

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 15/11/2017.

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 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**

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. ANÁLISE 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.

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.