênese, manutenção da estrutura tecidual, cicatrização de feridas, resposta imune, metástases, bem como a integração do tecido ao biomaterial. A biocompatibilidade de biomateriais está relacionada com suas propriedades capazes de

estabelecer fino contato com células do tecido hospedeiro. Assim, características da superfície dos materiais tais como sua topografia (micro- ou nanométrica), composição química, dentre outros fatores, desempenham função essencial na adesão de osteoblastos ao implante. Atualmente se tem discutido muito este momento inicial do comportamento celular à superfícies de implantes biomédicos: hoje se sabe que o comportamento celular está intimamente ligado às proteínas séricas adsorvidas à superfície dos implantes, estabelecendo um filme capaz de determinar a adesão celular. Desta forma, a adesão celular é resultado secundário regido pela composição e propriedades deste filme (Gemini-Piperni *et al.*, 2014; Zambuzzi *et al.*, 2014).

Após estes mecanismos, adesão celular e seu espalhamento pertencem à "primeira fase" de interações de células/materiais e a qualidade desta será determinante para que a célula se prolifere e se diferencie apropriadamente quando em contato com o implante, seguindo a regência dos mecanismos que antecedem e decidem sua osteointegração. Assim, torna-se essencial, para a eficiência e qualidade na implantação ortopédica ou dentária, que os implantes estabeleçam uma interação completa entre a superfície do material e o tecido ósseo hospedeiro sem a formação de um tecido fibroso, responsável pela falha do dispositivo implantado uma vez que, neste caso, não há forças mecânicas adequadas para sua função.

Neste caminho, o recente desenvolvimento da engenharia de tecidos no campo da pesquisa médico-odontológica torna possível prever a associação de células e/ou proteínas autólogas capazes de promover a adesão de células com material osteocondutor, criando constructos osteoindutores ou materiais híbridos, com finalidade pré-determinada. Assim, a compreensão dos mecanismos de adesão celular e particularmente dos osteoblastos na aderência sobre biomateriais é essencial para otimizar a interface osso / biomaterial, impactando no tempo de reparo tecidual ao redor de implantes. Ao nosso entendimento e em particular aos biomateriais utilizados em tecido ósseo, isto inclui a compreensão de moléculas envolvidas na adesão de células ósseas, particularmente com relação à interação com esses materiais, mas também a necessidade de melhor compreender as reações envolvidas por estas células quando aplicado os materiais *in vivo* (Anselme, 2000).

Embora estudos em animais ainda sejam necessários no estudo de novos biomateriais, sobretudo quanto ao caráter sistêmico do modelo, nosso grupo tem

trabalhado na busca por métodos alternativos *in vitro*, capazes de diminuir o uso destes animais de experimentação. Trata-se de um modelo utilizando cultivo de células ósseas *in vitro*, buscando conhecer propriedades de biomateriais tais como citotoxicidade e mecanismos intracelulares capazes de promover boa interação célula/superfície. Neste sentido, temos investigado mecanismos globais de transdução de sinais envolvidos com a resposta a diferentes superfícies; fruto deste empenho, temos proposto proteínas capazes de participar de vias importantes de sinalização celular, sobretudo àquelas envolvidas com adesão de osteoblastos, como é o caso de FAK, Src e Paxilina (Zambuzzi *et al.*, 2011; Gemini-Piperni *et al.*, 2014)

1.3 ADESÃO DE OSTEOLASTOS SOBRE MATERIAIS: PRIMEIRO PASSO PARA OSTEOLNTEGRACÃO 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 gênica referente à 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 patológica.

Durante procedimentos clínicos envolvendo implantes, sabe-se que a perfeita interação de osteoblastos com a superfície destes materiais garante sua rápida osteointegração, principalmente pelos processos sequenciais de adesão, proliferação e diferenciação (Lu *et al.*, 2012). 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, nosso grupo tem centrado esforços para conhecer os mecanismos de transdução de sinais regentes a adesão de osteoblastos sobre superfícies físico-quimicamente conhecidas, para que possamos estabelecer parâmetros de análises, 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 com o intuito de auxiliar o setor de desenvolvimento de materiais biomédicos e, para isso, há necessidade de conhecer proteínas envolvidas com o metabolismo celular.

1.4. ADESÃO CELULAR EM IMPLANTES DENTÁRIOS

Nos últimos 20 anos, o número de procedimentos de implantes tem aumentado no mundo todo, movimentando bilhões de dólares anuais. O sucesso clínico da implantação de tais materiais está diretamente relacionado com a sua rápida osteointegração. Além disso, a geometria e a topografia da superfície dos implantes são essenciais para o sucesso em longo prazo dos mesmos. Estes parâmetros são associados com técnicas cirúrgicas delicadas, que são um pré-requisito para uma evolução clínica de sucesso (Albrektsson *et al.*, 1981). Após a implantação, os implantes de titânio interagem com os fluidos e tecidos biológicos, com a formação da aposição óssea direta na superfície do biomaterial. Após o estágio inicial da osteointegração, ambos os fatores biomecânicos protéticos e juntamente com a higiene do paciente são decisivos para o sucesso em longo prazo. Existem dois tipos de resposta após o implante: o primeiro tipo envolve a formação de uma suave cápsula de fibrose tecidual ao redor do implante, não garantindo adequada fixação biomecânica, levando à sua falha clínica. O segundo tipo de resposta está relacionada com o contato direto osso-implante, sem aquela camada de tecido conjuntivo, estabelecendo, neste caso, mecanismos de osteointegração. Esta fixação biológica é considerada um pré-requisito para o sucesso destes implantes em longo prazo.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa tem se esforçado em conhecer mecanismos biológicos envolvidos com a deposição óssea justaposta à superfície de implantes, sobretudo quanto aos mecanismos iniciais envolvidos com a adsorção de proteínas séricas e adesão celular inicial. Estamos certos de que o implante continuamente interage com o tecido do hospedeiro disparando respostas biológicas constantes e, desta maneira, conhecer mecanismos biológicos neste contexto é de extrema relevância para compreensão das alterações teciduais que ocorrem no tecido reacional. Para isso, propomo-nos avaliar os efeitos do meio condicionado por implantes em mecanismos de adesão de pré-osteoblastos.

1.5. METABOLISMO CELULAR

Metabolismo celular compreende uma rede de reações bioquímicas capaz de responder, de forma eficiente, a seu microambiente; esta resposta pode ser em virtude de um sinal autócrino, parácrino e/ou endócrino. Em outras palavras, trata-se de um mecanismo capaz de ocorrer de modo rápido e eficiente, onde sua regulação é feita pela modulação de enzimas regulatórias de processos metabólicos-chaves, de tal modo que se possa ativar ou inibir reações 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 (Voet *et al.*, 2002). Em relação à modulação covalente, em células eucarióticas, a fosforilação/desfosforilação de proteínas, catalisada por proteínas quinases e fosfatases, respectivamente, é o principal mecanismo de regulação. Portanto, estas duas famílias de enzimas desempenham papel de destaque no controle de vias de transdução de sinais.

1.6. 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 (Ferreira, Milani & Zambuzzi, 2014). 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 e homeostase intracelular. (Ferreira, Milani & Zambuzzi, 2014).

Um progresso considerável tem sido feito ao longo dos últimos anos na elucidação dos mecanismos pelos quais os sinais extracelulares são transduzidos via receptores de superfície celular, os quais provocam mudanças na expressão de genes e, portanto determinam o funcionamento celular e, conseqüentemente, a homeostase do organismo. Dessa forma, alterações nas vias de sinalização, normalmente decorrentes de mutações, podem estar relacionadas com a gênese de várias patologias, tais como câncer, doenças neurodegenerativas, autoimunidade, obesidade e diabetes (Ferreira, Milani & Zambuzzi, 2014).

A seguir daremos alguns exemplos de alterações de vias de sinalização que ocorrem em tumores em decorrência de alterações em mediadores com diferentes localizações celulares: membrana plasmática, citoplasma e núcleo. No caso específico do câncer, a desregulação de vias de transdução de sinal é decorrente de alterações em genes chamados de supressores ou promotores de tumores. Estas alterações gênicas fazem com que os seus produtos ganhem ou percam função (Ferreira, Milani & Zambuzzi, 2014). O resultado disto será a perda da capacidade da célula em controlar o processo de divisão. Diante da complexidade metabólica celular é de se esperar que o espectro de proteínas que possam estar associadas com o câncer seja enorme. Dessa forma, proteínas de membrana, proteínas extracelulares, citosólicas, presentes em organelas e no núcleo podem estar envolvidas na tumorigênese (Ferreira, Milani & Zambuzzi, 2014).

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.

1.7. ATIVAÇÃO TRANSIENTE DE VIAS DEPENDE DO BALANÇO ENZIMÁTICO QUINASES E FOSFATASES

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 proteica 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 (Fig.1), é reconhecida como fator crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celulares. Enquanto quinases são aquelas enzimas transferases que transferem grupamento fosforil de uma molécula de ATP a seu substrato fisiológico, modificando-o covalentemente, as fosfatases exercem atividade antagônica, regulando mecanismos de desfosforilação.

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).

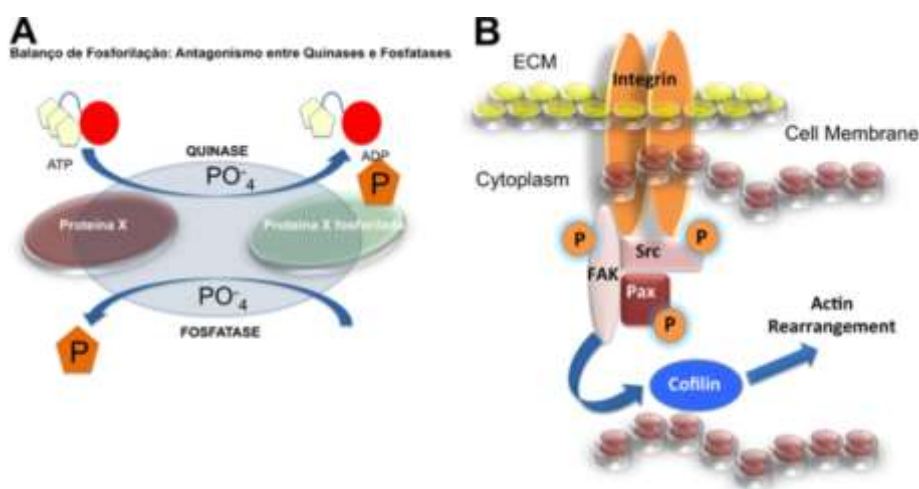


Fig.1: Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular. A) Note os papéis antagônicos de quinases e fosfatases: Enquanto as quinases transferem um grupamento

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 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.

1.8. EFEITOS CELULARES DESENCADEADOS POR ESTRESSE OXIDATIVO

A existência de espécies reativas de oxigênio foi descrita, por volta de 1900. No entanto, as reações que envolvem radicais livres no meio biológico foram estudadas, e consideradas significativas apenas na década de 1940, através da introdução de técnicas laboratoriais que permitiram sua detecção. A evolução do conhecimento sobre os radicais livres de oxigênio no meio biológico foi gradativa, iniciando-se com a identificação de enzimas cujos substratos são radicais livres (McCord & Fridovich, 1969) e progredindo para: identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies (Turrens & Boveris, 1980), a detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios quando

os radicais livres alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico (Freeman & Crapo, 1982), associação do envolvimento de radicais livres com algumas condições patológicas (Sies, 1985) e a participação de EROs em vias de sinalização celular (Haddad, 2002). É sabido que todas as formas de vida aeróbica estão sujeitas ao efeito oxidante dos metabólitos reativos de oxigênio, uma vez que estas espécies são formadas durante o metabolismo aeróbico (Warner, 1994). Essas espécies, quando formadas *in vivo*, apresentam diferenças no potencial de reatividade e tempo de meia-vida. Sabe-se que espécies reativas de oxigênio (EROs) influenciam no comportamento celular, como na sua adesividade, diferenciação e morte celular de uma maneira negativa. No entanto, estudos recentes mostraram que, principalmente a adesão celular, pode ser influenciada de uma maneira positiva, ao estar em um ambiente que apresenta um nível de estresse oxidativo que não seja tóxico para as mesmas. (Xiang *et al.*, 2014). Nesse trabalho, teve-se interesse em analisar especificamente o Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), devido a sua estabilidade química o qual pode permear as membranas celulares e que possibilita a ocorrência de reações com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação (Hancock; Desikan; Neil, 2001).

Baseado neste cenário torna-se relevante entender os mecanismos envolvidos no metabolismo de células pre-osteoblásticas em resposta ao meio condicionado por implantes a fim de estabelecer o dinamismo gerado por estes dispositivos biomédicos.

2. OBJETIVO

O objetivo geral desta dissertação foi compreender se efeitos indiretos de implantes dentários comerciais de titânio afetam proteínas envolvidas com vias de transdução de sinais responsáveis pela adesão de pré-osteoblastos. Especificamente, pretendemos analisar:

- A citotoxicidade do material utilizado;
- O efeito na adesão celular, através do método de cristal violeta;
- O efeito na alteração morfológica celular em mecanismos de adesão sobre superfícies de implantes através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- O envolvimento de estresse oxidativo celular, através da quantificação de Peróxido de Hidrogênio;
- A concentração do elemento Ti em meio condicionado de Implante Comercial, por Espectrometria de Absorção Atômica;
- O efeito do meio condicionado no perfil de expressão/ativação de proteínas envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto: pFAK (Y397), Rac-1, Cofilina, pCofilina (Ser03), PTP1B e pPTP-1B, em pre-osteoblastos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. BIOMATERIAL E ANTICORPOS: Foram utilizados implantes dentários fabricados em titânio puro de grau 5 de acordo com a ASTM F67-06 da linha Strong SW. Os implantes Strong SW estão indicados para o tratamento do edentulismo unitário, parcial e total em protocolos de carga imediata ou precoce, com destaque para os implantes imediatos pós-exodontia, áreas de baixa densidade óssea e alta demanda estética ou funcional. Os implantes (**Fig.2**) foram doados pela empresa S.I.N. Implantes (São Paulo, SP, Brasil), através de colaboração científica firmada com seu Diretor Científico, Sr. Fábio Bezerra.

Anticorpos

Cell Signaling	Abcam
β -Actin Antibody (#4967, 45kDa)	Anti-FAK antibody (ab61113, 119kDa)
Phospho-FAK (Tyr397) Antibody (#3283, 125kDa)	Anti-PTP1B (phospho S50) antibody (ab59419, 50kDa)
Phospho-FAK (Tyr576/577) Antibody (#3281, 125kDa)	Anti-PP2A alpha + beta antibody [Y119] (ab32141, 35kDa)
Cofilin Antibody (#3312, 19kDa)	
Phospho-Cofilin (Ser3) (77G2)	
Rac1/Cdc42 Antibody (#4651, 21kDa)	
Phospho-Rac1/cdc42 (Ser71) Antibody (#2461, 28kDa)	
PTP1B Antibody (#5311, 50kDa)	
Rabbit mAb (#3313, 19kDa)	

Tabela 1: Relação dos anticorpos utilizados no trabalho .



Fig.2: Implantes dentários avaliados neste projeto. A. Implante STRONG SW Morse. Imagem Representativa. B. Dados referentes ao Biomaterial utilizado; C. Microscopia eletrônica de varredura demonstrando a modificação da topografia de superfície pelo

duplo ataque ácido (S.I.N. - Sistema de Implante Nacional) - Aumento de 6000 X; D. Estudo clínico avaliando a performance do implante Strong SW em caso de implante imediato pós-exodontia em protocolo de carga imediata para avaliar o nível de estabilidade primária obtida nestes casos e a estabilidade do tecido ósseo e gengival peri-implantar. Fonte: Monografia – Strong SW.

<http://www.sinimplante.com.br/download/materiais-download/produtos/2479-PDF-da-Monografia.pdf>

3.2. CULTURA DE CÉLULAS: Para realização deste trabalho foi utilizada a linhagem MC3T3-E1 (pre-osteoblastos, subclone 4). Resumidamente, após obtenção do tapete celular, as células (5×10^4) foram cultivadas em meio de cultura adequado para a linhagem, contendo antibióticos (100U/ml penicilina, 100mg/ml estreptomicina), e 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Laborclin, 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=8) foram incubados em meio de cultura adequado por 24 horas (ISO 10993-5), sem Soro Fetal Bovino (SFB), a fim de estabelecermos o meio condicionado (MC). 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 efeito no comportamento celular, sobretudo quanto à capacidade das células aderirem e modular a atividade de proteínas envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto. Para um melhor entendimento, um desenho experimental está esquematizado na **Fig.3**

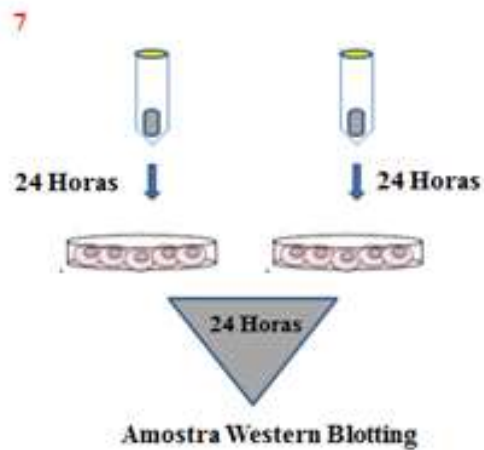
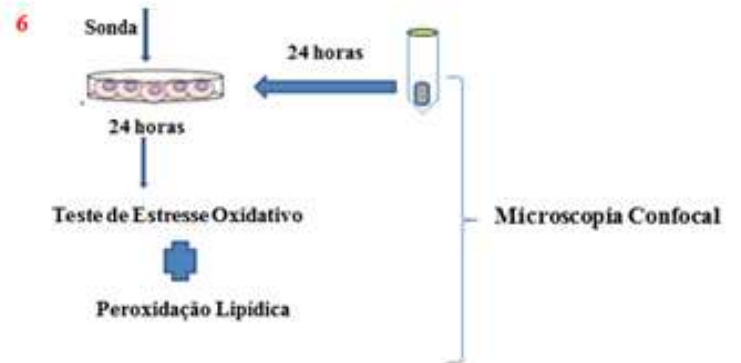
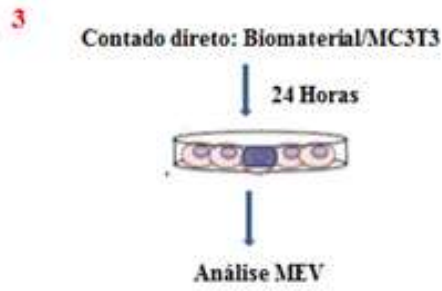
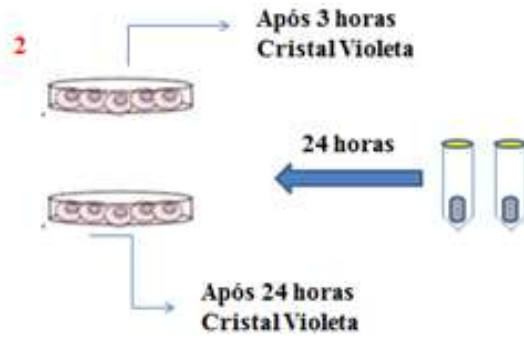
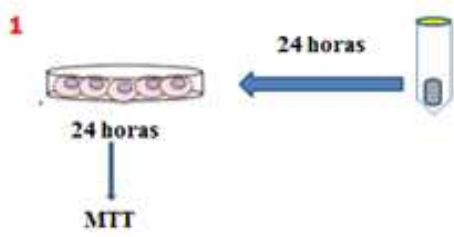


Fig.3: Desenho Experimental. Como dito anteriormente, os biomateriais foram incubados em MC (ISO 10993-5), na ausência de SFB, utilizado em todos os experimentos em questão. Primeiramente condicionamos o meio com o biomaterial por 24 horas e tratamos as células que foram plaqueadas por mais 24 horas para verificar sua citotoxicidade através da atividade mitocondrial (1); posteriormente, investigamos através do método colorimétrico do Cristal Violeta, a adesão celular em células tratadas com o MC em dois tempos distintos: 3 e 24 horas (2); em seguida, a morfologia celular foi avaliada por MEV (3); logo após, verificamos se o MC continha elementos Ti (4); depois, tratamos placas de Petri (5×10^4 células), uma com meio condicionado e a outra com meio de cultura convencional (CTRL) e mantivemos incubadas por 24 horas. Após, foram levadas para a análise química de H_2O_2 (5), através de ensaio eletroquímico e microscopia confocal (6); por fim, verificamos a expressão/fosforilação de proteínas presentes na via de sinalização responsáveis pela adesão, envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto, pela técnica de WB (7).

3.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE IMPLANTES: As células MC3T3 - E1 foram semeadas a 5×10^4 células/mL em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas de plaqueamento, a citotoxicidade dos implantes foi avaliada através de um teste colorimétrico fazendo uso de sal de tetrazolium [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 desidrogenase mitocondrial, dando origem aos cristais de formazam, de coloração violeta e insolúveis. Para que seja possível a leitura do resultado, o produto violeta insolúvel em água foi dissolvido em etanol absoluto e a leitura da intensidade de cor da solução 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, uma vez que é reduzido por todas as células vivas, metabolicamente ativas, que foram testadas, mas não pelas células mortas ou por eritrócitos. A quantidade de formazam gerado é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Células ativas produzem mais formazam que as células adormecidas o que poderia permitir a mensuração até mesmo na ausência da proliferação. No nosso modelo, antes da leitura das amostras, o meio de cultura foi suavemente removido e 100µL de solução de MTT (1mg de MTT/ml de meio de cultura) foi adicionada a cada poço, mantido durante 3 horas a 37°C. Após a

incubação, o meio foi removido e o formazam formado foi suspenso em 100µL de DMSO. Assim, foi possível a leitura da absorbância das amostras a 570 nm.

3.5. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE FAK, Rac, Cofilina e PTP1B: As células foram tratadas com o meio condicionado e, após 24 horas, foram lisadas para estudo do envolvimento de FAK, Rac-1, Cofilina e PTP1B por western blotting. Após serem lisadas (fazendo uso do tampão: 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 2 horas em gelo. Os extratos proteicos 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 ditioneitol (DTT), 4% SDS, 0,1% azul de bromofenol e 20% de glicerol. Os extratos celulares, correspondendo a 5×10^5 células, foram resolvidos por eletroforese em gel SDS-poliacrilamida (PAGE), e no final do processo foram transferidos para membranas de Transferência de fluoreto de polivinidileno (PVDF). Antes do processo, as células foram bloqueadas em 1% de leite desnatado e incubadas 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 da *Enhanced chemiluminescence* (ECL).

3.6. ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR: A fim de investigar a adesão de células MC3T3-E1 realizamos o teste do Cristal Violeta. Este teste é um teste colorimétrico que consiste em verificar a densidade celular pela coloração do DNA obtendo informação quantitativa sobre a densidade relativa das células aderidas em placas de cultura. Inicialmente, pre-osteoblastos foram tratadas em frascos de cultivo celular com o meio condicionado a partir dos implantes. Após 24 horas, estas células foram plaqueadas (5×10^4 células/mL) em placas de 96 poços e as células aderidas coradas após 3 e 24 horas. Nas mesmas condições, porém sem tratamento com meio condicionado, as células foram plaqueadas e consideradas grupo controle (CTRL). O corante foi submetido a leitura em um comprimento de onda de 580 nm.

3.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: Primeiramente, o

implante foi fixado em um poço de uma placa de 24 e banhado em meio de cultura (200 μ l) contendo 50×10^4 células e incubadas, posteriormente, por 24 horas em condições clássicas de cultivo celular. Após este tempo, o implante foi cuidadosamente removido do poço e fixado em um recipiente plástico com 1,0 mL de glutaraldeído (2,5%) em 0,1 M pH 7,3 de tampão de fosfato e mantidos por mais 24 horas em geladeira. Posteriormente, o implante foi encaminhado para o Centro de Microscopia Eletrônica (CME, IBB / UNESP / Botucatu) para serem devidamente processados (Thiberge *et al.*, 2004) e submetidos a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Finalmente, o implante foi montado no MEV (Quanta 200 - FEI Company). Além disso, as amostras para serem analisadas no MEV/EDS devem ser previamente metalizadas. A metalização consiste na precipitação, à vácuo, de uma película micrométrica de material condutor (ouro ou carbono) sobre a superfície do material, possibilitando a condução da corrente elétrica, utilizando energia de 12,5Kv para obtenção das imagens de interesse. Após a análise, foi utilizado um detector de energia dispersiva de raios-x (EDX) que é acoplado ao MEV o qual possibilita a determinação da composição qualitativa e semiquantitativa das amostras (elementos químicos), de uma área da amostra exposta ao feixe de elétrons. Desta forma, este mapa pode representar a distribuição dos elementos em determinadas regiões de interesse a partir da emissão de raios X característicos.

3.8. ENSAIO ELETROQUÍMICO PARA DETECÇÃO DE H_2O_2 : A técnica utilizada para medir os níveis de Peróxido de Hidrogênio foi a voltametria cíclica. Esta técnica consiste no varrimento de potencial de um eletrodo de trabalho o qual se encontra mergulhado numa solução em repouso (amostra), medindo-se a corrente resultante. As soluções em repouso no caso foram de dois tipos: a primeira foi uma solução contendo as células MC3T3-E1 que foram cultivadas em uma placa de Petri (50×10^4) por 24 horas, usada como grupo controle. Já a segunda solução foi um grupo de células (50×10^4) tratadas com o meio condicionado com o biomaterial, nas mesmas condições que a anterior. Após 24 horas, estas células foram tripsinizadas e encaminhadas para a análise eletroquímica. As medições da redução da corrente foram feitas de 20 em 20 minutos por 2 horas (n=6). Para realizar as medições utilizou-se um bio-sensor eletroquímico para a monitoração de H_2O_2 . A liberação de H_2O_2 foi detectada através da difusão do peróxido dentro do hidrogel. Como o peróxido é uma substância eletroativa verificou-se um processo de redução na presença e na ausência de HRP conjugada com hidrogel de PEG e AuNPs.

3.9. ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA POR

MICROSCOPIA CONFOCAL: As células foram plaqueadas a uma densidade de $4,3 \times 10^3$ células (1 mL de suspensão celular) em placas de 24 poços sobre lamínulas estéreis e mantidas em cultura por 48 h. Em seguida, as células foram tratadas como listado anteriormente. Após, as sondas para detecção de estresse oxidativo (DCFDA - 1 mmol/L) e peroxidação lipídica (BODIPY C11 - 1 mmol/L) foram adicionadas à cultura 1 h antes do término do tratamento. Ao final do tratamento, as células foram lavadas com PBS para total retirada das sondas e em seguida fixadas com paraformaldeído 2% a temperatura ambiente por 30 minutos. As células marcadas com a sonda para detecção de H_2O_2 (DCFDA) tiveram a membrana plasmática marcadas com 10 mg/mL de WGA-Alexa Fluor-637 (WGA-637). Para análise da geração de H_2O_2 a sonda DCFDA foi excitada com laser Ar 488 nm e sua emissão capturada no intervalo 500-550 nm e o WGA-637 capturada no intervalo 635-700 nm. A excitação da sonda referente à peroxidação lipídica (BODIPY) foi realizada com o laser Ar 488 nm e sua emissão capturada nos intervalos de 500-550 nm, referente a fluorescência verde, para a forma oxidada da sonda – Oxi-BODIPY e 570-610 nm referente a fluorescência vermelha, forma intacta. As células controles foram incubadas somente com as sondas DCFDA e BODIPY em meio de cultura suplementado com 10% de SFB e antibióticos. As imagens foram preparadas utilizando-se os programas Examiner 4.2 e Adobe Photoshop 9.2, sendo a análise da sobreposição das imagens realizada no mesmo plano focal. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

3.10. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DO ELEMENTO TITÂNIO:

Avaliamos a concentração de elementos de titânio no meio condicionado através da técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) (IVANOVA, 2005). Implantes foram incubados com o meio de cultivo e, após 24 horas, levado para a análise química. O Mapeamento de Ti por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS) foi feito utilizando-se solução padrão Titrisol (Merck) no preparo da curva de calibração. As condições operacionais utilizadas foram as descritas no manual do fabricante do equipamento (COOKBOOK, SHIMADZU AA – 6800, 2000) e sob supervisão do Prof. Pedro Padilha (Departamento de Química e Bioquímica, IBB, UNESP).

3.11. ANÁLISE DOS DADOS: 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 foram de 5% bicaudal, ou seja, a significância estatística será considerada para valores de $p < 0,05$. Os ensaios paramétricos foram 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por novas superfícies de ligas de titânio com o enfoque biomédico é motivo de investimentos ao redor dos continentes. Ao mesmo tempo, comitês de ética, nacional e internacional, tem sugerido e estimulado o uso de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado na busca pela compreensão de mecanismos moleculares desencadeados por diferentes superfícies de materiais biomédicos e interessantes resultados têm sido alcançados (Zambuzzi et al., 2014). Embora com algum progresso na área, sobretudo quanto a ensaios provenientes de modelos de contato direto célula/material, ainda há a necessidade de entendimento dos mecanismos moleculares disparados por elementos liberados por implantes à base de ligas de Titânio e, desta maneira, decidimos avaliar os mecanismos de meio condicionado por implantes em pre-osteoblastos, da linhagem MC3T3-E1, subclone 4.

4.1. IMPLANTES LIBERAM ELEMENTOS TITÂNIO QUANDO EM SOLUÇÃO AQUOSA.

Inicialmente, decidimos avaliar a concentração do elemento Titânio (Ti) no meio condicionado através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica, a qual tem por finalidade detectar e quantificar metais presentes em amostras. Os átomos livres em estado estável podem absorver a luz em certo comprimento de onda. A absorção é específica a cada elemento, nenhum outro elemento absorve este comprimento de onda. Nossos resultados mostram que houve significativamente diferença na concentração do elemento Ti entre os meios condicionados (**Fig.4**), variando na ordem de 1ng/mL, no grupo controle, a 2ng/mL no meio condicionado, mostrando que há dinamismo entre o

implante dentário e o meio; esta mesma interação deve ocorrer entre o implante dentário e fluidos corpóreos do hospedeiro. Neste sentido, valida-se nosso interesse em conhecer essa liberação de Ti em mecanismos moleculares de pre-osteoblastos.

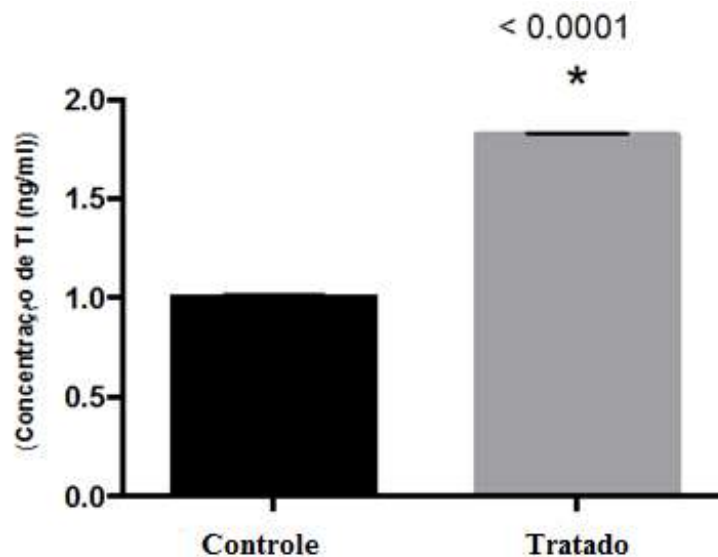


Fig.4: Implantes liberam Ti ao meio. O meio de cultura utilizado em nosso modelo experimental foi utilizado para condicionar implantes por 24 horas, conforme já detalhado. Após este período, o meio condicionado foi encaminhado para quantificação do elemento de Ti. Nossos resultados mostraram uma liberação significativa de Ti quando considerado ao seu imediato grupo controle, onde o meio de cultivo foi testado sem o condicionamento com os implantes. *significa diferença estatística ($p < 0.0001$), quando aplicado o test-t não paramétrico.

4.2. MEIO CONDICIONADO DE IMPLANTE NÃO PROMOVE CITOTOXICIDADE.

Após analisado que havia uma maior concentração de Ti, liberado pelos implantes, decidimos avaliar se estes meios condicionados exerciam alguma citotoxicidade nos pre-osteoblastos. 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 24 horas (0,1g/mL), como instruído pela ISO 10993-5. Após este período, tratamos os pre-osteoblastos em semi-confluência (em placas de 96 poços) com o referido meio condicionado, por 24 horas. Após este período, aplicamos a metodologia de redução do 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 não haver

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 (Fig.5).

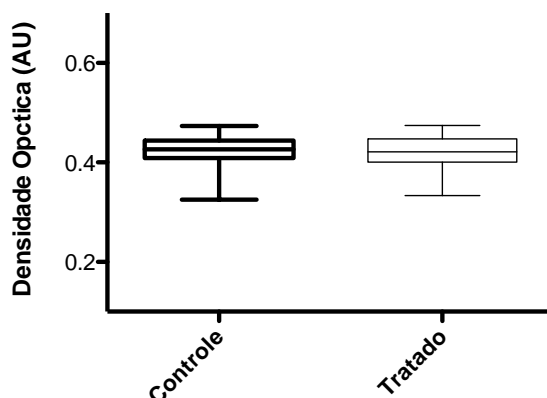


Fig.5: Meio condicionado por implantes não promove citotoxicidade. Osteoblastos foram tratados por 24 horas com meio condicionado a partir de implantes comerciais nacionais. Para avaliar a citotoxicidade, após o tratamento, as células foram incubadas por 24 horas com meio de cultivo contendo sal de MTT (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 570 nm.

4.3. MEIO CONDICIONADO POR IMPLANTES PROMOVE UMA MAIOR ADESÃO DE PRE-OSTEOBLASTOS.

Para conhecer a influência funcional do meio condicionado em pre-osteoblastos, decidimos verificar seu papel na adesão de pre-osteoblastos, sobretudo pela influência que a adesão celular na superfície do implante representa para sua osteointegração (Liu *et al.*, 2013). Assim, pre-osteoblastos foram pre-tratados com o meio condicionado (grupo teste) ou não (grupo controle), por 24 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas, contadas e re-plaqueadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 50×10^3 células/mL. Após 3 horas e 24 horas pós re-plaqueamento as células aderidas foram coradas pelo método de cristal violeta. Nossos resultados mostraram que, embora no período de 3 horas não mostrar diferença significativa, no período de 24 horas houve um aumento significativo na adesão de pre-osteoblastos (**Fig.6**). Assim, este resultado sugere que o implante está em dinâmica harmonia com o tecido do hospedeiro,

impactando a adesão de pre-osteoblastos que posteriormente resultará na osteointegração deste dispositivo, explicando o sucesso de ligas de titânio no cenário médico-odontológico (Sato N *et al.*, 2014).

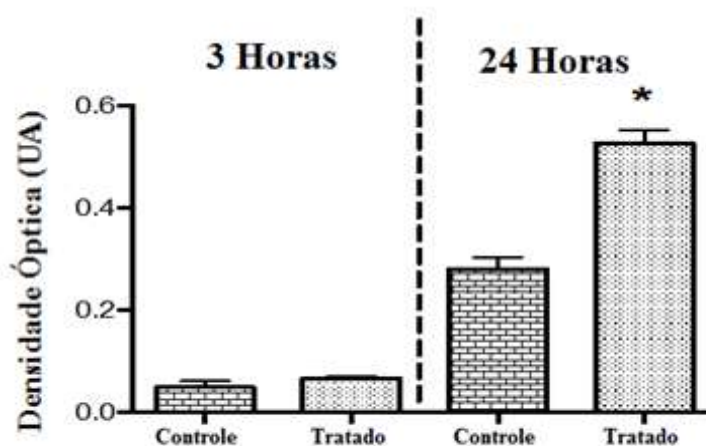


Fig.6. Ti liberado pelo implante afeta significativamente a adesão de pre-osteoblastos. Avaliação da adesão celular foi verificada pelo teste colorimétrico do Cristal Violeta. O teste foi realizado após 3 horas e 24 horas após re-plaquemaneto de tratamento. O grupo controle (CTRL) foi considerado o meio de cultivo, sem o condicionamento com o implante dentário. *significa diferença estatística ($p < 0.0001$).

4.4. COMPORTAMENTO DE PRE-OSTEOBLASTOS SOBRE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES.

A adesão celular é um evento de extrema importância durante uma miríade de eventos biológicos, margeando desde eventos embriogênese/desenvolvimento até mecanismos de osteointegração de implantes (Yoder & Hildebrand, 2007). Assim, uma boa interação celular na superfície de dispositivos biomédicos representa mecanismo inicial para uma adequada interação material/hospedeiro. Assim, decidimos plaquear pre-osteoblastos sobre implantes obtidos da empresa S.I.N implantes (São Paulo, São Paulo, Brasil) e, após 24 horas analisamos sua morfologia celular através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Nossos resultados mostraram que a superfície analisada promove um desempenho importante de pre-osteoblastos, favorecendo mecanismos de adaptação celular através de espraiamento e lançamento de prolongamentos celulares. Estes prolongamentos celulares são projeções citoplasmáticas capazes de promover uma

maior interação célula material, como também para estabelecer interações intercelulares (Manzanares *et al.*, 2001). Electromicrografias representativas podem ser observadas na Fig.7a-c. As electromicrografias trazidas pelas Fig.7d,e representam a identificação de elementos de Carbono e Titânio, respectivamente.

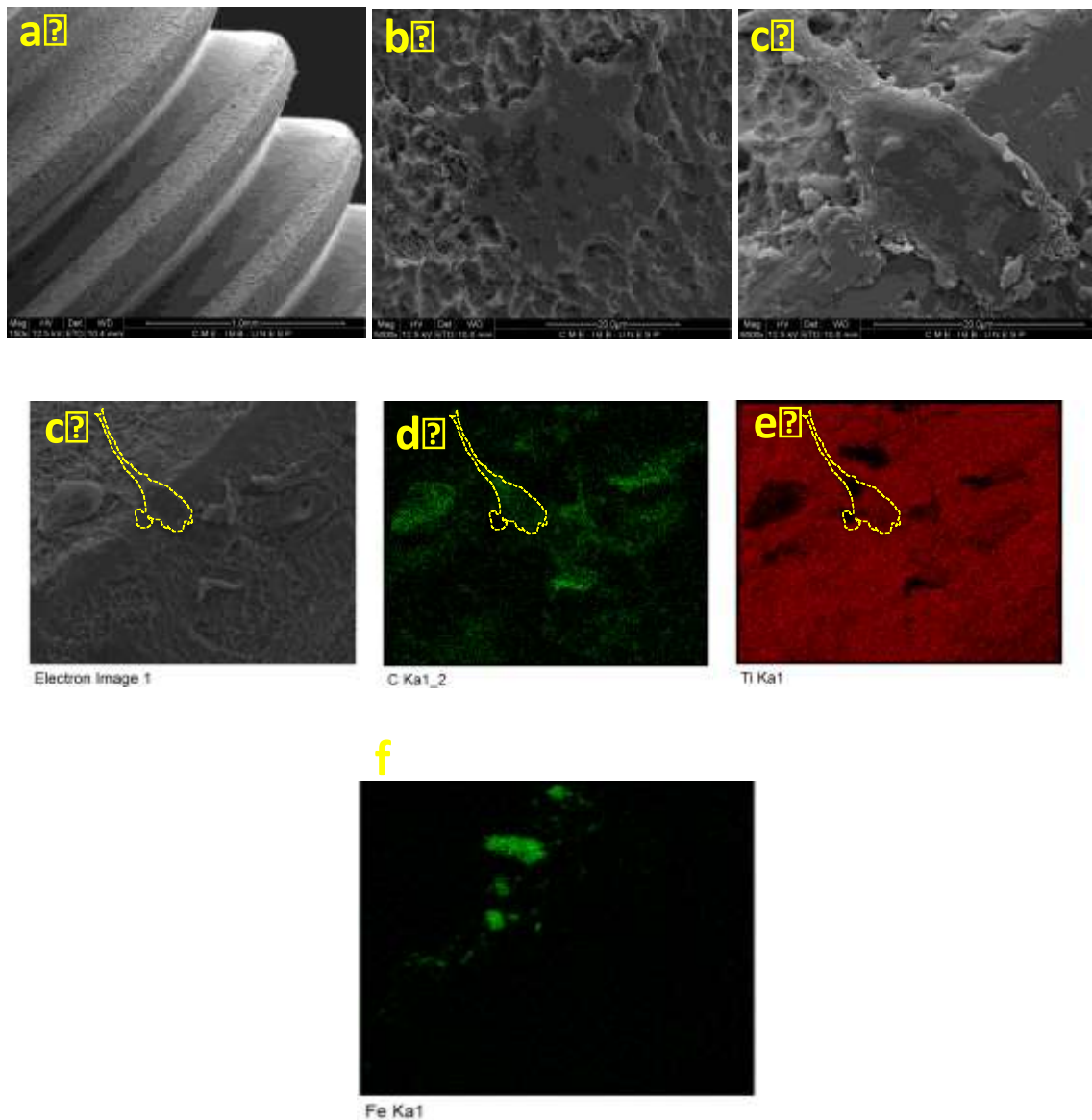


Fig.7: Comportamento de pre-osteoblastos na superfície de implantes. Metodologicamente, o implante foi fixado em um poço de uma placa de 24 poços quando as células foram plaqueadas. Após 24 horas de interação, as células foram fixadas com 1,0 mL glutaraldeído (2,5%) por mais 24 horas em geladeira. Após, o implante/células foram analisados no Centro de Microscopia Eletrônica, do Instituto de Biociências, de Botucatu. **a.** imagem topográfica do implante dentário após o seu contato direto com as células MC3T3-E1. Nota-se que o biomaterial apresenta duas regiões distintas: vales e cristas, compondo a rosca do implante; **b.**

pre-osteoblasto em estado de spreading, através de sua ancoragem na superfície do implante, visto também a irregularidade e rugosidade da superfície topográfica, promovida pelo duplo ataque ácido **c**. Pode ser visto projeções citoplasmáticas, o que permite uma maior interação célula/superfície, bem como inter-relações celulares; de identificação do elemento Carbono através da técnica de EDX. A eletromicrografia **d** utilizada como referência para a detecção dos elementos de interesse. As regiões mais fluorescentes denotam uma quantidade maior de átomos de carbono; **e**. as regiões mais fluorescentes denotam presença de Titânio, e **f** a presença de Fe.

4.5. MEIO CONDICIONADO PROMOVE ATIVAÇÃO DA VIA FAK-RAC-1-COFILINA.

Após a obtenção dos resultados obtidos anteriormente, mostrando a importância do meio condicionado na adesão de pre-osteoblastos, repetimos nosso modelo biológico para verificarmos o envolvimento de proteínas envolvidas com adesão celular, de modo a compreendermos o mecanismo molecular envolvido nestas respostas. Assim, decidimos verificar a ativação/inibição de FAK e Cofilina, proteínas envolvidas com adesão celular e consequente rearranjo do citoesqueleto (Wang *et al.*, 2015). Através da fosforilação de FAK, após ativação de integrinas, esta via culmina no controle da fosforilação de cofilina (na serina 03) através da ativação de rac-1 (ZAMBUZZI *et al.*, 2009).

Curiosamente, nossos resultados revelam que pre-osteoblastos, em resposta ao meio condicionado de implantes é capaz de modular significativamente a fosforilação de FAK (Fig.8b, onde $p=0.0011$), a expressão de Rac-1 (Fig.8c, onde $p=0.0175$) e a fosforilação de Cofilina (Fig.8d, onde $p=0.0053$). A Fig. 8a traz imagens representativas dos blottings obtidos nestas análises.

Como a fosforilação de Cofilina na Ser03 confere a esta proteína conformação tridimensional de inibição, é provável que o rearranjo dos filamentos de actina aconteça por outras vias de transdução de sinais, independentes de cofilina, como já mostramos durante mecanismos de adesão de MC3T3-E1 em outros substratos (Zambuzzi *et al.*, 2009; Zambuzzi *et al.*, 2010). Este mecanismo nos remete a uma reflexão com provável envolvimento de fosfatases na manutenção destas fosforilações de FAK, uma PTK, e Cofilina, uma Ser/Thr quinase. Neste sentido, conhecer o envolvimento de fosfatases nesta resposta é extrema relevância.

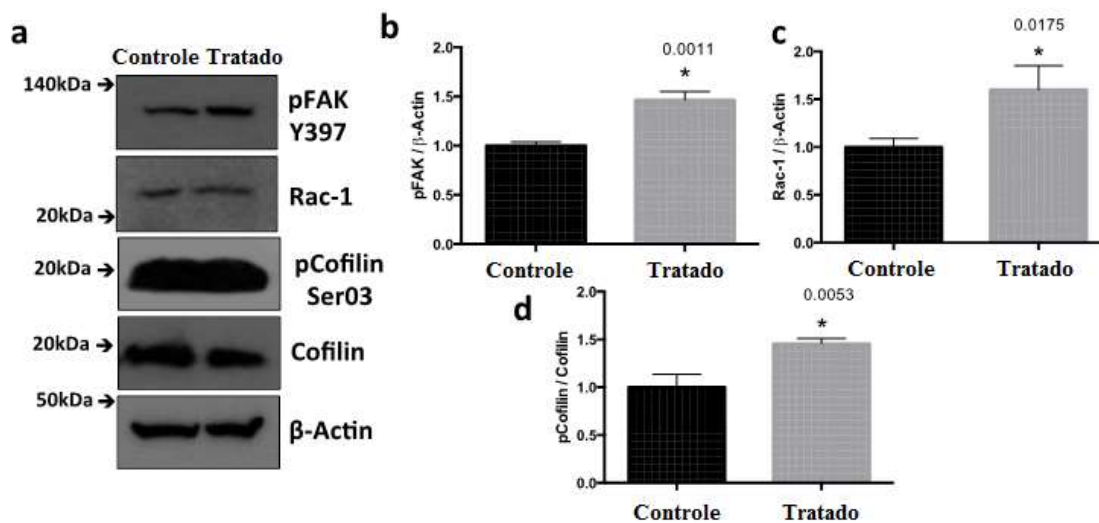


Fig.8. Meio condicionado de implante dentário promove um aumento na adesão celular através da ativação do eixo FAK→Rac-1→Cofilin. As células foram tratadas com o meio condicionado e, após 24 horas, as células foram lisadas e centrifugadas para obtenção de pool de proteínas. Após preparadas, as proteínas foram resolvidas em gel SDS-PAGE, transferidas em membranas de PVDF e incubadas com os anticorpos primários específicos. a. Western blotting representativos; b. Análise densitométrica de pFAK, normalizada pela densitometria da β -actina, utilizada aqui como um controle interno (loading control); c. Normalização dos valores arbitrários obtidos para Rac-1, normalizados pela β -actina; d. Razão dos valores arbitrários obtidos para pCofilina e Cofilina (pan-cofilina). Antes de estabelecer estas razões, os valores arbitrários foram normalizados pelas respectivas bandas de β -actina.

4.6. MEIO CONDICIONADO PROMOVE *DOWN* FOSFORILAÇÃO DE PTP-1B.

Explorando molecularmente os dados reunidos na Fig.8, decidimos avaliar o envolvimento da ativação de PTP-1B em resposta ao meio condicionado. Trata-se de uma PTP capaz de desfosforilar resíduos fosforilados em tirosina (Y) (Ferreira *et al.*, 2006). Assim, os resultados mostrados na Fig.9 nos mostram que houve uma diminuição significativa na fosforilação desta PTP ($p=0.0148$), justificando, assim, a manutenção de fosforilação de FAK, fosforilada no resíduo Y397 e culminando em uma maior adesão de pre-osteoblastos em resposta ao meio condicionado por implantes.

Cabe reportar que fizemos a relação da pPTP-1B/PTP-1B (Fig.9b), para conhecermos o real nível de fosforilação desta proteína.

Assim, mostramos que implantes estão em dinamismo com o meio onde se encontra, interagindo com células indiferenciadas e promovendo uma maior atividade celular, através de um mecanismo específico, justificando molecularmente a descoberta de Branemark e colegas nos anos 1970 e uso intenso na prática médico-odontológica (Brånemark *et al.*, 1985).

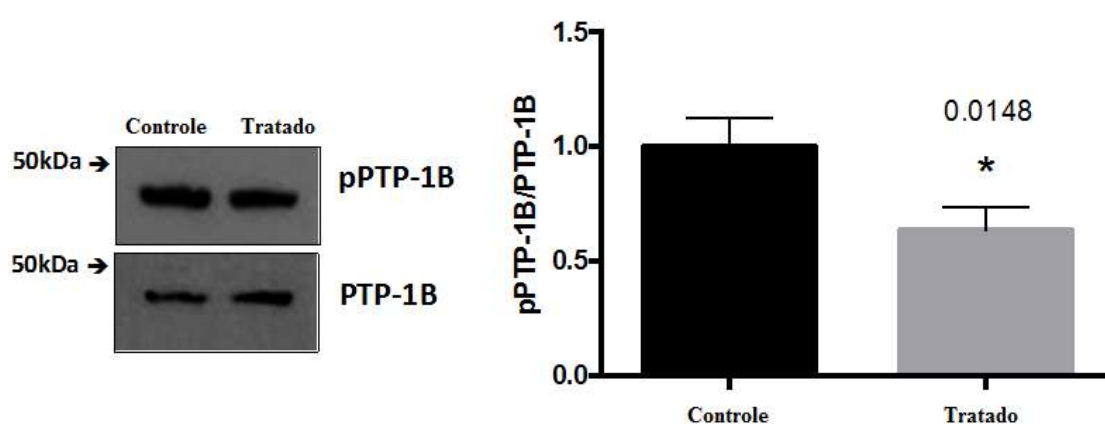


Fig.9. PTP-1B está *down*-fosforilada em resposta ao meio condicionado. As células foram tratadas com o meio condicionado e, após 24 horas, as células foram lisadas e centrifugadas para obtenção de pool de proteínas. Após preparadas, as proteínas foram resolvidas em gel SDS-PAGE, transferidas em membranas de PVDF e incubadas com os anticorpos primários específicos. **a.** Western blottings representativos; **b.** Razão dos valores arbitrários obtidos para pPTP-1B e PTP-1B. Antes de estabelecer estas razões, os valores arbitrários foram normalizados pela respectiva banda de β -actina, utilizada aqui como um controle interno (loading control).

4.7. TITÂNIO LIBERADO POR IMPLANTES PROMOVE UM AUMENTO NO ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRE-OSTEOBLASTOS

Como PTPs são proteínas sensíveis e responsivas a variações de estresse oxidativo (GU *et al.*, 2015), avaliamos os níveis de H₂O₂ através de 2 metodologias: **1.** Fazendo uso de um biosensor, em parceria com o Laboratório de Biomateriais (IBB-UNESP), sob

responsabilidade do Prof. Valber A. Pedrosa e, **2.** Fazendo uso de sondas que são oxidadas e que detectam sub-celularmente níveis de H_2O_2 , através de microscopia confocal.

Através do uso de biosensores, nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo de captação de H_2O_2 em resposta ao meio condicionado (**Fig.10**), enquanto que a **Fig.11** valida este resultado mostrando que a sonda DCFH está mais pronunciada nas células sob tratamento com o meio condicionado pelos implantes. Estes mecanismos fortemente sugerem o envolvimento de espécies eletroativas na ativação de PTP-1B, como mostrado na **Fig.9**.

A **Fig. 10b,c** traz medições da redução da corrente realizadas de 20 em 20 minutos por 2 horas, através da utilização de um biosensor eletroquímico para a monitoração de H_2O_2 . A liberação de H_2O_2 foi detectada por Voltametria Cíclica (CV) através da difusão do peróxido dentro do hidrogel contido no sistema de detecção. Como o peróxido é uma substância eletroativa verificou-se um processo de redução na presença e na ausência de HRP (peroxidase) conjugada com hidrogel de PEG (Polietilenoglicol) e de AuNPs (Nanopartículas de Ouro). Para o grupo controle (**Fig.10b**) verifica-se que houve menor redução da corrente comparado ao grupo tratado com o meio condicionado (**Fig.10c**), o qual apresentou uma maior redução da corrente elétrica durante o tempo do experimento. Como a corrente elétrica é inversamente proporcional à liberação de peróxido, no caso do grupo tratado houve então maior liberação dessas substâncias comparada ao controle.

Para calcular a curva de calibração (**Fig.10a**) utilizaram-se os picos anódicos (valores negativos no eixo Y) (**Fig. 10b,c**), por isso a curva de calibração é plotada como redução da corrente, pois na presença do peróxido os picos alcançam valores negativamente maiores.

Além disso, mostramos na **Fig.12** que houve um aumento também na peroxidação lipídica destas células. Estes resultados são curiosos uma vez que a peroxidação lipídica está envolvida com eventos deletérios, como a morte celular por apoptose (Mishra B *et al.*, 2016). No entanto, Fuhrman, Oiknine & Aviram, 1994, mostraram que a

peroxidação lipídica é um evento envolvido no metabolismo de Ferro, sem causar a morte celular ou qualquer outro dano. Assim, aventamos que esta peroxidação encontrada neste trabalho está envolvida com o metabolismo intracelular envolvido com a presença de Ti no meio condicionado, além da presença do próprio Fe visto na eletromicrografia acima.

Assim, constatamos que a resposta ao meio condicionado por implantes envolve um evento em cascata, mostrando que o controle do estresse oxidativo culmina em uma queda na fosforilação de PTP-1B que, por apresentar menor atividade, favorece a manutenção de altos níveis de fosforilação de FAK, proteína intimamente relacionada a mecanismos de adesão celular.

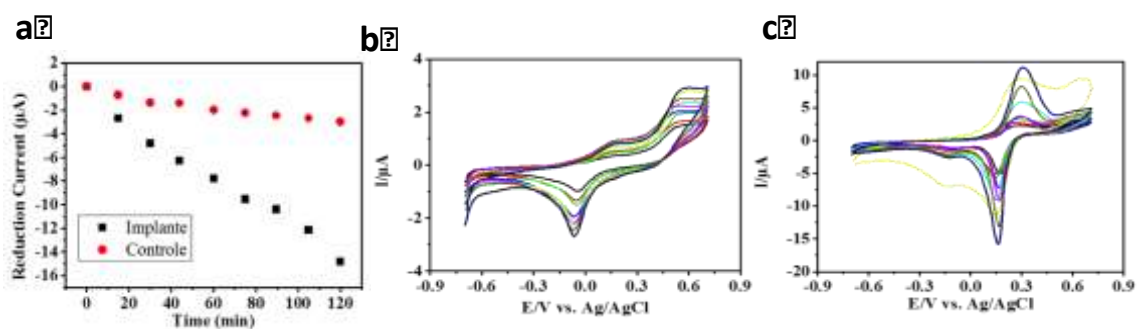


Fig.10. Curva de Calibração plotada pela Redução da Corrente Vs Tempo de leitura das amostras. Essa curva é referente à liberação de H₂O₂ da amostra referente ao grupo tratado com o meio condicionado (negrito) e da amostra referente ao grupo tratado com o meio convencional (vermelho). (a) Curvas eletroanalíticas obtida pela técnica de Voltametria Cíclica, a qual é visto o processo de redução da molécula de H₂O₂ (picos negativos), referente ao grupo controle (b) e ao grupo tratado (c).

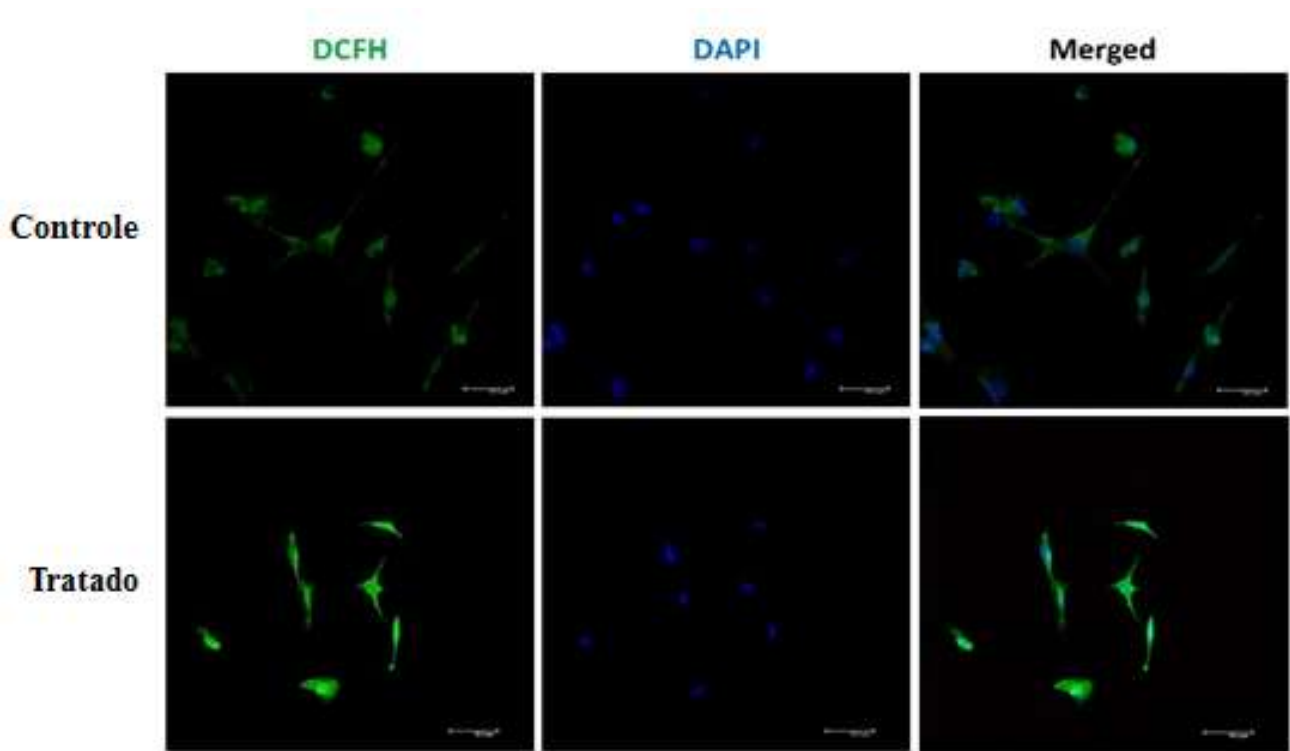


Fig.11. Ti induz estresse oxidativo em MC3T3-E1. As células foram submetidas ao tratamento com o meio condicionado e, após 24 horas, o perfil de estresse oxidativo foi estimado pela sonda DCFH, quando as imagens foram obtidas a partir de um microscópio confocal. Note que as células submetidas ao meio condicionado apresentaram um maior perfil de estresse, sugerindo H_2O_2 como moléculas responsivas ao Ti liberado por implantes. O núcleo foi corado com DAPI. A coluna de micrografias da direita representa as imagens sobrepostas.

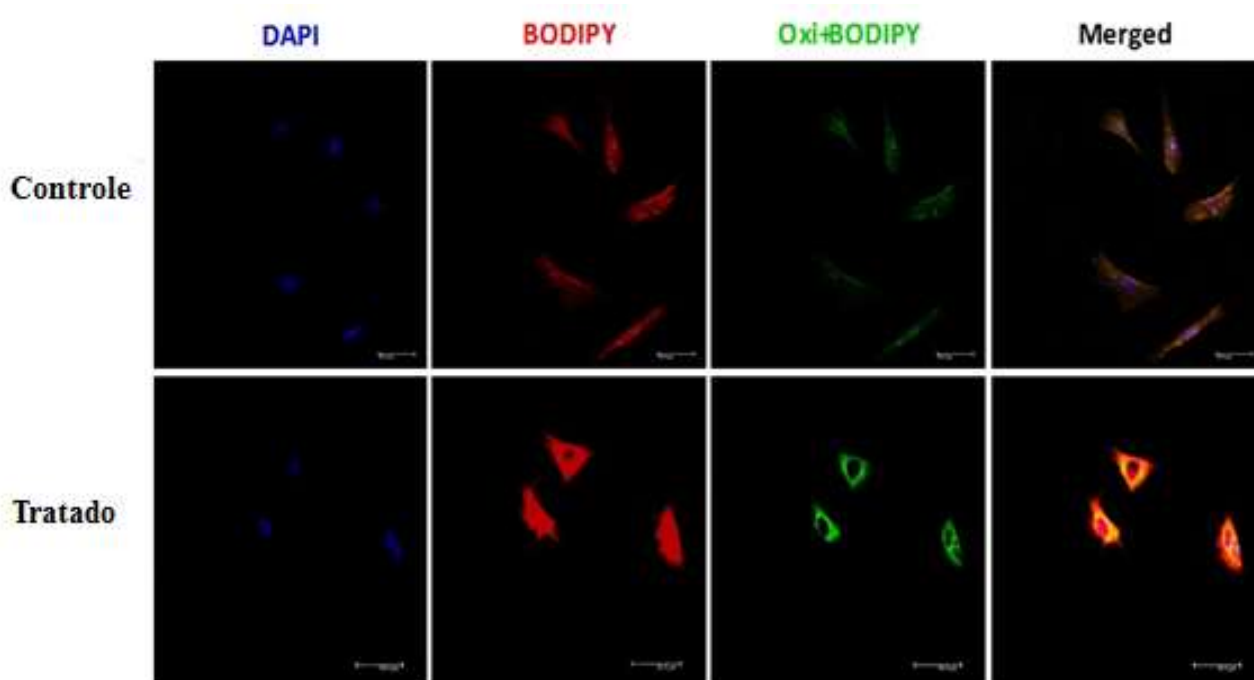


Fig.12. Ti induz peroxidação lipídica em MC3T3-E1. As células foram submetidas ao tratamento om o meio condicionado e, após 24 horas, o perfil de peroxidação lipídica foi estimado pela sonda Bodipy e oxi-Bodipy, quando as imagens foram obtidas a partir de um microscópio confocal. Note que as células submetidas ao meio condicionado apresentaram um maior perfil de peroxidação lipídica. Conforme discutido, a peroxidação lipídica tem sido apontada como resposta ao metabolismo celular à metais. O núcleo foi corado com DAPI. A coluna de micrografias da direita representa as imagens sobrepostas.

5. CONCLUSÃO

Assim, concluímos que os implantes à base de titânio promovem, indiretamente, uma melhor performance na adesão de pre-osteoblastos modulada pela sinalização de H₂O₂.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBREKTSSON T, WENNERBERG A. Oral implant surfaces: Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont* 2004;17(5):536-43.
- ALBREKTSSON T, BRANEMARK PI, HANSSON HA, LINDSTROM J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant Anchorage in man. *Acta Orthop Scand* 1981;52(2):155–70.
- 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.
- ANSELM K. Osteoblast adhesion on biomaterials *Biomaterials*, 21:667–81, 2000.
- ARANDA, B, ACHUTHAN, P, ALAM-FARUQUE, 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.
- BASSETT CA, MITCHELL SN, GASTON SR. Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*, 1981 Apr;63(4):511-23.
- BERTAZZO S, ZAMBUZZI WF, CAMPOS DD, FERREIRA CV, BERTRAM 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.

BUSER D, SCHENK R, STEINEMANN S, FIORELLINI J, FOX C, STICH H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 1991; 25:889–902.

BRANEMARK P-I, ALBREKTSSON T. CHICAGO: QUINTESSENCE; 1985. An introduction to osseointegration. *Tissueintegrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Edited by: Brånemark P-I, Albrektsson T. Chicago: Quintessence; 1985:11-53.

BRETT PM, HARLE J, SALIH V, MIHOC R, OLSEN I, JONES FH, et al. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone* 2004; 35:124–33.

CARLSSON L, ALBREKTSSON T, BERMAN C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:199–204.

CHEVION S, ROBERTS MA, CHEVION M. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med*. 2000 Mar 15;28(6):860-70.

COCHRAN DL, SCHENK RK, LUSSI A, HIGGINBOTTOM FL, BUSER D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible. *J Biomed Mater Res* 1998;40:1–11.

CONNER K, SABATINI R, MEALEY B, TAKACKS V, MILLS M, COCHRAN D. Guided bone regeneration around titanium plasma-sprayed, acid-etched and hydroxyapatite-coated implants in the canine model. *J Periodontol* 2003;74:658–68.

- 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.
- FREEMAN BA, Crapo JD. *Biology of disease: free radicals and tissue injury.* Gibas, C & Jambeck, P (2001).
- FUHRMAN B, OIKNINE J, AVIRAM M. (1994) Iron induces lipid peroxidation in cultured macrophages, increases their ability to oxidatively modify LDL, and affects their secretory properties. *111(1):65-78.*
- GOTFREDSEN K, WENNERBERG A, JOHANSSON C, SKOVGAARD LT, Hjorting-Hansen E. Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1223–31.
- GU Y, BARZEGAR M, CHEN X, WU Y, SHANG C, MAHDAVIAN E, SALVATORE BA, JIANG S, HUANG S. 2015. Fusarochromanone-induced reactive oxygen species results in activation of JNK cascade and cell death by inhibiting protein phosphatases 2A and 5. *8;6(39):42322-33.*
- HADDAD JJ. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors.
- HANCOCK JT, DESIKAN R, NEILL SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways.
- HOLLER, F.J; NIEMAN, T.; SKOOG, D.A. 2002. *Princípios de Análise Instrumental.* 5^a ed. pp.117-297.

- HUNTER, T & COOPER, JA (1985) Protein-Tyrosine Kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 54:897-930.
- HUNTER, T & JOHNSON, SA (2005) Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature Methods*, 2:17-25.
- IVANOVA_A, PAUL B, MARCHENKO O, SONG G, PATEL N, Moschos SJ. Nine-year change in statistical design, profile, and success rates of Phase II oncology trials.
- 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.
- LANGER R., VACANTI J. P. 1993. Tissue engineering. *Science* 260, 920–926.
- LIU R, LEI T, DUSEVICH V, YAO X, LIU Y, WALKER MP, WANG Y, YE L. 2013. Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. *J Prosthodont. Dec*; 22(8):641-51.
- 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):5618.
- LU T, QIAO Y, LIU X. 2012. Surface modification of biomaterials using plasma immersion ion implantation and deposition. 2(3):325-36.

- MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-34.
- MANZANARES MC, FRANCH J, CARVALHO P, BELMONTE AM, TUSELL J, FRANCH B, FERNANDEZ JM, CLERIES L, MORENZA JL. 2001. BS-SEM evaluation of the tissular interactions between cortical bone and calcium-phosphate covered titanium implants. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. Sep-Dec;43(3):100-8.
- MARIA FEOKTISTOVA, PETER GESERICK AND MARTIN LEVERKUS. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells.
- MARSHAL, W.D. Atomic Absorption, Emission and Fluorescence Spectrometry: Principles and Applications. In: PARÉ, J.R.J; BÉLANGER, J.M.R. *Instrumental Methods in Food Analysis*. 1^a ed. Elsevier Science, 1997. p. 141-178.
- 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.
- MISHRA B, ORTIZ L, LUDERER U. 2016. Charged iron particles, components of space radiation, destroy ovarian follicles. *31(8):1816-26*.
- MCCORD JM, FRIDOVICH I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein).
- 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.

- REED MJ, PENN PE, LI Y, BIRNBAUM R, VERNON RB, JOHNSON TS, PENDERGRASS WR, SAGE EH, ABRASS IB, Wolf NS. Enhanced cell proliferation and biosynthesis mediate improved wound repair in refed, caloric-restricted mice. *Mech Ageing Dev.* 1996 Jul 31;89(1):21-43.
- SATO N, KUWANA T, YAMAMOTO M, SUENAGA H, ANADA T, KOYAMA S, SUZUKI O, SASAKI K. 2014. Bone response to immediate loading through titanium implants with different surface roughness in rats. *Odontology* 102(2):249-58.
- SOHN SH, JUN HK, KIM CS, KIM KN, CHUNG SM, SHIN SW, RYU JJ, KIM MK. 2006. Biological responses in osteoblast-like cell line according to thin layer hydroxyapatite coatings on anodized titanium. *J Oral Rehabil.* 33(12):898-911.
- SONG JH, KIM JH, PARK S, KANG W, KIM HW, KIM HE, JANG JH. 2008. Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab.* 26(2):138-142.
- STEINEMANN S. Titanium-the material of choice *Periodontology* 2000 1998;17:7–21.
- TESTORI T, WISEMAN L, WOOLFE S, PORTER S. A prospective multicenter clinical study of the Osseotite implant: four-year interim report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001; 16:193–200.
- THIBERGE_S, NECHUSHTAN A, SPRINZAK D, GILEADI O, BEHAR V, ZIK O, CHOWERS Y, MICHAELI S, SCHLESSINGER J, MOSES E. Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions.
- 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.

- TURRENS JF, BOVERIS A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria.
- VAN BAAL, J, DIKS, S, WANDERS, R, RYGIEL, A, MILANO, F, JOORE, J, BERGMAN, J, PEPPLNBOSCH, 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.
- VOET, D.; VOET, J. G. PRATT, C. W. *Fundamentos de bioquímica* (2002). Artmed, Porto Alegre.
- WEBSTER TJ, EJIOFOR 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.
- XIANG LI, XIANG-YU MA, YA-FEI FENG, ZHEN-SHENG MA, JIANG WANG, TIAN-CHENG MA, WEI QI, WEI LEI, LIN WANG. Osseointegration of chitosan coated porous titanium alloy implant by reactive oxygen species-mediated activation of the PI3K/AKT pathway under diabetic conditions. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.09.012
- 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, BONFANTE EA, JIMBO R, HAYASHI M, ANDERSSON M, ALVES G, TAKAMORI ER, BELTRÃO PJ, COELHO PG, GRANJEIRO JM.

- Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. *Jul 7;9(7):e95662*, 2014.
- 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, PAIVA KB, MENEZES R, OLIVEIRA RC, TAGA R, GRANJEIRO JM. 2009. MMP-9 and CD68(+) cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. *40(4):301-9.*
- 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.
- WANG JT, SONG LZ, Li LL, ZHANG W, CHAI XJ, AN L, CHEN SL, FROTSCHER M, ZHAO ST. 2015. Src controls neuronal migration by regulating the activity of FAK and cofilin. *Neuroscience.* 2015 Apr 30;292:90-100.
- WARNER HR. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 1994 Sep; 17(3):249-58.

- WENNERBERG A, ALBREKTSSON T, ALBREKTSSON B, KROL JJ. Histomorphometric and removal torque study of screw-shaped titanium implants with three different surface topographies. *Clin Oral Implants Res* 1996;6:24–30.
- WENNERBERG A, BOLIND P, ALBREKTSSON T. Glow discharge pre-treated implants combined with temporary bone ischaemia. *Swed Dent J* 1991;15:95–101.
- WENNERBERG A, HALLGREN C, JOHANSSON C, DANELLI S. A. Histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Implants Res* 1998; 9:11–9.
- YODER M, HILDEBRAND JD. 2007. Shroom4 (Kiaa1202) is an actin-associated protein implicated in cytoskeletal organization. *Cell Motil Cytoskeleton*. Jan;64(1):49-63.