

ALEXANDER D'ALVIA SALVONI

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM CÉLULAS OsA-CL
CULTIVADAS SOBRE SUPERFÍCIE DE IMPLANTE DE TITÂNIO
TRATADO À LASER**

São Paulo
2006

Alexander D'Alvia Salvoni

Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre superfície de implante de titânio tratado à laser

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Ney Soares de Araújo

São Paulo
2006

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Salvoni, Alexander D'Alvia

Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre superfície de implante de titânio tratado à laser / Alexander D'Alvia Salvoni; orientador Ney Soares de Araújo. -- São Paulo, 2006.

61p. : 10 fig., 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Implantes dentários – Biomateriais – Comportamento celular 2. Implantes dentários – Laser – Integrinas – Análise 3. Patologia Bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura: _____

E-mail: drsalvoni@usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvoni AD. Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre implantes de titânio tratado à laser [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a) Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a) Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a) Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a) Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a) Dr(a).

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À Talita Fakhouri Salvoni, minha esposa e minhas filhas Stephanie e Jacqueline, com amor e gratidão por sua colaboração, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Adolfo Salvoni e Lucy D'Alvia Salvoni, pelo apoio, incentivo e participação em todos os momentos de minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Thomaz Wassall, pelas inúmeras oportunidades oferecidas em minha trajetória acadêmica.

Ao meu amigo Paulo Sérgio Zaidan Maluf, pela confiança em mim devotada como amigo, companheiro e profissional.

Ao Prof. Dr. David Serson (*in memoriam*) pelo exemplo dado como profissional.

À Serson Implant, pelo auxílio dado para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, profissional dedicada e detentora de reconhecido saber conquistado ao longo de sua carreira, pela confiança depositada em mim ao fazer minha recomendação ao programa de pós-graduação desta instituição, o que certamente me valorizará como profissional.

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo a oportunidade de compartilhar seu conhecimento sobre os tecidos ósseos e sua relação com os biomateriais para implante, pela sugestão do tema de meu trabalho e atenção despendida na orientação, elaboração e correção da minha tese de doutorado.

À Profa. Dra. Suzana Orsini Machado de Souza agradeço por sua presença sempre cordial e serena, pela confiança em mim depositada na qualidade de doutorando e capacidade como implantodontista, assim como sua valiosa ajuda prestada na revisão e tradução de textos em língua estrangeira.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr., pelos créditos oferecidos que enriqueceram o meu conhecimento na área de patologia bucal, pelo seu consentimento na utilização do laboratório de cultivo celular na minha pesquisa, pelo seu tempo despendido na elaboração de meus trabalhos científicos com microscopia de varredura e pela amizade conquistada.

À Profa. Dra. Andrea Mantesso, agradeço por sua amizade e o inesgotável apoio dado as minhas atividades científicas durante todo o curso de doutorado, contribuindo imensamente no meu crescimento como profissional clínico e acadêmico.

Aos Profs. Drs. Fábio, Marina e Marília, agradeço pelos créditos oferecidos, pela ajuda na descrição de meus diagnósticos, assim como pelo convívio, companheirismo e amizade que certamente me valorizarão como ser humano e profissional.

Às secretárias do Departamento de Patologia Bucal, pela incansável atenção despendida a todos os alunos da pós-graduação na orientação do preenchimento dos inúmeros formulários necessários para concluirmos nossa pós-graduação.

Às técnicas do laboratório de Patologia Bucal Edna, Elisa e Patricia que sempre se mostraram prestativas na preparação e condução de nossas atividades laboratoriais de rotina e pesquisa realizadas neste departamento, deixo expressa toda minha gratidão.

A bibliotecária Aguida Feliziani pela importante e eficiente ajuda na revisão e formatação do texto de minha tese.

Aos meus amigos Fabiano C. Brito e Fernando M. Morelli pela parceria, respeito e amizade que conquistamos trabalhando juntos.

A minha irmã Patricia D. Salvoni pelo incontestável apoio dado em minha vida profissional e pessoal.

Aos meus colegas de pós-graduação da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade, companheirismo e incansável apoio às atividades didáticas e científicas.

A CAPES pela bolsa de Doutorado.

“O progresso é realizado pelo homem que age, e não pelo que discute de que maneira as coisas deveriam ter sido feitas.”

(anônimo)

“A felicidade está presente em toda parte, basta saber onde encontrá-la.”

(Livia Viana)

“Se você não souber para onde está indo, pode terminar em algum outro lugar.”

(Yogi Berrae)

Salvoni AD. Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre implantes de titânio tratado à laser [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que os implantes de titânio são altamente biocompatíveis e passíveis de osseointegrar, contudo os mecanismos moleculares que atuam por trás da osseointegração permanecem largamente inexplorados. Uma das possibilidades é que o implante exposto ao sangue do paciente durante a cirurgia absorve proteínas relacionadas com a adesão celular, como a fibronectina e vitronectina presentes no plasma. Células como osteoblastos podem então aderir a estas proteínas através dos mecanismos mediados pelas integrinas. No presente estudo, utilizamos a imunofluorescência para marcação dos anticorpos contra integrinas α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , α_v e β_1 em células OsA-CL cultivadas sobre lamínulas de vidro e superfície de titânio modificada por radiação à laser no período de 1h à 24 horas. As células aderidas na superfície lisa das lamínulas de vidro tiveram um maior espalhamento durante as primeiras 3 horas, porém nos outros períodos estudados o espalhamento ocorreu de maneira similar em ambas as superfícies. A expressão de integrinas na superfície rugosa dos implantes manteve-se uniforme em todos os períodos estudados, contudo no grupo controle a expressão de integrinas diminuiu na avaliação de 24 horas. Concluiu-se que as características de superfície dos diferentes biomateriais podem afetar o comportamento celular durante a interação inicial das células com a superfície de material utilizado como substrato.

Palavras-Chave: Superfície de implante; Cultura de células; Integrinas

Salvoni AD. Análise da expressão de integrinas em células OsA-CL cultivadas sobre superfície de implante de titânio tratado à laser [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Many studies have been demonstrate that titanium implants are highly biocompatible, however the molecular mechanisms that are behind of the osseointegration process are still largely unexplored. One of the possibilities is that the implant exposed to the patient blood during the surgery, adsorb proteins related to the cellular adhesion. Cells like the osteoblasts can adhere to these proteins trough the mechanisms mediated by integrins. In the present study, we used the immunofluorescence for marking antibodies against $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv and $\beta 1$ integrins on culture of OsA-CL cells on laminulas of glass and modified titanium surface modified by laser radiation in the period of 1h to 24 hs. Cells adhered in the smooth surface of laminulas of glass had a bigger spreading during the first 3 hours, however in the other studied periods the spreading occurred in a similar way in both surfaces. The expression of integrins in the roughness surface of the implants remained uniform in all the studied periods, but on the control group the integrins expression decreased in the 24-hours evaluation. We concluded that the characteristics of surface of the different biomaterials can affect the cellular behavior during the initial interaction of the cells with the surface of the used material as substratum.

Keywords: Implant surface; Cell culture; Integrins

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - do inglês adenosine 5' diphosphatase

BSA - do inglês bovine serum albumin

Cdk - do inglês cyclin dependent kinases

CSA - do inglês catalyzed signal amplification system

CSAT - do inglês cell substrate attachment antigen

DAB – diaminobenzidina

DGEA – sigla para a sequência de aminoácidos aspartina, glicina, glutamina, alanina

EGF - do inglês epidermal growth factor

FAK - do inglês focal adhesion kinase

FGF - do inglês fibroblast growth factor

GFFR – sigla para a sequência de aminoácidos glicina, fenilalanina, fenilalanina, lisina, argina

GTP - do inglês guanine 5' triphosphatase

ICAP - do inglês integrin cytoplasmic associated proteins

ILK - do inglês integrin linked kinase

kD – unidade de peso molecular quilo Daltons

MAP kinase - do inglês mitogen – activated protein kinase

MEC – matriz extracelular

N – amina

PDGF - do inglês platelet derived growth factor

RGD – sigla para a sequência de aminoácidos arginina, glicina, aspartina

SFB – soro fetal bovino

VLA - do inglês very late after activation antigens

VNR - do inglês vitronectin receptor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Aspectos estruturais das integrinas	16
2.2 Adesões focais e integrinas	19
2.3 Integrinas e seus ligantes extracelulares	20
2.3.1 ligantes da matriz extracelular.....	20
2.4 Integrinas e suas associações intracelulares	24
2.5 Integrinas e transdução de sinais	26
2.6 Integrinas e implantes	32
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Cultivo celular	35
4.2 Imunofluorescência	36
4.3 Análise dos resultados	38
5 RESULTADOS	40
5.1 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre lamínulas de vidro	40
5.2 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre implantes	44
5.3 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre lamínulas de vidro e implantes	44
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES	50

REFERÊNCIAS	51
ANEXO	56
APÊNDICES	57

1 INTRODUÇÃO

A interação inicial de células com os biomateriais envolvem o seu ancoramento e espalhamento sobre a superfície do biomaterial. Sabe-se que as células não se ancoram diretamente nos materiais, mas interagem com um material por meio de uma interposta camada de proteínas. Estas proteínas talvez sejam sintetizadas pelas células, ou talvez absorvidas do meio de cultura pelos materiais. A matriz protéica age como ligante para uma família de receptores transmembrânicos das células, chamadas de integrinas. As integrinas consistem em 2 subunidades, sendo uma denominada α e outra β . O domínio extracelular e ambas subunidades formam um sítio de união. A interação com ligante de união, resulta na formação de contatos focais e proteínas do citoesqueleto que interagem com o domínio intracelular da subunidade β (DICKESON; WALSH; SANTORO, 1998; DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999; HAAS; PLOW, 1994; HEMLER, 1998; HYNES, 1987).

Desta maneira as integrinas participam da transdução de sinais do meio ambiente para dentro da célula (ARAÚJO et al., 1999; CRIVELINI; SOUZA; ARAÚJO, 1997; FIGUEIREDO; SOUZA; ARAÚJO, 1997; JAEGER et al., 1997). As sinalizações por meio das integrinas podem regular as funções celulares, como o crescimento, a diferenciação, a migração, síntese de matriz extracelular e apoptose (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; GUAN; CHEN, 1996; GUMBINER, 1996). Sendo assim, as variações de composição e organização da camada de proteínas podem induzir mudanças na resposta celular em relação ao material. O tipo e quantidade de proteínas absorvidas e seus estados conformacionais, são afetados pelas características da superfície do substrato (GLEIBLER et al., 2000; KIPALDI; CHANG; BELLIS, 2001; KRAUSE; COWLES; GRONOWICZ, 2000).

Para obtermos maior conhecimento sobre a relação entre as propriedades da superfície dos implantes e o comportamento celular, se faz relevante a identificação da expressão de integrinas na superfície celular. Somente elucidando as interações celulares com os biomateriais seremos capazes de desenvolver implantes mais seguros e confiáveis.

Em estudos anteriores (KRAUSE; COWLES; GRONOWICZ, 2000; POSTIGLIONE et al., 2003), diversos autores já investigaram os efeitos de diferentes superfícies de titânio como substratos em culturas de células, porém nunca antes foram avaliadas as superfícies de titânio modificadas por meio de radiação à laser. No presente trabalho, observamos a expressão de integrinas em cultura de células de osteossarcoma, durante a interação inicial com a superfície de titânio modificada por radiação à laser utilizada como substrato. Examinamos os efeitos do substrato na ancoragem, espalhamento e expressão de integrinas de células de osteossarcoma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A habilidade de contato intercelular constitui um marco na evolução de organismos multicelulares. Proteínas da superfície celular proporcionam interações entre células similares, possibilitando que populações celulares formem diferentes tecidos e órgãos. Além de promoverem agregação celular, estas moléculas protéicas elaboram junções especializadas que estabilizam as ligações intercelulares, facilitando a comunicação entre células adjacentes. As células animais ainda secretam uma malha complexa de glicoproteínas – a matriz extracelular – que possui função de suporte, e funciona como importante reservatório de informações que influenciam no comportamento celular (LODISH et al., 1995).

As interações entre células e matriz extracelular (MEC), participam diretamente do controle da diferenciação celular, morfogênese, proliferação, migração e dessa forma exercem impacto nos processos de embriogênese, cicatrização e inflamação (JONES; WALKER, 1999). Esta integração é parcialmente mediada por moléculas de adesão da família das integrinas (HYNES, 1992).

As integrinas foram originariamente caracterizadas como moléculas de adesão responsáveis pela ancoragem de células à matriz extracelular, porém sabe-se hoje, que estas moléculas também estão envolvidas na dinâmica de processos fisiológicos e patológicos, como na transdução de sinais que altera o “status” fenotípico e comportamental das células (HYNES, 1992).

As primeiras descrições destes receptores reconheciam a presença de antígenos de adesão célula-substrato (CSAT- do *inglês cell substrate attachment antigen*), descrevendo sua estrutura como complexas glicoproteínas da membrana celular envolvidas na adesão célula-matriz (HORWITZ et al., 1985; HORWITZ et al., 1996; NEFF et al., 1982). O complexo

antigênico CSAT foi mais tarde denominado *integrina*, devido ao seu papel na integração adesiva entre células e matriz extracelular (HYNES, 1992; RICHARDSON; STEINER, 1995).

2.1 Aspectos estruturais das integrinas

As integrinas formam uma família de receptores transmembrânicos, heterodiméricos compostos de duas cadeias de polipeptídeos ligadas de forma não covalente – α (alfa) e β (beta) (AZUMA et al., 1996; FUCHS et al., 1997; HYNES, 1992). Quinze subunidades α e 8 subunidades β são descritas até os nossos dias, e estas combinam-se para formar cerca de vinte receptores diferentes (GUAN; CHEN, 1996; VARNER; CHERESH, 1996).

As subunidades α variam de 120 a 200kD, em peso molecular, e as cadeias β , de 90 a 100 kD. O terminal amina (N) de cada cadeia forma uma cabeça globular que contribui para a ligação entre elas, e facilita a interação da porção extracelular da molécula com seus ligantes. A cabeça globular da subunidade α contém domínios para a interação de cátions bivalentes, que são essenciais para a função das integrinas e parecem influenciar a afinidade e especificidade pelos ligantes extracelulares (ANDREOLI, 1999; GUAN; CHEN, 1996; HYNES, 1992). As subunidades β apresentam uma porção extracitoplasmática constituída de segmentos quádruplos ricos em cisteína que possivelmente são agrupados por meio de extensas ligações bissulfídicas (HYNES, 1987; TAMKUN et al., 1986).

A partir da porção globular das cadeias α e β , segmentos estendem-se através da membrana plasmática, e já no micro-ambiente intracelular, terminam em caudas citoplasmáticas curtas, usualmente menores que 50 resíduos de aminoácidos (HYNES, 1992).

Os domínios extracelulares das duas cadeias interagem com diversos ligantes, incluindo glicoproteínas da matriz extracelular e proteínas da superfície de outras células. Diversas integrinas ligam-se a seqüências RGD (Arg-Gli-Asp) de moléculas de fibronectina e vitronectina. Outras podem interagir com seqüências DGEA (Asp-Gli-Glu-Ala) do colágeno tipo 1 (HYNES, 1992; MOHRI, 1996; RUOSLAHTI, 1991).

Os domínios intra-citoplasmáticos das integrinas interagem com componentes do citoesqueleto, incluindo talina, vinculina, actina, a-actinina e tropomiosina parecem reorganizar e coordenar sinalizações envolvidas em mudanças fenotípicas e morfológicas, migração e resposta fagocítica das células (SASTRY; HORWITZ, 1993).

Os domínios citoplasmáticos das subunidades β variam de 40 a 60 aminoácidos em comprimento, e suas seqüências são bem conservadas na cadeia evolutiva. Estes domínios mostram grande homologia entre si, com exceção do segmento citoplasmático da cadeia $\beta 4$ que é muito longo, cerca de 1000 aminoácidos, e é associado a filamentos intermediários ao invés do citoesqueleto de actina (SASTRY; HORWITZ, 1993).

Assim os domínios citoplasmáticos das subunidades β e os das subunidades α são altamente conservados entre diferentes espécies. Entretanto, em contraste com as subunidades β , os diferentes domínios citoplasmáticos das cadeias α mostram pouca homologia entre si, sugerindo papéis funcionais específicos para esta subunidade (SASTRY; HORWITZ, 1993).

Algumas seqüências bem conservadas são relatadas na maioria das subunidades α . O motivo mais interessante é a seqüência GFFKR, que localiza-se adjacente ao domínio transmembrânico. A conservação desta seqüência, bem como sua localização sugere sua participação na inserção da cadeia α na membrana plasmática ou local de interação desta cadeia com proteínas do citoesqueleto (SASTRY; HORWITZ, 1993).

Devido ao número e à complexidade das integrinas, estas foram divididas em famílias de acordo com a subunidade β , o que possibilitou algumas generalizações em termos de suas funções fisiológicas (ANDREOLI, 1999).

As integrinas da família $\beta 1$ são também designadas VLA (do *inglês* - *very late after activation antigens*). Esta denominação surgiu a partir de observações da presença tardia das integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ em linfócitos, após estímulos repetitivos, *in vitro* (HEMLER, 1998).

As integrinas desta família contribuem para a organização tecidual por meio da interação com moléculas da matriz extracelular e membrana basal, estando presentes em células musculares, tecido nervoso, células epiteliais e endotélio. A família $\beta 1$ participa ainda da migração de linfócitos e “homing” linfocitário (ANDREOLI, 1999).

A família $\beta 2$, também conhecida como LFA-1 (do *inglês* - *leukocyte function-associated antigen-1*) se faz presente exclusivamente em leucócitos e tem papel crítico na migração destas células para locais de inflamação (ANDREOLI, 1999). Mutações no gene que codifica a cadeia β da família LFA-1 causa a doença autossômica recessiva chamada “deficiência de adesão de leucócitos”, caracterizada por infecções fúngicas e bacterianas recorrentes, devido a profundas deficiências nas funções adesivas de leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; POBER., 1994).

A família $\beta 3$ tem sido identificada em plaquetas e células da linhagem megacarioblástica. Os membros desta família têm importante papel na ativação de plaquetas e trombose (ANDREOLI, 1999). Além destas, novas integrinas vêm sendo identificadas e suas funções definidas por estudos celulares e moleculares.

A localização das integrinas na membrana celular parece estar associada à formação de adesões focais. A placa de adesão ou contato focal é o modelo mais estudado das interações transmembrânicas entre citoesqueleto e integrinas (SASTRY; HORWITZ, 1993).

2.2 Adesões focais e integrinas

Adesões focais constituem agregados bem desenvolvidos presentes na membrana celular, localizadas na interface de adesão entre duas células ou entre células e matriz extracelular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). Estas estruturas dinâmicas em forma de fita foram identificadas pela primeira vez através de experimentos *in vitro* associados à microscopia eletrônica (ABERCROMBIE; HEAYSMAN; PEGRUM, 1971).

A existência das adesões focais tem como pré-requisito a presença de matriz extracelular, que é iniciada através das integrinas, receptores que mediam as interações entre as células e o substrato, constituindo agregados que induzem a formação destas estruturas. Estas estruturas, por sua vez, resultam no recrutamento de estruturas citoplasmáticas e de proteínas ligadas à membrana celular, tais como paxilina, vinculina, talina, α -actinina e tropomiosina. Esta cadeia de eventos leva à maturação de organelas de adesão e à presença de actina polimerizada que possivelmente confere à adesão focal, o seu formato de fita. Portanto, os contatos focais, ou organelas de adesão maduras, servem para ancorar o sistema de microfilamentos, contribuindo, desta forma, para a determinação do formato celular durante a adesão, migração e eventos relacionados. Mudanças no formato e comportamento celular são resultados da dinâmica dos filamentos de actina em termos de sua polimerização e despolimerização, e reorganização dos microfilamentos preexistentes (DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999).

A formação das adesões focais é regulada por ambos, ligantes da matriz extracelular e eventos intracelulares de sinalização (GUMBINER, 1996). Para a formação efetiva de adesões focais, o sítio de ligação das integrinas deve estar preenchido pelo seu ligante da matriz extracelular (GUMBINER, 1996). Este evento desencadeia respostas sinérgicas que

incluem a reorganização do citoesqueleto e de placas citoplasmáticas associadas a ele, e a ativação de vias de sinalização locais (GUMBINER, 1996). As integrinas têm papel central na orquestração das adesões focais, regulando a ancoragem e funcionando como elo fundamental entre a matriz extracelular e os componentes intracelulares (DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999; SASTRY; HORWITZ, 1993).

2.3 Integrinas e seus ligantes extracelulares

A terminologia “integrina” foi originalmente atribuída para refletir o papel destes receptores na integração dos meios intra e extracelulares através do citoesqueleto e matriz extracelular, respectivamente (HAAS; PLOW, 1994).

2.3 1 Ligantes da matriz extracelular

A adesão das células à matriz extracelular é crucial na manutenção da integridade tecidual. Células ancoram-se diretamente sobre os componentes da matriz intersticial, rica em colágeno, laminina e fibronectina, ou sobre os componentes da membrana basal, que é composta de duas camadas constituídas basicamente por glicoproteínas que incluem o colágeno, laminina, fibronectina e proteoglicanas, entre outros (GUMBINER, 1996; LODISH et al., 1995).

As proteínas da matriz extracelular têm sido relacionadas à proliferação celular, polaridade, migração e diferenciação durante a morfogênese e reparação. Adicionalmente, a influência da matriz extracelular pode induzir as modulações genéticas, servindo de veículo para sinalização proveniente de citocinas e outros fatores solúveis do meio (KOUKOULIS et al., 1993).

As interações adesivas entre célula e matriz extracelular são mediadas por receptores específicos da membrana celular, e as integrinas representam ser o receptor de maior importância destas interações (CRIVELINI; SOUZA; ARAÚJO, 1997; HYNES, 1992).

A glicoproteína fibronectina e sua inter-relação com receptores de integrinas parecem ter papel importante em processos fisiológicos e patológicos. Fibronectinas compreendem uma família de glicoproteínas diméricas multifuncionais envolvidas na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, migração celular, manutenção da morfologia celular normal, organização do citoesqueleto, diferenciação e transformação celular (KOUKOULIS et al., 1993). A integrina $\alpha 5\beta 1$ é o receptor específico da fibronectina na grande maioria dos tipos celulares. As interações da fibronectina com esta integrina mediam respostas celulares de migração, recrutamento do citoesqueleto e da matriz extracelular (AKIYAMA; OLDEN; YAMADA, 1995).

Suas funções adesivas não se resumem à manutenção da ancoragem celular à matriz. Na cicatrização, fibronectina e suas interações com integrinas exercem papel ímpar na adesão de plaquetas à matriz danificada de colágeno, além de facilitar a migração e a adesão de fagócitos, e viabilizar a matriz para a proliferação celular. Fibronectina ainda parece estar relacionada ao aumento da aderência e quimiotaxia, auxiliando na manutenção da estrutura do citoesqueleto. É importante na neovascularização, estimulando a migração de células endoteliais e servindo de guia para o movimento de células epiteliais através do tecido de

granulação. Fibronectina também tem sua importância nos processos de embriogênese, regeneração de fibras nervosas e migração de células (MOHRI, 1996).

A família da laminina é um grupo de glicoproteínas constituído pela união de três cadeias, α , β e γ . Atualmente 11 isoformas de laminina foram identificadas, com diferentes sítios de ligação. Dois sítios de ligação foram encontrados na estrutura da laminina 1 e estes interagem com as integrinas $\alpha 6\beta 1/\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 1\beta 1/\alpha 2\beta 1$. Outras isoformas de laminina, interagem com as integrinas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$ (AUMAILLEY; SMYTH, 1998; BURGESSON; CHRISTIANO, 1997).

O contato celular com diferentes isoformas de lamininas leva a diferenças na estrutura e distribuição das adesões focais. A laminina 1 induz a formação de filopodia e de adesões focais compactas e bem individualizadas, enquanto que laminina 5 e outras isoformas de laminina levam ao desenvolvimento de lamelipódios que contém adesões focais pequenas e distribuídas em arranjos radiais paralelos. Análise destas estruturas através de imunofluorescência também revelou a presença da integrina $\alpha 6$ em ambos os casos, porém a integrina $\alpha 3\beta 1$ não pôde ser identificada nas interações entre células e laminina tipo 1 (DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999). Estas evidências mostram que a presença de diferentes receptores de integrinas participam de complexas vias de sinalização, interagindo com diversas isoformas de laminina (DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999).

O receptor $\alpha 2\beta 1$ é a principal integrina ligante do colágeno, estando presente em fibroblastos, plaquetas, células endoteliais e epiteliais. Suas interações com moléculas de colágeno são dependentes de cátions bivalentes, como o cálcio (DICKESON; WALSH; SANTORO, 1998).

A expressão de colágeno e colagenase também estão sob o controle das integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$ (LANGHOLZ et al., 1995). A organização espacial da matriz de colágeno e suas formas monoméricas ou polimerizadas influenciam a inter-relação com os receptores de

integrinas, atuando diretamente sobre a organização do citoesqueleto, orientação e morfologia celular. Em tipos celulares que mantêm contato com colágeno monomérico, como fibroblastos, o citoesqueleto de actina é bem desenvolvido e as adesões focais estão presentes nas extremidades dos microfilamentos. Em contraste, sobre colágeno fibrilar, as adesões focais aparecem como estruturas esmaecidas e granulares. Estas evidências mostram que o estado monomérico ou polimerizado do colágeno influencia na qualidade da matriz extracelular, que por sua vez causa alterações na morfologia e a arquitetura celular (DOGIC; ECKES; AUMAILLEY, 1999).

Outras proteínas da matriz extracelular vêm ganhando maior atenção como ligantes de integrinas, dentre elas destacam-se a tenascina e epiligrina (HAAS; PLOW, 1994). A tenascina é uma glicoproteína composta de múltiplos domínios distintos, incluindo regiões homólogas à fibronectina tipo III, que possuem a sequência RGD e são condscendentes com o espalhamento e adesão celular mediados pela integrina αv (HAAS; PLOW, 1994).

A integrina $\alpha 9 \beta 1$ também foi recentemente detectada em queratinócitos basais da pele, vias aéreas, mucosas e córnea, e, aparentemente também está envolvida na preservação da integridade epitelial e em processos patológicos ligados a ela (HAAS; PLOW, 1994).

Receptores		Ligantes
VLA-1	$\alpha 1\beta 1$	Laminina e colágeno
VLA-2	$\alpha 2\beta 1$	Laminina e colágeno
VLA-3	$\alpha 3\beta 1$	Laminina, colágeno, fibronectina, epiligrina
VLA-4	$\alpha 4\beta 1$	Fibronectina
VLA-5	$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina
VLA-6	$\alpha 6\beta 1$	Laminina
VNR	$\alpha v\beta 3$	Fibriogênio, fibronectina, vitronectina
Integrinas $\beta 4$	$\alpha 6\beta 4$	Laminina

Quadro 2.1 – Integrinas e seus ligantes extracelulares (JONES; WALKER, 1999)

2.4 Integrinas e suas associações intracelulares

No contexto da adesão celular, as integrinas participam de vias de sinalização que controlam a proliferação e sobrevivência celular, indução genética, diferenciação e mobilidade. Para realizar estas atividades biológicas, as integrinas são recrutadas para complexos intracelulares que contêm numerosas proteínas e moléculas de sinalização (HEMLER, 1998).

Os domínios citoplasmáticos das integrinas podem ligar-se diretamente a diversas proteínas do citoesqueleto. Interações com α -actinina e talina resultam na formação de adesões focais e fibras de estresse bem desenvolvidas. A associação de integrinas com filamina, proteína homodimérica que interage com os filamentos de actina, parece contribuir para a estabilidade do citoesqueleto (HEMLER, 1998; SASTRY; HORWITZ, 1993).

As caudas citoplasmáticas das integrinas também podem interagir diretamente com diversas proteínas intracelulares envolvidas na sinalização. Cytohesina-1, proteína de 200 aminoácidos, liga-se ao domínio citoplasmático da integrina $\beta 2$ e atua como fator de troca de nucleotídeos para o fator de ribosilação ADP, uma pequena proteína ligada ao GTP, ou liga-se a produtos lipídicos produzidos pela kinase (PI) 3 (HEMLER, 1998).

Associação direta das integrinas $\beta 1$ com as kinases de adesão focal (FAK) tem sido sugerida, com possível função na transdução de sinais e controle da proliferação celular. A interação das integrinas com a kinase de ligação a integrinas (ILK) também parece ser importante no controle de adesão celular, crescimento celular dependente da adesão, progressão no ciclo celular, viabilização da matriz extracelular, expressão de caderina-E, carcinogênese, sinalização através da β -catenina e transcrição de LEF-1 (HEMLER, 1998).

As proteínas associadas aos domínios citoplasmáticos das integrinas (ICAP-1), consistem de proteínas de 200 aminoácidos que interagem direta e especificamente com a região amino-terminal da cauda intra-citoplasmática da integrina $\beta 1$. O produto desta ligação é o aumento da fosforilação destas proteínas quando da adesão celular à fibronectina, gerando cascatas de sinalização (HEMLER, 1998).

As chaperonas também se ligam às integrinas e exercem, desta forma papel importante na regulação das funções destes receptores (HEMLER, 1998). As integrinas $\beta 1$ e $\alpha 6$ associam-se temporariamente à proteína chaperona calnexina antes de formarem o receptor heterodimérico, conformação clássica destes receptores. A calnexina pode contribuir com a retenção da integrina $\alpha 6\beta 1$ no retículo endoplasmático rugoso, além de facilitar sua associação heterodimérica (HEMLER, 1998; LENTER; VESTWEBER, 1994). Esta chaperona pode ainda participar do mesmo processo com relação às outras subunidades de integrinas. A calreticulina é relatada como promotora da função adesiva de certas integrinas

ou de afetar a adesão celular indiretamente por meio da indução do aumento da expressão de vinculina (HEMLER, 1998; OPAS et al., 1996).

2.5 Integrinas e transdução de sinais

Uma variedade de mecanismos de adesão reafirmam a importância da organização e comunicação celular na arquitetura tecidual. Interações celulares estáveis são necessárias para a manutenção da integridade tecidual e mudanças dinâmicas nesta adesão são importantes nos processos de morfogênese e diferenciação. Estes mecanismos de adesão são altamente regulados e intimamente relacionados aos processos de desenvolvimento, migração e morfo-diferenciação celular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; GUAN; CHEN, 1996).

O controle da adesão celular ocorre em diferentes níveis, e inclui modulação da afinidade e interações coordenadas com o citoesqueleto de actina (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). Os sinais gerados localmente através dos receptores de adesão são envolvidos em metuculosos mecanismos de regulação. Vias de sinalização são ainda influenciadas por receptores de fatores de crescimento e fatores solúveis do meio. Sinais gerados localmente através da adesão celular também interagem com vias clássicas de transdução de sinais que ajudam a controlar o comportamento celular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

A associação entre a adesão física e o desenvolvimento de sinalização integra os diversos aspectos da morfogênese, proliferação celular e diferenciação, coordenação que é essencial para a manutenção da vida (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; GUAN; CHEN, 1996).

As integrinas exercem papel fundamental na transdução de sinais que controlam a fisiologia celular. Sua capacidade de sinalização ocorre basicamente através de dois mecanismos chamados sinalização “inside out” e “outside in” que regulam as atividades proliferativas e de diferenciação de células dependentes de adesão (HYNES, 1992).

O mecanismo “inside out” é o fenômeno pelo qual a célula regula o estado de afinidade de suas integrinas. Este mecanismo parece estar relacionado com a propagação de mudanças conformacionais no sentido dos domínios citoplasmáticos das integrinas para seus sítios de ligação extra-citoplasmáticos, em resposta a eventos sinalizadores intracelulares. Evidências correlacionam estas mudanças conformacionais a eventos de fosforilação e desfosforilação, que permitem a associação de proteínas que podem regular o estado de ativação destes receptores (CLARK; BRUGGE, 1995; JONES; WALKER, 1999; MCNICOL; RICHMOND, 1998).

O mecanismo “outside in” media sinais originários da matriz extracelular após a ligação de integrinas com suas proteínas, e envolve a regulação de diversos processos celulares fundamentais, tais como a formação de adesões focais (CLARK; BRUGGE, 1995; JONES; WALKER, 1999).

As integrinas, entretanto, não funcionam, como receptores isolados, mas engajados em complexos supramoleculares nos locais de adesão celular à matriz (JULIANO, 1996). Suas caudas citoplasmáticas são em sua grande maioria, curtas, requerendo a presença de proteínas adaptativas que as conectem com o citoesqueleto, proteínas kinases e fatores de crescimento, uma vez que não há evidências da presença direta de enzimas no processo inicial de sinalização (CLARK; BRUGGE, 1995).

Estudos realizados em receptores sintéticos ou mutantes de integrinas indicam que a subunidade β é necessária e suficiente para ligar a molécula de integrina à adesão focal, enquanto que a subunidade α regula a especificidade das interações ligante-dependentes

(CLARK; BRUGGE, 1995). A interação das caudas citoplasmáticas das integrinas com as proteínas intermediadoras de sua ligação com o citoesqueleto de actina (latina, α actina, paxicilina, vinculina e tropomiosina) tem função integrante na estruturação da morfologia e mobilidade celular além de contribuir sobremaneira na associação de proteínas sinalizadoras que regulam a transdução de sinais, levando a mudanças comportamentais celulares induzidas por estes receptores (CLARK; BRUGGE, 1995; JULIANO, 1996).

Neste cenário, duas hipóteses tentam explicar os mecanismos básicos da sinalização proveniente da interação entre as integrinas e a matriz extracelular e seu controle sobre a expressão genética tendo como consequência mudanças no comportamento celular. A primeira sugere que a ligação célula-matriz extracelular intermediada pelas integrinas inicia a reorganização do citoesqueleto, resultando em mudanças profundas na morfologia celular, o que influencia seu comportamento e eventualmente o seu padrão de expressão genética (DANEN et al., 1998).

A segunda hipótese enfatiza a função das integrinas como moléculas sinalizadoras, que excitam cascatas de sinalização, gerando mudanças na expressão genética (DANEN et al., 1998).

Entre os sinais gerados pela influência das integrinas destacam-se o aumento do pH intracelular, aumento do cálcio intracelular, síntese de lipídeo inositol e fosforilação, associados às adesões focais (VARNER; CHERESH, 1986).

As vias sinalizadoras ativadas pelas integrinas foram identificadas através de análise dos eventos bioquímicos que são iniciadas pela interação destes receptores com mensageiros secundários – proteínas constitutivas ou reguladas pela fosforilação de tirosinas – processo que tem significado ímpar na viabilização das adesões focais; (CLARK; BRUGGE, 1995; JULIANO, 1996).

As tirosina-kinases, incluindo a kinase de adesão focal (FAK), parecem assumir papel central na sinalização através das integrinas (CLARK; BRUGGE, 1995; DANEN et al., 1998). Sua fosforilação e atividade aparentam estar intimamente relacionadas e controladas por estes receptores (JULIANO, 1996). FAK possui domínio central de tirosina kinase, que representa seu domínio citoplasmático, direcionando-a para os contatos focais e medindo sua interação com paxilina e domínios terminais de amina, permitindo assim, sua interação com as integrinas (JULIANO, 1996). FAK ainda participa da fosforilação de tensina e paxilina, proteínas estruturais dos contatos focais (JULIANO, 1996). A autofosforilação da FAK cria sítios de ligação das proteínas adaptativas Grb2/SOS que ativam cadeias sinalizadoras implicadas no controle da replicação celular, incluindo Src e Ras (BOURDREAU; JONES, 1999).

As cascatas de sinalização intermediadas pelas integrinas, também irão influenciar a progressão do ciclo celular através da ativação de Jun, Fos e ciclinas via Ras (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). A regulação positiva e negativa destas cascatas é mediada por fosfatases de tirosina (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

Adicionalmente, a interação das integrinas com receptores de fatores de crescimento tais como EGF, FGF, e PDGF nos sítios das adesões focais, resulta no aumento da fosforilação destes receptores, acúmulo de substratos que irão fomentar sua afinidade e avidéz por agentes mitogênicos e de sinalização, e aumento da eficiência de sinalização através das FAK (BOURDREAU; JONES, 1999).

As integrinas também promovem a ativação da MAP kinase através de sua conexão com as proteínas da matriz extracelular, que incluem fibronectina, colágeno e laminina 5. A ativação da MAP kinase parece ser independente da ativação da FAK ou Ras, portanto representando via alternativa de sinalização. A ativação da MAP kinase pelas integrinas está

implicada no controle do ciclo celular, em situações de proliferação ou diferenciação, que são moduladas pelo micro-ambiente da matriz extracelular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

A sinalização das integrinas ainda é essencial no controle do ciclo celular e sua evolução através das fases G0-G1, uma vez que estas regulam a atividade das quinases dependentes de ciclina (Cdk) e parecem estar envolvidas na sinalização de transcrição da ciclina D1 (JULIANO, 1996). Durante a divisão celular, células dependentes de adesão perdem momentaneamente sua ancoragem o que facilita a replicação. Em contraste, adesão celular a tipos específicos de matriz extracelular favorece a parada do ciclo, agindo em sinergismo com citocinas e outros fatores solúveis do meio, que orquestram juntamente com as integrinas os fenômenos de morfogênese e diferenciação celular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

Por outro lado, a perda de adesão causa o fenômeno “anoikis” em células dependentes de adesão. Este fenômeno auxilia na manutenção da integridade tecidual, impedindo a formação de colônias em locais impróprios, por células que perderam o contato com o seu meio. Este fenômeno é parcialmente controlado pela interação integrinas-matriz extracelular, que ativa cascatas sinalizadoras da morte celular programada (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

As integrinas ainda são de fundamental importância na ativação de receptores de fatores de crescimento e canais iônicos, por meio de complexos formados a partir de sua associação com o citoesqueleto, porém tais mecanismos ainda estão por ser elucidados. Sabe-se, no entanto, que a conexão de integrinas específicas aos seus ligantes extracelulares induz aumento na concentração intracelular de cálcio (CLARK; BRUGGE, 1995).

Os mecanismos supracitados de forma sumária influenciam o maquinário celular gerando modificações de seu comportamento nas mais diversas situações.

A composição da matriz extracelular é essencial para a determinação do comportamento fenotípico de cada célula. O elo entre este estímulo externo e interno que irá se transformar de acordo com ele é exercido primariamente pelas integrinas (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

A morfologia, adesão e migração celular também são dependentes da sinalização das integrinas. Células em contato com a matriz extracelular desenvolvem adesões focais nas pontas terminais de seus filopódios. A partir daí, lamelipódios repletos de actina irão se formar, contribuindo para a adesão celular à matriz. Este evento cíclico ocorre durante a migração celular, gerando tração que viabiliza a movimentação das células. As integrinas e fatores solúveis regulam o espalhamento e migração celular através da ativação de um grupo de proteínas ligadas ao nucleotídeo guanina, a família Rho, família de proteínas ligadas ao GTP, que induzem a formação de lamelipodia, adesões focais e fibras de estresse (GUMBINER, 1996).

Além disso, as integrinas promovem a ativação do complexo FAK-Scr, que propiciando a formação e dissolução das adesões focais nas frentes de migração, envolvendo quatro fenômenos dependentes da subunidade de integrina $\beta 1$, que incluem (1) o agrupamento de integrinas através da interação do citoesqueleto com a porção intra-citoplasmática das integrinas; (2) o recrutamento intracelular de moléculas adaptadoras e sinalizadoras em direção às adesões focais em formação; (3) alta afinidade de ligação das integrinas induzida pelo citoesqueleto (sinalização “inside out”), resultando em adesão firme ao substrato e (4) sinalização das moléculas de integrinas em direção ao interior da célula (sinalização “outside in”), finalmente induzindo uma série de decisões celulares que incluem adesão ou migração, diferenciação ou indiferenciação, proliferação ou apoptose (FRIELD; BROCKER; ZANKER, 1998).

Por fim, a associação das integrinas ao citoesqueleto de actina exerce força física sobre o núcleo celular, levando a mudanças no citoesqueleto que podem regular eventos nucleares independentemente de proteínas citoplasmáticas e mensageiros intermediários (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

Os conhecimentos atuais sobre as vias de sinalização relacionadas às integrinas ainda são truncados e dependentes de aprofundamento. Trabalhos neste sentido vêm sendo realizados por vários grupos de pesquisadores a fim de ampliar conhecimentos que possam fornecer subsídios para o estabelecimento de terapias baseadas nestas cascatas sinalizadoras.

2.6 Integrinas e Implantes

O contato inicial de osteoblastos com superfícies de implante via receptores específicos e integrinas é um evento de adesão para células ósseas que influencia a osseointegração dos implantes orais (KRAUSE COWLES; GRONOWICZ, 2000). A otimização topográfica e química das superfícies pode facilitar a adesão e diferenciação das células e promover a deposição de nova matriz óssea sobre o implante (SHIBATA et al., 2002).

Para ativar a osseointegração de implantes de titânio autores tem estudado as respostas dos osteoblastos a esta superfície, o que envolve a adesão celular seguida pela proliferação e diferenciação (KRAUSE; COWLES; GRONOWICZ, 2000; SHIBATA et al., 2002). Embora um grande número de estudos tenha investigado a resposta do tecido ósseo ao titânio e suas ligas, pouco conhecimento existe sobre os eventos intracelulares que acontece nos

osteoblastos frente à superfície de titânio (GEIßLER et al., 2000; KILPADI; CHANG; BELLIS, 2001; TER BRUGGE; DIEUDONNE; JANSEN, 2002).

As integrinas são receptores transmembrânicos que unem a célula à matriz protéica extracelular como a fibronectina que conecta ao citoesqueleto em sítios de adesões focais. Elas mediam um grande número de diferentes repostas celulares, dependendo do tipo celular, das integrinas expressadas por outras células e da composição do meio (MEC) (KILPADI; CHANG; BELLIS, 2001).

A sobrevivência celular e proliferação talvez sejam também reguladas por mecanismos apoptóticos. A apoptose ou a morte celular fisiológica é baseada em um mecanismo suicida celular endógeno, o qual pode ser seletivo pela célula em resposta a estímulos ainda desconhecidos (POSTIGLIONE et al., 2003). Recentemente, foi evidenciado que íons de titânio causam uma degradação preferencial maior de osteoclastos do que osteoblastos, quase como um mecanismo apoptótico (MATSUNAGA et al., 2001)

3 PROPOSIÇÃO

O presente projeto de pesquisa tem a proposição de avaliar qualitativamente a expressão das integrinas por meio do cultivo celular sobre a superfície de implantes de titânio. Para tal, avaliaremos a expressão das seguintes integrinas: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv e $\beta 1$, mapeando o processo inicial de adesão celular sobre a superfície de titânio tratada à laser.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

A linhagem utilizada foi a SJSA-1, também conhecida na literatura como OsA-CL. Esta linhagem é proveniente de osteossarcoma humano e é comercializada pela ATCC (American Type Culture Collection (VA) - USA (CRL-2098)).

As células estão estocadas em freezer de nitrogênio líquido em tubos de congelação, crio - protegidas por di-metil-sulfóxido a 10% do volume (DMSO - Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA) e no momento do uso, foram descongeladas em banho Maria a 37° C por 2 minutos. Quando em suspensão, foram transferidas para placas de Petri de 75 cm² contendo 15ml de meio de cultivo fresco (DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco - Sigma Chemical Ca, St Louis, MO, USA), pH 7,4 contendo 1% de antibióticos (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e foram mantidas em estufa à temperatura de 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As células foram observadas em microscópio de fase invertida e o meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias de acordo com o metabolismo celular.

Quando em subconfluência, as células foram subcultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. O meio de cultura foi removido, as placas lavadas com PBSA, pH 7,4 e então separadas com 1ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante alguns minutos, dependendo do tipo celular. A enzima foi inativada com meio de cultura e as células em suspensão foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos.

Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi dissolvido em meio de cultura fresco e alíquotas foram distribuídas em novas placas. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem e durante todo o experimento amostras representativas foram novamente congeladas em nitrogênio líquido.

4.2 Imunofluorescência

Todas as linhagens utilizadas nesse trabalho foram submetidas a reação de imunofluorescência para os anticorpos contra as proteínas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$ e $\beta 2$. As concentrações, os clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados encontram-se explicitados no Quadro 4.1.

Soro	Tipo	Concentração	Procedência	Clones	Incubação
Integrina $\alpha 2$	Monoclonal	1:750	Chemicon	P1E6	60 minutos
Integrina $\alpha 3$	Monoclonal	1:750	Chemicon	P1B5	60 minutos
Integrina $\alpha 5$	Monoclonal	1:750	Chemicon	NKI-SAM-1	60 minutos
Integrina $\alpha 6$	Monoclonal	1:750	Dako	BQ16	60 minutos
Integrina αv	Monoclonal	1:750	Chemicon	VNR147	60 minutos
Integrina $\beta 1$	Monoclonal	1:750	Chemicon	6S6	60 minutos

Quadro 4.1 – Anticorpos primários utilizados

Para cada uma das integrinas analisadas foram plaqueadas 500 células SJSA-1 sobre 6 pinos de implante (Serson Implus 8,0 x 3,5 mm, São Paulo, SP, Brasil) de superfície tratada termicamente por meio de radiação laser. Este tratamento é feito pelo fabricante e os pinos de implante foram adquiridos comercialmente. Na vigência do experimento, os pinos foram mantidos fixos na horizontal do seu longo eixo através do uso de grampos confeccionados individualmente com uso de fio ortodôntico nº. 9. Os grampos foram previamente esterilizados em autoclave e acoplados nos pinos, na região do montador no momento do plaqueamento das células.

Após 1, 2, 3, 6 e 24 horas para cada uma das integrinas propostas, foram fixados 2 pinos com uso de metanol previamente estocado no freezer suficiente para cobri-los. O metanol permaneceu em contato com o material por 6 minutos no freezer e em seguida, este foi lavado com 3 passagens em PBSA, 1 passagem em água destilada e 1 passagem em água Milli-Q.

Após as lavagens, foi colocada sobre a superfície de parafilme, 45 µL de solução de PBS + BSA a 1% e os pinos foram invertidos sobre essa solução com o auxílio dos grampos, de forma que a superfície onde foram plaqueadas as células permaneceu imersa por 30 minutos. Nova lavagem foi realizada, com PBS, água destilada e água Milli-Q nas mesmas condições.

Os anticorpos primários contra as integrinas diluídos em PBS+BSA a 1%, reagiram nas concentrações e tempo de incubação descritos no quadro 2.1. Posteriormente, o material foi lavado na seqüência de soluções já citada.

Após tal lavagem, foi colocado sobre o material, o anticorpo secundário (Fluoresceína anti-mouse IgG (H+L) – Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) na concentração 1:50 diluído em PBS+BSA a 1% por 45 minutos, e a reação ocorreu na ausência de luz. Lavou-se novamente com PBSA, água destilada e água Milli-Q.

A montagem do material foi realizada com uso de solução de Vecta Shield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) para visualização do núcleo das células de forma que mesmo as células negativas puderam ser evidenciadas. Para tanto, foi utilizado um corpo de acetato previamente confeccionado com superfícies lisas e transparentes para delimitar lateralmente os pinos. O material foi montado de forma que na posição inferior foi colocada uma lâmina de vidro, os pinos acoplados ao corpo de acetato foram colocados no meio e cobertos com a solução de Vecta Shield e uma lamínula de vidro foi colocada na posição superior.

O resultado das reações foi avaliado através da observação em microscopia de luz utilizando filtros específicos para observação do anticorpo secundário e do DAPI. A documentação foi realizada por captura digital das imagens em câmera digital IIICCD modelo DC330E, DAG-MTI INC, Michigan, IN-USA acoplada a microscópio (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e ao computador Power Macintosh (9600/200MP, Apple Computer, INC, Cupertino, Califórnia 95014, USA).

Para o controle da expressão das integrinas nos pinos, foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro a mesma quantidade de células e em cada tempo experimental (1, 2, 3, 6 e 24 horas) foram fixadas 2 lamínulas.

4.3 Análise dos resultados

A expressão das integrinas estudadas foi analisada em relação à localização e a intensidade da marcação por imunofluorescência. Cada integrina foi avaliada separadamente

comparando-se os diferentes tempos experimentais entre si e sua expressão também foi comparada com a expressão das células plaqueadas sobre as lamínulas de vidro.

Além disso, a expressão individual e o padrão de expressão encontrado para o painel de integrinas, foram comparados com os dados já relatados na literatura.

Dados sobre a morfologia celular foram avaliados em todos os períodos estudados e também comparados aos resultados encontrados na literatura.

5 RESULTADOS

De acordo com a metodologia empregada foi possível identificar variações do comportamento celular sobre os diferentes substratos.

Em relação à avaliação da reação da imunofluorescência, em todos os grupos, em todos os períodos em ambas condições experimentais (células plaqueadas sobre lamínulas de vidro e sobre a superfície de implante de titânio modificada a laser) obtivemos a marcação de todas as integrinas propostas para este estudo. Para melhor compreensão, os resultados foram divididos em dois grupos.

5.1 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre lamínulas de vidro

A avaliação dos resultados revelou que as células sobre a superfície da lamínula de vidro nas primeiras 2 horas apresentaram uma morfologia arredondada (Figs. 6A e 6B, p. 61). Após o período de 3 horas foram observadas células mais alongadas que por vezes também exibiam um formato estrelário com numerosos prolongamentos (lamelipódios e filipódios) em várias direções (Figs. 8A e 8B, p. 61). No período de 6 horas as células exibiram uma morfologia predominantemente alongada (Figs. 9A e 9B, p. 61), sendo que na avaliação do período de 24 horas foi possível evidenciar as células com grande espalhamento (Figs. 10A e 10B, p. 61).

A seguir dispôs-se em quadros os resultados para melhor comparação da marcação contra os anticorpos de integrinas:

<u>Integrina $\alpha 2$</u>	
	Aspectos da Imunofluorescência
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Difusa e mais intensa na periferia da membrana celular
3 Horas	Intensa na periferia da membrana celular e região perinuclear
6 Horas	Pulverizada por toda membrana, com maior intensidade nos prolongamentos
24 Horas	Menor intensidade e discreta delimitação da periferia da membrana celular

Quadro 5.1 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina $\alpha 2$

<u>Integrina $\alpha 3$</u>	
	Aspectos da Imunofluorescência
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Difusa e mais intensa na região perinuclear
3 Horas	Intensa na periferia da membrana celular e região perinuclear
6 Horas	Discreta condensação perinuclear e intensa nos prolongamentos da membrana celular
24 Horas	Menor intensidade com áreas de maior intensidade na região perinuclear

Quadro 5.2 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina $\alpha 3$

<u>Integrina α 5</u>	
Aspectos da Imunofluorescência	
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Mesmo padrão de marcação da 1 hora
3 Horas	Difusa exibindo áreas focais de maior intensidade na região perinuclear
6 Horas	Discreta condensação perinuclear com maior intensidade nos prolongamentos celulares
24 Horas	Menor intensidade com áreas de maior intensidade na região perinuclear

Quadro 5.3 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina α 5

<u>Integrina α 6</u>	
Aspectos da Imunofluorescência	
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Mesmo padrão de marcação da 1 hora
3 Horas	Intensa na periferia da membrana celular e região perinuclear
6 Horas	Pulverizada por toda membrana, com maior intensidade nos prolongamentos
24 Horas	Menor intensidade e discreta delimitação da periferia da membrana celular

Quadro 5.4 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina α 6

<u>Integrina αv</u>	
Aspectos da Imunofluorescência	
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Difusa e mais intensa na periferia da membrana celular
3 Horas	Intensa na periferia da membrana celular
6 Horas	Pulverizada por toda membrana, com maior intensidade nos prolongamentos
24 Horas	Menor intensidade e discreta delimitação da periferia da membrana celular

Quadro 5.5 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina αv

<u>Integrina $\beta 1$</u>	
Aspectos da Imunofluorescência	
1 Hora	Intensa, difusa, homogênea e de aspecto globoso
2 Horas	Mesmo padrão de marcação da 1 hora
3 Horas	Intensa na periferia da membrana celular e região perinuclear
6 Horas	Pulverizada por toda membrana, com maior intensidade nos prolongamentos
24 Horas	Menor intensidade e discreta delimitação da periferia da membrana celular

Quadro 5.6 - Aspectos da Imunofluorescência da integrina $\beta 1$

5.2 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre implantes

No grupo experimental sobre superfície de titânio modificada por radiação laser não foi possível obter imagens de grande aumento. Devido à topografia dos implantes obteve-se o aumento máximo de 20x. Em todos os grupos avaliados as células mostraram um aspecto arredondado no período de 1 hora a 3 horas de adesão (Figs. 1A à 3B, p. 59), sendo observado uma morfologia celular mais alongada a partir do período de 6 horas (Figs. 4A e 4B, p. 59). Na avaliação de 24 horas evidenciou-se o aumento de volume celular, uma vez que foi possível visualizar as células ultrapassando os limites das cavidades promovidas pelo tratamento à laser realizado pelo fabricante na superfície do implante (Figs. 5A e 5B, p. 59).

A avaliação da reação de imunofluorescência não demonstrou alteração na intensidade da marcação contra anticorpos de integrina em nenhum dos tempos experimentados. No período de 24 horas foi possível visualizar condensação na região perinuclear em todas as integrinas estudadas.

5.3 Microscopia de fluorescência das células plaqueadas sobre lamínulas de vidro e implantes

As células apresentaram um aspecto globoso e arredondado da 1ª a 3ª hora, não sendo possível evidenciarmos diferenças significativas na morfologia celular durante as primeiras 3 horas de experimento entre os dois grupos estudados (Figs. 1A à 3B; 6A à 8B, p. 59-61). Após o período de 6 horas todos os grupos apresentaram uma morfologia celular mais

fusiforme. O grupo de células cultivadas sobre a superfície rugosa dos implantes não mostraram nenhum padrão específico de orientação, porém nas primeiras 3 horas foi possível observarmos que as células estavam contidas nas cavidades criadas na superfície de titânio. Na avaliação realizada entre 6 e 24 horas em todos os grupos observamos um aumento significativo no tamanho das células.

Após o período de 3 horas no grupo controle de lamínulas de vidro a intensidade da reação de fluorescência diminuiu, enquanto no grupo experimental sobre a superfície de implantes não foi observado alteração de intensidade da fluorescência quando comparado aos períodos iniciais.

6 DISCUSSÃO

A interação de células com os materiais de implante, constitui um complexo evento que depende da topografia e composição química do substrato, capacidade de absorção de proteínas do material e de receptores de adesão superficial que as células possuem (KRAUSE; COWLES; GRONOWICZ, 2000). Os efeitos da rugosidade de superfície de implante têm sido observado em cultura de células osteoblásticas de rato e humanas, assim como em cultura de células de osteossarcoma (POSTIGLIONE et al., 2003; SHIBATA et al., 2002; TER BRUGGE; DIEUDONNE; JANSEN, 2002).

Foram observados neste estudo diferentes substratos na interação inicial de células OsA-CL. Evidenciamos diferenças na morfologia celular e expressão de integrinas entre superfícies de rugosidade e composição diferentes.

As células no substrato liso mostraram uma membrana celular com numerosas protruções em todas as direções durante a adesão celular, enquanto as células na superfície rugosa mostraram menos prolongamentos. O evento de adesão focal envolve a formação de extensões contendo filamentos de actina que em associação com fatores locais de adesão do meio extracelular estabilizam estes filamentos (HORWITZ et al., 1985). Autores como (POSTIGLIONE et al., 2003), têm sugerido que em superfícies lisas as células encontram somente um limitado número de locais para adesão e as extensões da membrana não estão estabilizadas. No entanto, nos substratos rugosos as células encontram um número adequado de locais para ancoragem (SHIBATA et al., 2002), resultando em estabilização dos filamentos de actina promovendo a associação de elementos do citoesqueleto com contatos focais (RICHARDSON; STEINER, 1995).

A adesão celular e a alteração de seu formato são importantes moduladores da função celular (SASTRY; HORWITZ, 1993). A restrição da adesão celular em osteoblastos humanos esta associada com a perda dos receptores de integrina e da formação de adesões focais (HORWITZ et al., 1985). Em muitos tipos celulares mudanças na função celular são acompanhados pelas mudanças na morfologia da célula (GUMBINER, 1996). Nestas células, a inibição do espalhamento da célula resulta em indução de apoptose e a proliferação somente acontece nas células que estão bem aderidas (BOUDREAU; JONES, 1999). Quando a aderência é restrita, também é possível ocorrer um aumento da função de diferenciação específica (FRIELD; BRÖCKER; ZÄNKER, 1998).

As propriedades das proteínas absorvidas pelo substrato talvez afetem diretamente o comportamento celular no processo de adesão. Para tanto, examinamos o formato e tamanho das células OsA-CL em superfície de titânio modificada por radiação laser e realizamos um grupo controle em lamínulas de vidro. O espalhamento da membrana celular iniciou no período de 2 horas no grupo controle e estava associado com um formato mais alongado da célula. A avaliação do tamanho celular nos diferentes substratos por meio da imunofluorescência revelou que o tamanho da célula foi claramente afetado pelas características das diferentes superfícies. As células na superfície lisa das lamínulas tiveram individualmente um maior espalhamento que as células no substrato rugoso. Isto possivelmente se deve ao fato da estrutura tridimensional do substrato rugoso. Pela conformação da superfície rugosa as células podem obter uma maior área de contato sem a necessidade de um extensivo espalhamento lateral.

Além do tamanho celular a expressão de integrinas também foi afetada pelas características da superfície do nosso substrato experimental. Tem sido demonstrado na literatura que as propriedades das integrinas talvez se alterem dependendo da característica do substrato (GEIBLER et al., 2000). Contudo, temos que enfatizar que o preciso mecanismo por

trás disto continua desconhecido, por exemplo, mudanças conformacionais das proteínas absorvidas pelos substratos podem resultar no reconhecimento por diferentes integrinas ou talvez alterar as propriedades de união das integrinas (DICKESON; WALSH; SANTORO, 1998). A avaliação de nossas culturas celulares demonstrou que as subunidades de integrinas expressas pelas células OsA-CL incluem $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv e $\beta 1$. As subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ e αv , todas combinam com a subunidade $\beta 1$ formando receptores para uma variedade de proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno, fibronectina, vitronectina e laminina (JONES; WALKER, 1999).

De acordo com a literatura, a subunidade α têm sido associada a determinação de especificidade do ligante de integrina, enquanto o domínio citoplasmático da subunidade interage com as proteínas de sinalização e do citoesqueleto. O espalhamento celular aparentemente depende da atividade da subunidade $\beta 1$ (HEMLER, 1998).

Em nosso experimento não achamos diferenças na expressão da integrina $\beta 1$ entre os diferentes substratos, mesmo as células mostrando diferenças na adesão e espalhamento sobre os dois materiais. Embora tenhamos a informação da distribuição espacial da expressão de integrinas no grupo controle, não foi possível obter esta informação no grupo experimental devido a conformação tridimensional de sua superfície. No período de 24 horas a expressão das subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv permaneceu uniforme na superfície rugosa de titânio, mas o mesmo não ocorreu na superfície das lamínulas. É possível que as células OsA-CL sob o substrato rugoso apresentem uma maior síntese de matriz extracelular como o colágeno, fibronectina e laminina.

A maior expressão dessas subunidades de integrinas, talvez possa explicar por que as superfícies de titânio rugosas têm demonstrado aumentar a formação de osso quando comparada com superfícies de titânio lisas (TER BRUGGE; DIEUDONNE; JANSEN, 2002). Ambas integrinas $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 5\beta 1$ têm demonstrado ter uma participação crítica na diferenciação

de osteoblastos, bloqueando a interação destas integrinas com seus ligantes suprimindo o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico (LANGHOLZ et al., 1995).

Neste ponto parece apropriado enfatizar que análise por meio da imunofluorescência permite somente ser utilizada para evidenciar a expressão de integrina, e isto não exclui a possibilidade de diferenças na ativação das presentes integrinas. As integrinas são frequentemente expressas em uma forma inativa que não interage com seus ligantes. Dessa forma, para a interação ligante-integrina ocorrer a integrina tem que estar ligada à matriz extracelular para atingir um estado ativo (RUOSLAHTI, 1991; HAAS; PLOW, 1994). A atividade das integrinas talvez seja regulada pela sinalização intracelular ou também perante a presença de cátions divalentes do meio extracelular (CLARK; BRUGGE, 1995). Além disso, integrinas que tem uma menor participação na adesão podem ter um maior efeito nos eventos de sinalização intracelular (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999).

7 CONCLUSÕES

A metodologia utilizada no presente trabalho, e os resultados obtidos permitem concluir:

7.1 Houve diferenças no processo de adesão celular com diferentes características de superfície.

7.2 As integrinas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv e $\beta 1$ foram expressas no grupo experimental e no grupo controle. No grupo controle de 1 hora até 24 horas houve diminuição na intensidade de expressão de todas as integrinas. No grupo experimental a intensidade de expressão das integrinas foi constante no período de 1 a 24 horas.

REFERÊNCIAS¹

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Company; 1994.

Abercrombie M, Heaysman JE, Pegrum SM. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res* 1971;61(2):359-67.

Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14(3):173-89.

Andreoli RE. Cell adhesion molecules and human disease. *Am J Med* 1999;106:466-76.

Araújo V, Souza S, Jaeger R, Loyola A, Crivelini M, Araújo N. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. *Oral Oncol* 1999;35(2):164-72.

Aumailley M, Smith N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 1998;193(1):1-21.

Azuma M, Fukui K, Yuki T, Tamatni T, Motegi K, Hoque MO. Expression of integrin subunits in normal and malignant human salivary gland cell clones and its regulation by transforming growth factor- β 1. *Cancer Lett* 1996; 109(1/2):91-9.

Boudreau NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of to come. *Biochem J* 1999;339(3):481-8.

Burgeson K, Christiano AM. The dermal-epidermal junction. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(5):651-8.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995;268(528):233-9.

Crivelini MM, Souza SOM, Araújo VC. Immunohistochemical study of acinic cell carcinoma of minor salivary gland. *Oral Oncol Eur J Cancer*. 1997;33(3):204-8.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviaturas segundo as bases Medline.

Danen EHK, Lafrenie RM, Miyamoto S, Yamada KM. Integrin Signaling: Cytoskeletal complexes, MAP kinase activation, and regulation of gene expression. *Cell Adhes Commun* 1998;6:217-24.

Dickeson SK, Walsh JJ, Santoro SA. Binding of the $\alpha 2$ integrin I domain to extracellular matrix ligands: Structural and mechanistic differences between collagen and laminin binding. *Cell Adhes Commun* 1998;5(4):273-81.

Dogic D, Eckes B, Aumailley M. Extracellular matrix, integrin and focal adhesions. *Curr Top in Pathol* 1999;93:75-85.

Figueiredo CRLV, Sousa SCO, Araújo VC. Estudo imunohistoquímico do carcinoma adenóide cístico de glândula salivar menor. *RPG* 1997;4(3):231-7.

Frield P, Bröcker EB, Zänker KS. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumour cell. *Cell Adhes Commun* 1998;6(2/3):225-36.

Fuchs E, Dowling J, Segre J, Lo HS, Yu QC. Integrators of epidermal growth and differentiation: distinct functions for $\beta 1$ and $\beta 4$ integrins. *Curr Opin Genet Biol* 1997;7(5):672-82.

Geißler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel KW. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2000;51(4):752-60.

Giancotti FC, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285(5430):1028-32.

Guan JL, Chen HC. Signal transduction in cell-matrix interactions. *Int Rev Cytol* 1996;168:81-121.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84(3):345-57.

Haas TA, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(5):656-62.

Hemler ME. Integrins associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(5):578-85.

Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckele MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin- a transmembrane linkage. *Nature* 1996;320(10):531-3.

Horwitz A, Duggan K, Greggs R, Decker C, Buck C. The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin. *J Cell Biol* 1985;101(6):2134-44.

Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48(4):549-54.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69(1):11-25.

Jaeger MMM, Araújo VC, Kachar B, Jaeger RG. Effect of spatial arrangement of the basement membrane on cultured pleomorphic adenoma cells. Study by immunocytochemistry and electron and confocal microscopy. *Vichows Arch* 1997;430(6):467-76.

Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. *Mol Pathol* 1999;52(4):208-13.

Juliano R. Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. *Bioessays* 1996;18(11):911-7.

Kilpaldi KL, Chang PL, Bellis SL. Hydroxyapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast cells than titanium or steel. *J Biomed Mater Res* 2001;16:258-67.

Koukoulis GK, Howedy M, Korhonen I, Virtanen I, Gould VE. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993;25(2):285-95.

Krause A, Cowles EA, Gronowicz G. Integrin-mediated signaling in osteoblast on titanium implant materials. *J Biomed Mater Res* 2000;52(4):738-47.

Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, et al. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *J Cell Biol* 1995;131(6 pt.2):1903-15.

Lenter M, Vestweber D. The integrin chains $\beta 1$ and $\alpha 6$ associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. *J Biol Chem* 1994;269(16):12263-8.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1995.

Matsunaga T, Kojo T, Tsujisawa T, Fukuizumi T, Wada S, Uchida Y et al. Preferential degradation of osteoclasts by titanium tetrachloride. *J Biomed Mater Res* 2001;55:313-9.

Mcnicol AM, Richmond JA. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathol* 1998;32(2):97-103.

Mohri H. Fibronectin and integrin interaction. *J Invest Med* 1996;44(8):429-41.

Neff NTC, Lowrey AT, Decker C, Damsky C, Buck C, Horwitz A. A monoclonal antibody detaches embryonic skeletal muscle from extracellular matrices. *J Cell Biol* 1982;95(2 pt 1):654-66.

Opas M, Szewczenko-Pawlikowski M, Jass GK, Mesaeli N, Michalak M. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol* 1996;135(6 pt 2):1913-23.

Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, Montagnani S, Salzano S, Di Meglio F. Behavior of SaOS-2 cells cultured on different titanium surfaces. *J Dent Res* 2003;82(9):692-6.

Richardson PD, Steiner M. *Principles of cell adhesion*. Boca Raton: CRC Press; 1995.

Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87(1):1-5.

Sastry SK, Horwitz AF. Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5(5):819-31.

Shibata Y, Hosaka M, Kawai H, Miyazaki T. Glow discharge plasma treatment of titanium plates enhances adhesion of osteoblast-like cells to the plates through the integrin-mediated mechanism. *J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(6):771-7.

Tamkun JW, Desimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF et al. Structure of integrin, a glycoprotein involved in transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 1986;46(2):271-82.

Ter Brugge PJ, Dieudonne S, Jansen JA. Initial interaction of U2OS cells with noncoated and calcium phosphate coated titanium substrates. *J Biomed Mater Res* 2002;61(3):399-407.

Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8(5):724-30.

ANEXO A – Folha de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 85/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Análise da expressão de integrinas durante a interação inicial de células OsA-CL em superfície de implante de titânio tratado a laser"*, de responsabilidade do Pesquisador **Alexander D'Alvia Salvoni**, sob orientação do Professor Doutor **Ney Soares de Araújo**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 01 de julho de 2005

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

APÊNDICE A – imunofluorescência sobre implantes de titânio com superfície tratada a laser

Fig. 1 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 2) de células aderidas sobre a superfície do implante após 1 hora de plaqueamento.

Fig. 1 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 2) de células aderidas sobre a superfície do implante após 1 hora de plaqueamento.

Fig. 2 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 3) de células aderidas sobre a superfície do implante após 2 horas de plaqueamento.

Fig. 2 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 3) de células aderidas sobre a superfície do implante após 2 horas de plaqueamento.

Fig. 3 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 5) de células aderidas sobre a superfície do implante após 3 horas de plaqueamento.

Fig. 3 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 5) de células aderidas sobre a superfície do implante após 3 horas de plaqueamento.

Fig. 4 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α v) de células aderidas sobre a superfície do implante após 6 horas de plaqueamento.

Fig. 4 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α v) de células aderidas sobre a superfície do implante após 6 horas de plaqueamento.

Fig. 5 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina β 1) de células aderidas sobre a superfície do implante após 24 horas de plaqueamento.

Fig. 5 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina β 1) de células aderidas sobre a superfície do implante após 24 horas de plaqueamento.

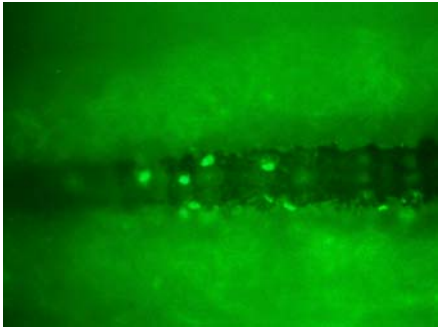


Fig.1A

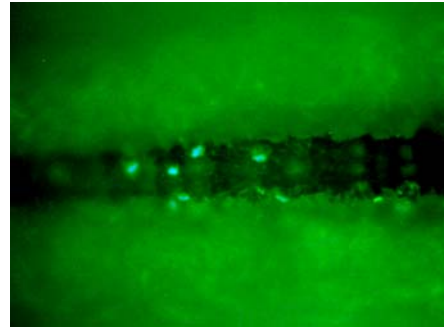


Fig.1B

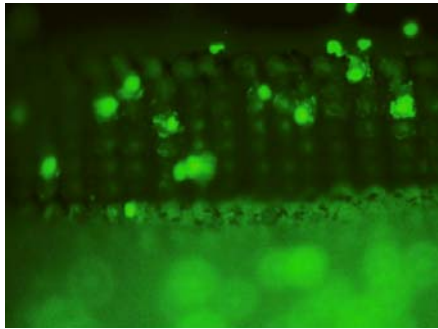


Fig.2A

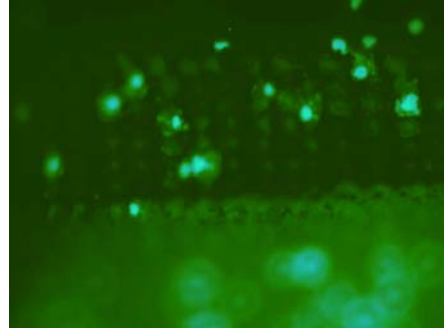


Fig.2B

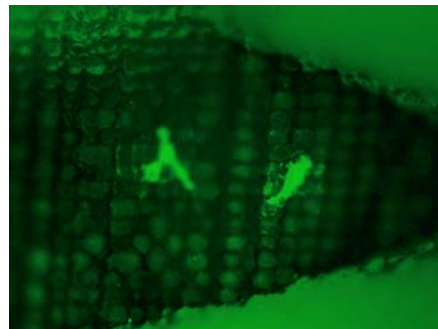


Fig.3A

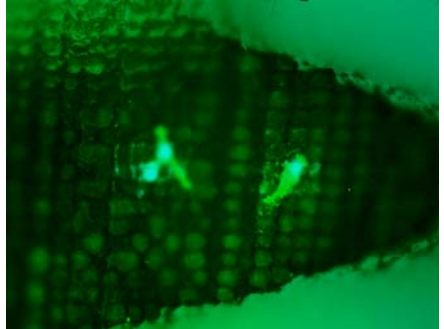


Fig.3B

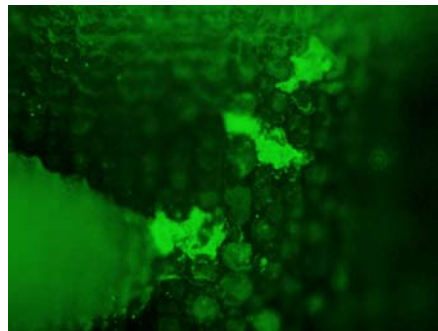


Fig.4A



Fig.4B



Fig.5A



Fig.5B

APÊNDICE B - imunofluorescência sobre lamínulas de vidro

Fig. 6 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 2) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 1 hora de plaqueamento.

Fig. 6 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 2) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 1 hora de plaqueamento.

Fig. 7 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 3) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 2 horas de plaqueamento.

Fig. 7 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 3) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 2 horas de plaqueamento.

Fig. 8 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α 5) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 3 horas de plaqueamento.

Fig. 8 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α 5) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 3 horas de plaqueamento.

Fig. 9 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina α v) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 6 horas de plaqueamento.

Fig. 9 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina α v) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 6 horas de plaqueamento.

Fig. 10 A - Fotografia de imunofluorescência (integrina β 1) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 24 horas de plaqueamento.

Fig. 10 B - Fotografia de imunofluorescência com marcação do DAPI e anticorpo secundário (integrina β 1) de células aderidas sobre a lamínula de vidro após 24 horas de plaqueamento.

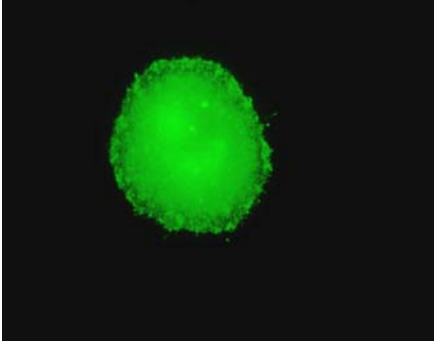


Fig.6A

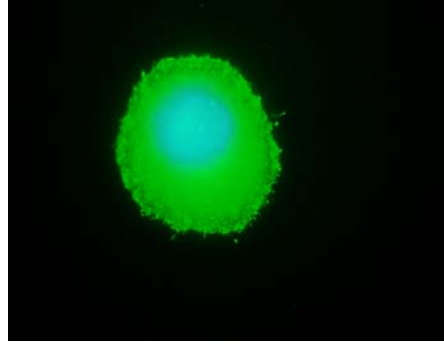


Fig.6B

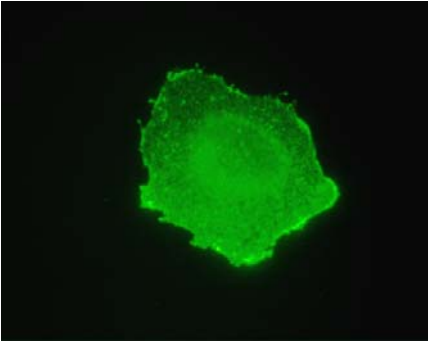


Fig.7A

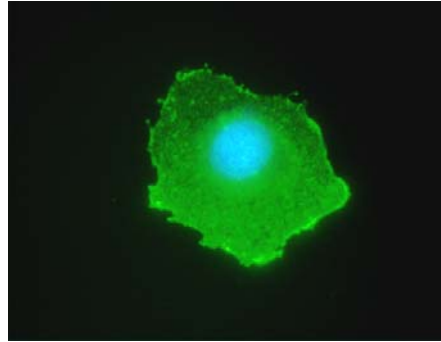


Fig.7B

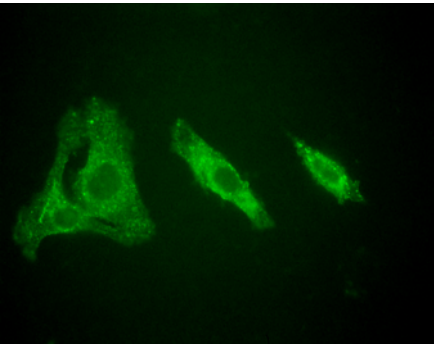


Fig.8A

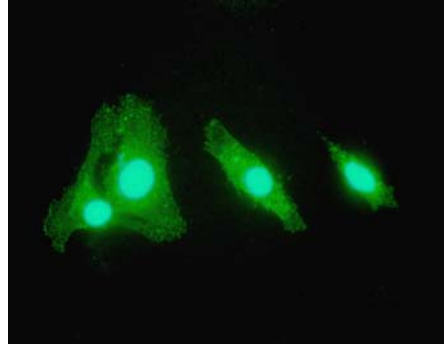


Fig.8B

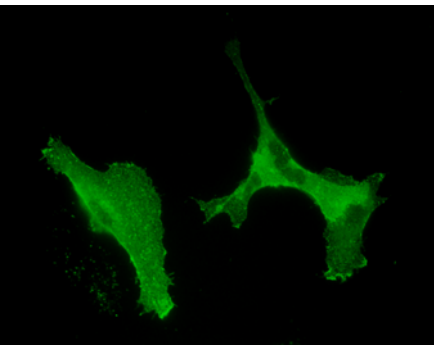


Fig.9A

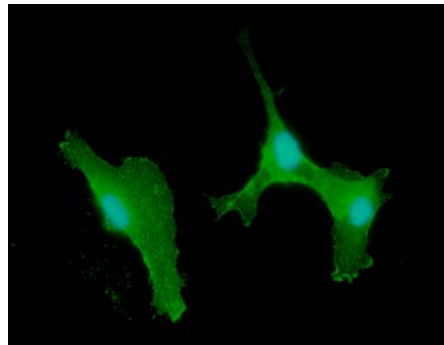


Fig.9B

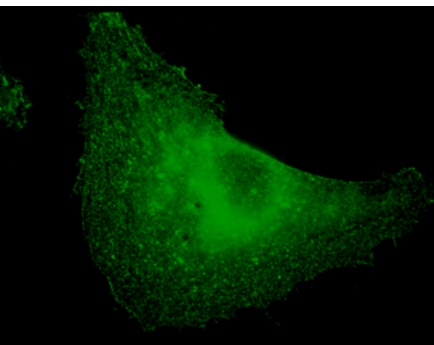


Fig.10A

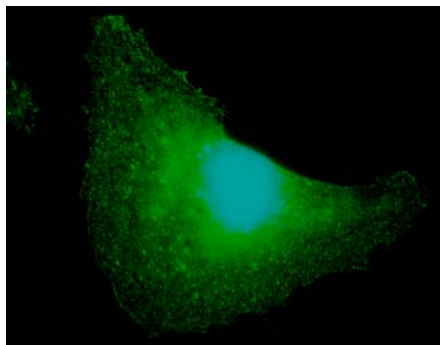


Fig.10B