

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/02/2018.

**OsteoBLAST: Rotina computacional de análise molecular global
aliada à biologia sistêmica e aplicada à produção de biomateriais**

Marcel Rodrigues Ferreira

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, *Campus*
de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**OsteoBLAST: Rotina computacional de análise molecular global
aliada à biologia sistêmica e aplicada à produção de biomateriais**

MARCEL RODRIGUES FERREIRA

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, *Campus*
de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia.

Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU – SP
2017

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

Ferreira, Marcel Rodrigues.

OsteoBLAST : rotina computacional de análise molecular global aliada à biologia sistêmica e aplicada à produção de biomateriais / Marcel Rodrigues Ferreira. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi
Capes: 90400003

1. Biotecnologia. 2. Materiais biomédicos. 3. Análise de microarranjo. 4. Fosforilação. 5. Bioinformática.

Palavras-chave: Bioinformática; Biologia sistêmica; Biomateriais; Fosforilação; Osso.

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais por me guiarem e apoiarem em todos os momentos da minha vida , em especial durante o este período. Sem eles nada seria possível.

Aos meus amigos de Itapetininga por me permitirem dividir algumas das histórias mais fantásticas que vivi.

Aos meus eternos coleguinhas, sejam da VIII turma de Física Médica do Instituto de Biociências de Botucatu ou de outros cursos da nossa querida faculdade, por todos os momentos de aprendizados que vivemos juntos. Parece que os bixos de 2011 estão virando gente grande.

Aos meus colegas de equipe de tênis de mesa da atlética geral de Botucatu por todos os treinos e Inters juntos. Mesmo longe estamos juntos!

A todos os membros da república Põe na mão de Deus, meus veteranos e meus bixos, seja pelas discussões, seja pelas risadas. Foram sempre a família e a base que tive em Botucatu.

Aos meus colegas de cursinho do IB. Obrigado por compartilharem a paixão pela prática da docência, mesmo quando sem apoio algum.

Ao professor Dr. Maikel Peppenlenbosch, da Erasmus Medical Center, pelo auxílio nos experimentos com o PamChip®, além de auxiliar na análise dos dados.

Ao dr. Renato Milani por toda a orientação e paciência em todos os skypes e e-mails trocados. Sem isso não seria possível.

A todos meus colegas de pós graduação em Biotecnologia. Todos os perrengues que passamos foram fundamentais no processo de aprendizado durante este período.

Aos colegas de departamento, em especial a Gabi e a Elaine pelas risadas e por nos proporcionar nosso glorioso café de cada dia.

A professora Margarida Juri Saeki pelo auxílio nas análise de MEV e a todos os técnicos do CME-IBB pelo preparo das amostras.

Ao meu caro colega Rafael Innocenti por todas nossas discussões filosóficas, políticas e científicas. Me fez sair melhor a cada conversa que tivemos.

Aos membros do laboratório de bioensaios e dinâmica celular pela convivência durante este período. Vou levar o carinho de vocês por toda minha vida.

Ao meu orientador, professor Willian Zambuzzi, por ter me recebido em seu grupo, ter me guiado neste período, além de todo o apoio dado a todo momento.

A FAPESP pelo apoio financeiro dado a este projeto através dos processos 2015/03639-8 e 2014/22689-3, fundamental para a minha manutenção neste período.

Por último agradeço a todos que demonstraram carinho me incentivando e acreditando em mim durante todo este período. Foram responsáveis pela manutenção do meu sorriso. Não poderia citar todos os nomes aqui, mas espero que sintam-se todos abraçados.

“Os registros mostram, eu recebi as pancadas

E fiz tudo do meu jeito”

(Frank Sinatra)

Resumo

As tendências na terapia com implantes têm incluído a modificação de suas superfícies utilizando ferramentas de nanotecnologia e princípios de bioengenharia, aumentando seu desempenho quando implantado. Embora muito se tenha alcançado em ferramentas para desenvolvimento destes materiais, metodologias de avaliação biológicas não avançaram nesta velocidade. Amparados por ferramentas de bioinformática e utilizando conceitos de biologia sistêmica, o objetivo deste trabalho foi produzir uma metodologia computacional, alternativa ao uso de experimentação animal, capaz de detectar e analisar o quonoma da resposta da interação célula-biomaterial, obtida com ensaio de microarranjo de peptídeos. Estes dados servirão para a construção de um banco de dados para guiar a produção de biomateriais para a área médico-odontológica. Batizaremos este de OsteoBLAST. Para tanto, fizemos uso de superfícies de titânio com diferentes superfícies (maquinado e duplo ataque ácido), as quais foram desafiadas com o cultivo de células tronco indiferenciadas. As amostras biológicas foram utilizadas para avaliar quinases diferencialmente ativadas através de substratos sintéticos, cuja metodologia é conhecida como PamGene, as quais foram reunidas em um banco de dados chamado OsteoBLAST, o qual foi constituído através de um algoritmo em quatro etapas que selecionou os resultados confiados de PamGene, em seguida obtendo o quonoma diferencial e um nível de similaridade com superfícies amplamente usadas na rotina. Nossos resultados mostraram que o algoritmo adotado desempenhou eficientemente a comparação entre as superfícies avaliadas, revelando as proteínas EGRF, ENO2, EPHA4, FRK, KRT6B, NCF1, PDPK1, PDGFRB e KDR envolvidas neste cenário molecular de resposta. Em conjunto, nossos resultados mostram que o algoritmo OsteoBLAST pode ser usado como uma potente ferramenta *in silico* para investigar potenciais biomateriais destinados à aplicações biomédicas, servindo-se como ferramenta de análise, capaz de otimizar o setor produtivo e diminuir o uso de animais de experimentação.

Palavras-chave: osteoblastos; adesão celular; Transdução de sinais; Bioinformática; Novas tecnologias.

ABSTRACT

Current trends in implant therapy have included the modification of their surfaces using nanotechnology tools and principles of bioengineering, increasing their performance when deployed. Although much has been achieved in tools for developing these materials, biological analysis methodologies did not advance at this speed. Supported by bioinformatics tools and using concepts of systemic biology, the objective of this work was to produce a computational methodology, alternative to the use of animal experimentation, capable of detecting and analyzing the kinome of the response of the cell-biomaterial interaction, obtained with microarray peptides. These data will serve to build a database to guide the production of biomaterials for the medical-dental area. We will baptize this one from OsteoBLAST. To do so, we made use of titanium surfaces with different surfaces (machined and double acid etched), which were challenged with the cultivation of undifferentiated stem cells. Biological samples were used to evaluate differentially activated kinases through synthetic substrates, a methodology known as PamGene, as the banks were assembled in a database called OsteoBLAST, which consists of a four-step algorithm that selected the results confident of PamGene, then obtaining the differential kinome and a level of similarity with surfaces widely used in the routine. Our results showed that the EGFR, ENO2, EPHA4, FRK, KRT6B, NCF1, PDPK1, PDGFRB and KDR as proteins involved in this molecular response scenario were efficiently compared. Together, our results show that the OsteoBLAST algorithm can be used as a powerful in silico tool to investigate potential biomaterials for biomedical applications, serving as an analysis tool capable of optimizing the productive sector and reducing the use of experimental animals .

Keywords: osteoblasts; cell adhesion; transduction of signals; bioinformatics; new technologies.

SUMÁRIO

1. Introdução	19
1.1 Osso: aspectos gerais	20
1.2 Biomateriais.....	20
1.3 Mecanismos de transdução de sinais celulares: Balanço de quinases e fosfatases.....	22
1.4 Adesão de Células Sobre Materiais: Primeiro Passo Integração de Biomateriais e Regeneração Óssea.....	24
1.5 Quinoma	25
1.6 Animais em experimentação	26
1.7 Biologia sistêmica	29
1.8 Bioinformática.....	30
2. Objetivos.....	33
3. Materiais e métodos.....	34
3.1 Cultivo celular.....	34
3.2 Disco de titânio	34
3.3 Morfologia celular	34
3.4 PamChip.....	34
3.5 Bioinformática aplicada: OsteoBLAST.....	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1 OsteoBLAST.....	36
4.2 PamChip® tirosina quinase	36
4.3 Algoritmo	37
4.3.1 Seleção	38
4.3.2 Normalização	41
4.3.3 Verificação.....	42
4.3.4 Comparação	44

4.4	Superfícies teste	45
4.5	Resultados para a superfície com duplo ataque ácido (DAA)	47
4.6	Resultados para a superfície com hidroxiapatita na escala manométrica (Ti). 49	
4.7	Análise Biológica	51
4.7.1	Análise de redes proteicas para o grupo DAA-Maq.....	51
4.7.2	Análise de redes proteicas para os grupos Ti-Maq.	59
4.7.3	A via de sinalização ErbB	63
4.7.4	O ponto de adesão focal	65
4.7.5	Proteínas que não participam de redes	67
5.	Constatações.....	68
6.	Conclusão	69
7.	Perspectivas futuras	70
8.	Bibliografia.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de scaffolds utilizados no tratamento de lesões ósseas. (https://horizon-magazine.eu/article/live-cells-could-be-used-reconstruct-faces_en.html , http://www.virtualscience.com/cad_rp_section/cad_rp_popups/bone_scaff_popup.htm , http://www.medicaldevice-network.com/features/feature359/feature359-1.html).	
Acessado em 15/01/2017.....	21
Figura 2 – Mecanismos de transdução de sinais. Estímulos físico-químicos são captados pela célula através de receptores transmembranas. Estes darão início a uma cascata de eventos intracelulares controlados pelo balanço da fosforilação. Ao final desta cascata uma maquinaria gênica será ativada no núcleo da célula podendo resultar na modificação de eventos como proliferação, diferenciação, adesão, alteração do metabolismo celular, entre outras.	22
Figura 3 – Balanço da fosforilação proteica. Quinases são enzimas que transferem um grupo fosfato do ATP para uma proteína X, assim fosforilando-a. Já fosfatases são enzimas que atuam no sentido contrário retirando o grupo fosfato da proteína X fosforilada, porém o fosfato não é devolvido ao ADP e sim ao citosol.	23
Figura 4 - Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular. Integrinas ligam o meio extracelular com o citoesqueleto da célula. Após captar sinais extracelulares as integrinas mobilizaram moléculas de sinalização para o ponto de adesão focal. O balanço da fosforilação de FAK, Src e paxilina e, ao final desta cascata, a cofilina levará um sinal intracelular que será responsável pelo rearranjo dos filamentos de actina. Estas alterações do citoesqueleto são responsáveis por adaptações celulares a superfícies diferentes. Fonte: ZAMBUZZI et al., 2011.....	25
Figura 5 - O zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram em 1959, “The Principles of Humane Experimental Technique”. Este trabalho foi um marco para a experimentação em animais por inserir o conceito dos 3 Rs, Replacement, Reduction e Refinement. Embora diversos avanços na área tenham ocorrido, o cerne da ética e da busca a métodos alternativos se encontra nesta obra.....	27
Figura 6 – Esquema das etapas necessárias para um medicamento, vacina ou, como em nosso caso, um biomaterial chegar ao ser humano. Primeiramente são realizados testes em culturas de células. A próxima etapa será experimentos em animais de pequeno porte, como ratos ou camundongos. O cãozinho Snoopy do desenho “Peanuts”,	

representa o passo seguinte, experimento em animais de maior porte como cães. Só aprovado em todos estes passos será levado ao ser humano.	29
Figura 7 – Criado em 1986 o número de sequências depositadas cresce ano após ano desde então. Atualmente são 551.987 diferentes sequências depositadas. Fonte: http://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot	31
Figura 8 - Gráfico do número de trabalhos adicionados no PubMed por ano de 1950 até 2012. Fonte: VARDAKAS et al.	32
Figura 9 - Esquema de PamChip(r) tirosina quinase. XXXXXXYXXXXXX respresenta uma sequência qualquer de resíduos de aminoácidos que contenha um resíduo tirosina (Y). Anticorpo PY20 conjugado com FITC serão transferidos ao sequência através da fosforilação do resíduo tirosina, catalisada pela atuação de uma quinase.....	37
Figura 10 - Fluxograma do algoritmo de OsteoBLAST.....	38
Figura 11 - Exemplo de arquivo saída da etapa de seleção. A primeira coluna, protein, contém o nome das proteínas de acordo com o código do spot do PamChip®. Já nas colunas M_m, A_m e SD_m, contém respectivamente a mediana, média e desvio padrão de cada proteína. P1_m e P2_m contém os valores dos parâmetros P1 e P2, e cP1_m e cP2_m contém a classificação. cE_m contém os valores da classificação de estrelas baseada nos parametros P1 e P2.	41
Figura 12 – Exemplo da etapa de normalização. Na primeira coluna temos o código do spot, nas 2, 3 e 4 temos os valores de intensidades obtidos para as triplicatas para cada spot. Nas colunas 5, 6 e 7 temos os valores do quinto percentil para cada coluna de triplicatas, nas colunas 8, 9 e 10 temos os valores do nonagésimo quinto percentil de cada coluna de triplicatas e nas colunas 11, 12 e 13 temos os valores de intensidade já normalizados de acordo com a equação 1.	42
Figura 13 - Modelo saída de resultados da verificação de fosforilações significantemente diferentes entre dois grupos, neste caso a comparação entre os grupos Maq e DAA. A primeira coluna contém o código dos spots em PamChip®, a coluna var_m_daa contém os valores do teste F, caso eles sejam menores que 0,05 a coluna sigvar_m_daa recebe o valor 1, caso contrário recebe 0. A coluna pv_m_daa recebe o valor de P para o teste t, caso o valor da coluna sigvar_m_daa seja 1, ou do teste U, caso o valor da coluna sigvar_m_daa seja 0. Por ultimo, a coluna sigpv_m_daa apresenta valores de 1 ou 0 de acordo com a significancia dos valores da coluna pv_m_daa, 1 caso <0,05 e 0 caso >0,05.....	43

Figura 14 - Modelo de saída do arquivo rptProtein. A primeira coluna contém o código dos spots de PamChip®, a segunda contém o nome da proteína segundo UniProt, a terceira contém o gene que codifica e a quarta o código de acesso da proteína em UniProt.	44
Figura 15 - Comportamento celular frente a diferentes tratamentos na superfície. Superfície maquinada em com magnificação de 500x (A) e de 5000x (B), e superfície com cobertura de hidroxiapatita em escala nanométrica (HANano). É possível perceber que células estão com um processo de “spreading” avançado na superfície com HANano em comparação com a superfície maquinada. Imagens obtidas no CME – IBB.....	46
Figura 16 - Localização de carbono e titânio nos discos. As figuras A e D contém imagens da microscopia eletrônica para as superfícies maquinada e com hidroxiapatita em escala nanométrica. As figuras B,C,E e F foram obtidas com EDX. B e E mostram a localização de carbono nas superfícies, e C e F mostram a localização de titânio na amostra. A maior dissipação de carbono no grupo com superfície modificada (E) pode indicar um processo de “spreading” mais acelerado que na superfície maquinada (B). 47	47
Figura 17 - Gráfico de pizza para as frequências de Ce do grupo DAA. 40 spots (27,78%) possuem Ce = 5, estes passarão pelas etapas de normalização e verificação.48	48
Figura 18 - Gráfico de pizza para as frequências de Ce do grupo Ti. Apenas 17 spots (11,81%) possuem Ce = 5, estes passarão pelas etapas de normalização e verificação.50	50
Figura 19 - Rede obtida através de STRING database para EGFR, ENO2, EPHA4 FRK, KRT6B, KDR, NCF1, e PDGFRB.	52
Figura 20 - Rede expandida buscando mais interações. A partir das seis primeiras proteínas a rede foi expandida, utilizando os seguintes parâmetros: Não mais do que 10 interações na primeira camada, não mais do que 200 interações na segunda camada e índice de confiança superior a 0.900, considerado altíssimo.	53
Figura 21 - Gráfico de Betweenness centrality para a rede DAA - Maq. EGFR(0.079), Src(0.071) e GRB2(0.065) foram nodos que apresentaram os maiores valores.....	54
Figura 22 - Gráfico de Closeness centrality para a rede de DAA - Maq. Src(0.682), GRB2(0.670) e EGFR(0.666) foram nodos que apresentaram maiores valores.	54
Figura 23 - Cluster 1 para a rede DAA-Maq, com 26 nodos e score de 17,92.....	56
Figura 24 - Cluster 2 para a rede DAA-Maq, com 65 nodos e score de 14,688.....	56
Figura 25 - Layout de DAVID para a rede inicial da rede DAA-Maq	57
Figura 26 - Layout de DAVID tools para funções presentes no cluster 1.....	58

Figura 27 – Layout de DAVID tools para funções biológicas obtidas com <i>Funcional Annotation Chart</i> do DAVID tools para o cluster 2.....	59
Figura 28 - As proteínas que apresentaram fosforilação diferencial para o grupo Ti-Maq não apresentam um comportamento de rede.	59
Figura 29 - Rede expandida para o grupo Ti-Maq. A rede foi construída a partir das proteínas NCF1 e PDPK1 que não possuíam ligações entre si.	60
Figura 30 - Gráfico de Betweenness centrality para a rede de Ti-Maq. HSP90AA1(0.168), AKT1(0.164) e UBC(0.157) foram os nodos que apresentaram maiores valores para esta centralidade.	61
Figura 31 - Gráfico de Closeness centrality para a rede de Ti-Maq. UBC(0.685), AKT1(0.683), HSP90AA1(0.632) e Src(0.583) foram os nodos que apresentaram maiores valores para esta centralidade.	61
Figura 32 - Cluster para a rede de Ti-Maq com score de 12,333 e 31 nodos.....	62
Figura 33 - Layout de Functional Annotation Chart para o cluster de Ti-Maq.....	63
Figura 34 - Via de sinalização de ErbB. Fonte: KEGG pathway.	64
Figura 35 - Mecanismo de dimerização de membros da família ErbB é fundamental para a ativação da via. O processo de dimerização da ErbB-2 não depende de estímulos externos e depende do desligamento das chaperonas HSP90 e CDC37 de sua cauda citosólica. Ao ser desligada das chaperonas, ErbB-2 é capaz de se dimerizar com outros membros ErbB, e ao se dimerização fosforilar resíduos presentes na cauda citosólica que darão início ao mecanismo de sinalização.	65
Figura 36 - Complexo de adesão focal. Fonte: KEGG pathway	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tabela de valores de Ce (classificação por estrelas) para "spots" dependendo do nível dos parâmetros P1 e P2.....	39
Tabela 2 - Resumo das frequências de Ce para cada combinação em cada grupo.....	40
Tabela 3 – Frequência de spots por nível de confiança no processo de seleção de OsteoBLAST para a superfície com duplo ataque ácido (DAA).	48
Tabela 4 - Lista de proteínas com diferenças estatísticas detectadas na etapa de verificação. As informações sobre o gene que as codificam, o resíduo fosforilado e o código de acesso no Uniprot completam a tabela.	49
Tabela 5 - Frequência de spots por nível de confiança no processo de seleção de OsteoBLAST para a superfície com hidroxiapatita em escala nanométrica (Ti).	50
Tabela 6 - Lista de proteínas com diferenças estatísticas detectadas na etapa de verificação para o grupo Ti. As informações sobre o gene que as codificam, o resíduo fosforilado e o código de acesso no Uniprot completam a tabela.	51

LISTA DE ABREVIACÕES

A	Média
ADP	Adenosina difosfato
AKT1	Proteína serina/treonina quinase RAC-alfa
APK	Proteínas quinases atípicas
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAMPK	Proteína quinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
CDC37	Chaperona CDC37
Ce	Classificação de estrelas
CME	Centro de microscopia eletrônica
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAA	Superfície com Duplo Ataque Ácido
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBI	Instituto Europeu de Bioinformática
EDX	Espectroscopia por dispersão de raios x
EGF	Fator de crescimento endotelial
EGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial
ENO2	Gama enolase
EPHA4	Receptor de efrina do tipo-A 4
EPK	Proteínas quinases eucariotas
ErbB	Receptor proteína tirosina quinase ErbB
EROS	Espécies reativas de oxigênio

FAK	Quinase de adesão focal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRK	Proteína tirosina quinase FRK
GRB2	Proteína ligante do fator de crescimento 2
HSP90AA1	Chaperona HSP90
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
KDR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2
KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto
KRT6B	Queratina citoesquelética, do tipo II, 6B
LWM-PTP	Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular
M	Superfície Maquinada
M	Mediana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKp38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
NCF1	Fator citosólico de neutrófilos 1
NIH – NCBI	(National Institutes of Health – National Center for Biotechnology Information)
NLM	Biblioteca Nacional EUA de Medicina
P1	Parâmetro 1
P2	Parâmetro 2
p5	Quinto percentil
p95	Nonagésimo percentil
Pax	Paxilina
PDB	Banco de dados de proteína

PDGFRB	Receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas beta
PDPK1	Proteína quinase 3-fosfoinositida-dependente 1
PIR	Recurso de Informação de Proteína
PTP	Proteína tirosina fosfatases
PTP1B	Proteína tirosina fostase 1B
PY20	Fluoresceína de ligação
RNA	Ácido ribonucleico
S	Serina
Sd	Desvio padrão
SIB	Instituto Suíço de Bioinformática
SOS1	Son of Sevenless
Src	Proteína tirosina quinase Src (sarcoma)
T	Treonina
TGF- α	Fator de crescimento transformante alfa
Ti	Superfície com HAnano
UBC	Poli-ubiquitina C
Y	Tirosina

1. Introdução

Defeitos ósseos constituem um dos problemas mais prementes na área médico-odontológica. A reconstrução do tecido lesado é um dos maiores desafios dos cirurgiões, sendo muitas vezes necessária a aplicação de um biomaterial que permita uma boa regeneração tecidual. Nesta área, os materiais osteo-substitutos constituem uma das mais comuns e antigas formas de terapia regenerativa. Para se ter uma ideia, arqueólogos encontraram, no Peru, um crânio de um chefe tribal, datado de 2000 a.C., em que uma placa de 1 mm de espessura de ouro batido cobria um defeito ósseo (HENKEL et al., 2013). Até o presente momento, não foi desenvolvido nenhum material sintético que reúna as propriedades e capacidades ofertados pelo material autógeno, conhecidamente como material ideal. Os materiais atualmente disponíveis, carecem de estabilidade e retenção, o que implica em dificuldades na mastigação, podem causar dores por se moverem e se soltarem (SOHRABI et al., 2012).

A pesar de ser uma área com alto impacto médico, social e econômica, e de serem amplamente estudados, biomaterias tem recebido pouco investimento em novas ferramentas capazes de prever e ranquear novos produtos. Desta forma, as pesquisas realizadas por companhias e universidades acabam por utilizar-se de modelos experimentais tradicionais que façam uso de modelos com animais, o que compromete os avanços da área. Neste sentido conhecer os mecanismos intracelulares surge como uma alternativa. Uma vez detectados biomarcadores envolvidos na resposta da interação célula-biomaterial será possível monitorar estes em novos biomateriais podendo prever o sucesso de sua implantação comparando-os a biomateriais já conhecidos.

Ferramentas computacionais são fundamentais na organização de dados, como por exemplo bancos de dados biológicos para as mais diversas áreas, além de estarem em constante desenvolvimento de novos métodos de bioanálises. Posto isto, a obtenção e organização de biomarcadores da interação célula-biomaterial pode guiar o processo de produção destes. Neste sentido, temos centrado esforços na elaboração de um banco de dados que possa reunir dados de proteínas intracelulares, disparadas em resposta aos mais variados biomateriais.

1.1 Osso: aspectos gerais

O tecido ósseo é um tecido altamente dinâmico capaz de se remodelar ao longo de toda a vida. Além de fornecer suporte e proteção para tecidos moles, o tecido ósseo atua como reserva de minerais, como cálcio, magnésio e fósforo necessários para a manutenção de diversos processos fisiológicos (GEMINI-PIPERNI et al., 2014; ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010). Devido a capacidade de armazenar e mobilizar estes íons minerais para o corpo se faz necessária uma alta vascularização do tecido ósseo.

O tecido ósseo é composto por três tipos celulares: osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, como colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas, além de promover a mineralização do tecido. Ao terminar de sintetizar a matriz o osteoblasto, aprisionado, é chamado de osteócito. Já os osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção da matriz, passo fundamental no processo de remodelagem do tecido ósseo.

Uma vez lesado o tecido ósseo, a cicatrização pode ocorrer por dois processos: reparação e regeneração. A regeneração ocorre quando o tecido danificado é povoado com base na proliferação e diferenciação das células originais do tecido. Assim sendo, o tecido regenerado possui as mesmas propriedades funcionais e aspectos morfológicos do tecido primitivo. Já no processo de reparação o tecido danificado é substituído por um tecido conjuntivo fibroso, resultando em uma cicatriz de colágeno. Isto acarreta em uma perda das características e funções originais. Atualmente a regeneração do osso é vista como prioritária, em relação a reparação, em casos de traumas. Desta forma recuperando a forma e as funções originais do osso (ZAMBUZZI et al., 2011b).

1.2 Biomateriais

A engenharia de tecidos para o osso tem se apoiado principalmente em três aspectos básicos: 1) o recrutamento de células competentes, 2) moléculas de sinalização capazes de estimular as células no sentido de uma resposta eficaz e 3) matrizes de suporte, capazes de direcionar e sustentar a formação do osso durante sua regeneração, os biomateriais.

Recentemente, foi constatada a necessidade da inclusão de um novo pilar: a estabilidade mecânica (MANISCALCO; CAFORIO, 2016; WEE et al., 2016). Pesquisas mostraram que a estabilidade do microambiente no qual a lesão se encontra influencia no sucesso da resposta biológica dos outros três aspectos já citados.

Idealmente o biomaterial deve ser capaz de recrutar células osteoprogenitoras para a região da lesão, além de estimular sua proliferação e diferenciação. Caso o biomaterial não induza a uma cascata de eventos biomoleculares que acelerem a regeneração óssea, deve ao menos servir como “scaffold” para a proliferação de migração de células hospedeiras (ZAMBUZZI et al., 2011b). O biomaterial deve também garantir uma boa estabilidade a região da lesão, assim promovendo o bem estar do paciente (SOHRABI et al., 2012).

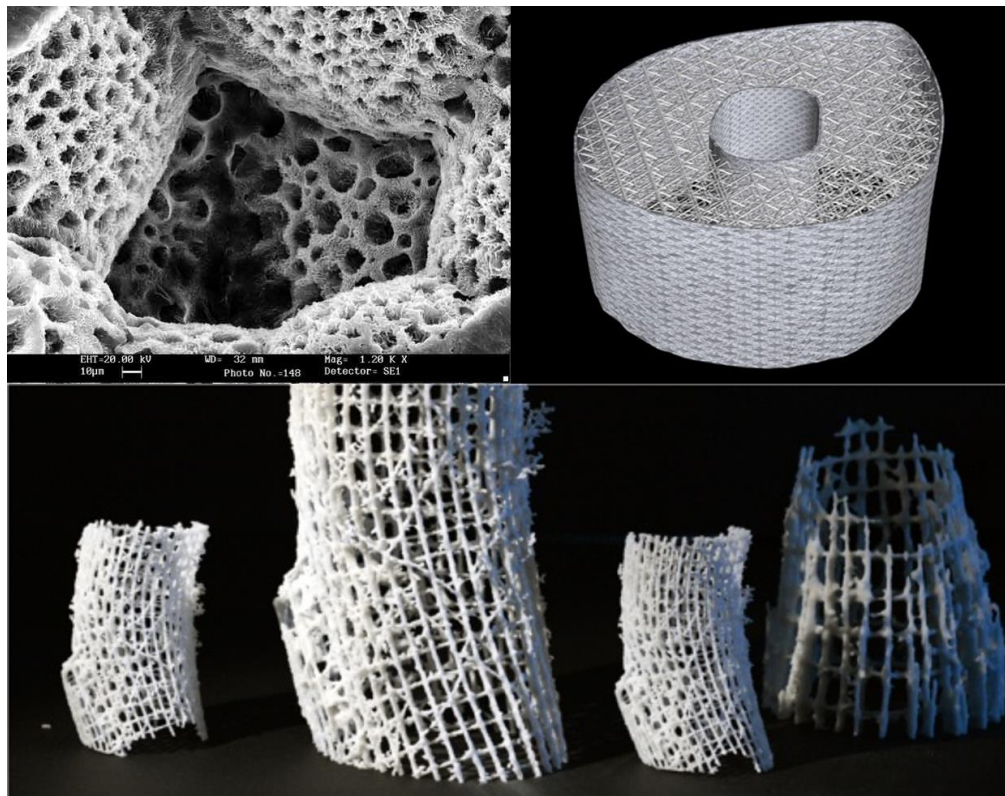


Figura 1 - Exemplo de scaffolds utilizados no tratamento de lesões ósseas. (https://horizon-magazine.eu/article/live-cells-could-be-used-reconstruct-faces_en.html, http://www.virtualscience.com/cad_rp_section/cad_rp_popups/bone_scaff_popup.htm, <http://www.medicaldevice-network.com/features/feature359/feature359-1.html>). Acessado em 15/01/2017.

Um fator preponderante para o sucesso da osteointegração do biomaterial é sua superfície (LONGO et al., 2016). A adição de uma camada de hidroxiapatita, com escala micrométrica ou nanométrica, na superfície do biomaterial reforça propriedades

biomecânicas do mesmo, além de tais modificações físico-químicas na superfície afetarem certos comportamentos celulares como formação de componentes de adesão focal e organização do citoesqueleto com efeitos na maturação dos osteoblastos e subsequente mineralização (ZAMBUZZI et al., 2014).

1.3 Mecanismos de transdução de sinais celulares: Balanço de quinases e fosfatases

O processo no qual uma célula reage a estímulos externos e modifica seu estado e atividade é chamado de transdução de sinais. Por meio de receptores transmembrana, a célula é capaz de captar estímulos físico, como por exemplo estresse mecânico ou a luz, ou químicos, como hormônios e fatores de crescimento. Estes estímulos alteram a conformação espacial destes receptores, e esta alteração é responsável por disparar uma cascata de eventos intracelulares. Estes eventos são regidos por duas classes de enzimas: quinases e fosfatases.

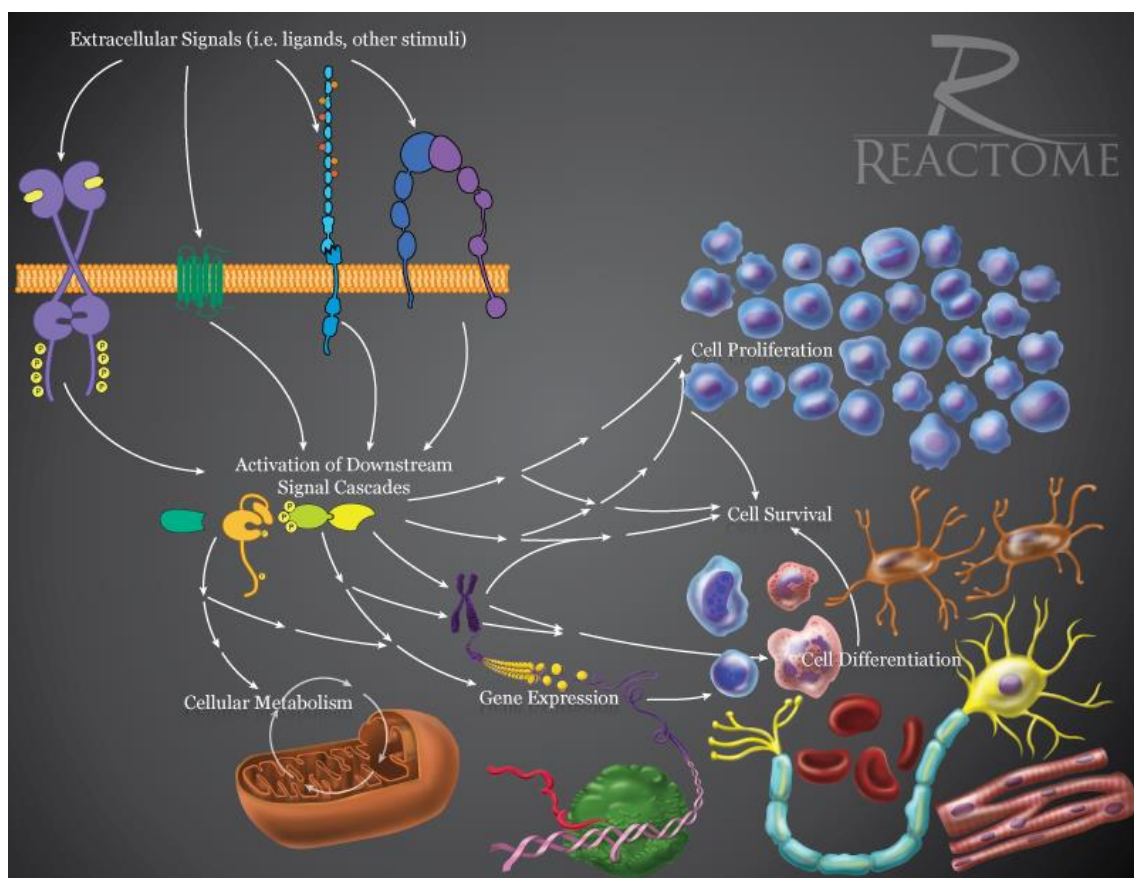


Figura 2 – Mecanismos de transdução de sinais. Estímulos físico-químicos são captados pela célula através de receptores transmembranas. Estes darão início a uma cascata de

eventos intracelulares controlados pelo balanço da fosforilação. Ao final desta cascata uma maquinaria gênica será ativada no núcleo da célula podendo resultar na modificação de eventos como proliferação, diferenciação, adesão, alteração do metabolismo celular, entre outras.

Quinases e fosfatases são classes de enzimas transferases, responsáveis por transferir o grupo fosfato, assim catalisando a fosforilação. Porém seus papéis são antagônicos. Enquanto proteínas quinases transferem um grupo fosfato do ATP, transformando-o em ADP, para uma determinada proteína, as fosfatases retiram o grupo fosfato da mesma. É importante ressaltar que ao ser retirado, pelas fosfatases, o grupo fosfato não retorna ao ADP, formando ATP.

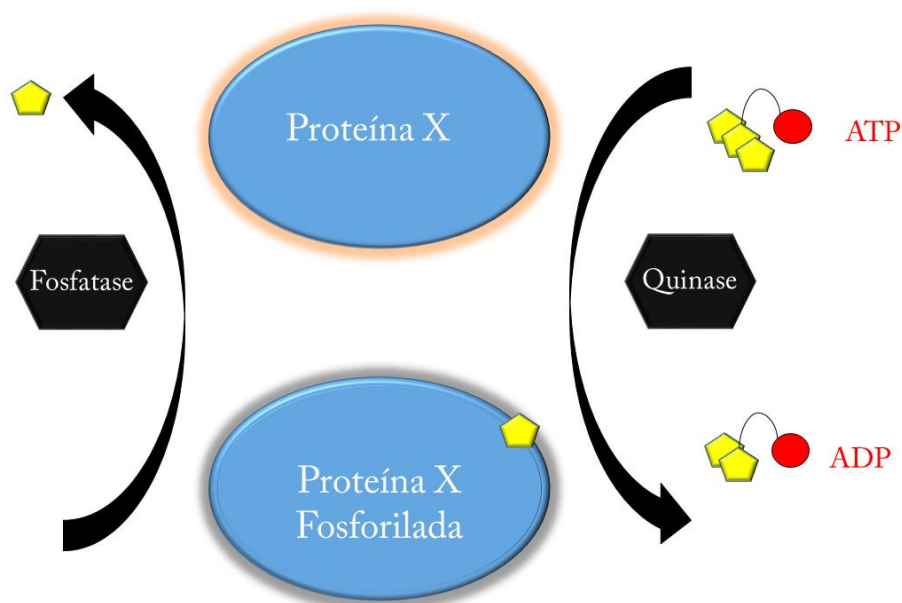


Figura 3 – Balanço da fosforilação proteica. Quinases são enzimas que transferem um grupo fosfato do ATP para uma proteína X, assim fosforilando-a. Já fosfatases são enzimas que atuam no sentido contrário retirando o grupo fosfato da proteína X fosforilada, porém o fosfato não é devolvido ao ADP e sim ao citosol.

O fosfato possui cargas negativa e ao ser transferido a uma proteína ele provocará uma modificação conformacional na estrutura da mesma. É sabido que estrutura e função de proteínas são intimamente ligadas, logo tal mudança conformacional pode ativar ou inibir o sítio ativo da proteína fosforilada.

Em eucariotos a fosforilação pode ocorrer apenas em três resíduos de aminoácidos: Serina (S), Treonina (T) e Tirosina (Y). O sítio de fosforilação reconhecido por uma quinase, sequência de cerca de treze resíduos de aminoácidos na proteína a ser fosforilada, é altamente específico. Isto faz com que quinases, e por

consequência fosfatases, sejam importantíssimas no controle de reações biológicas através da fosforilação. Eventos celulares como proliferação, diferenciação, adesão, controle do ciclo celular, entre outros, são exemplo de reações controladas através de mecanismo de transdução de sinais.

1.4 Adesão de Células Sobre Materiais: Primeiro Passo Integração de Biomateriais e Regeneração Óssea

Ao se utilizar um biomaterial para o tratamento de uma lesão óssea o desejável é que ocorra o evento da osteointegração. Como dito anteriormente, a superfície do biomaterial é um fator decisivo neste processo. Modificações físico-químicas na superfície do biomaterial disparam mecanismo de transdução de sinais que serão responsáveis pelo sucesso da osteointegração. É fundamental que estes induzam a adesão, proliferação e diferenciação celular sobre a superfície do biomaterial.

A adesão celular é um evento altamente estudado hoje em dia, seja nos processos biológicos seja em condições patológicas. Um dos exemplos da importância do estudo da adesão, temos o desenvolvimento e a progressão do câncer. Nestes processos diversas moléculas relacionadas a adesão atuam promovendo a invasibilidade e metástases do tumor. Isto devido ao fato de estarem envolvidas em interações célula-célula e célula-matriz (OKEGAWA et al., 2004).

Recentes estudos têm demonstrado que a adesão celular participa de maneira ativa na regulação da diferenciação, proliferação e morte celular. Logo é altamente desejável que um biomaterial induza uma boa adesão celular. Nos últimos anos nosso grupo vem investindo na busca por biomarcadores da interação célula material em biomateriais, e assim ser possível conhecer as propriedades adesivas de novos biomateriais. Em estudo recente, nosso grupo mostrou que nas primeiras 2 horas pós-plaqueamento o metabolismo dos osteoblastos culmina em diferentes vias de sinalização responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto, com sinais oriundos da ativação de proteínas como MAPKp38 e FAK (ZAMBUZZI et al., 2009) temos mostrado, ainda, que a presença de EROs modula a ação de proteínas tirosina fosfatases (PTPs) durante mecanismos celulares envolvidos com a adesão de osteoblastos (FERNANDES et al., 2014).

Embora algum progresso tenha sido alcançado neste sentido, muito ainda precisa ser descoberto sobre estes mecanismos em outras condições, para que haja uma transferência direcionada de conhecimento ao setor de desenvolvimento de materiais.

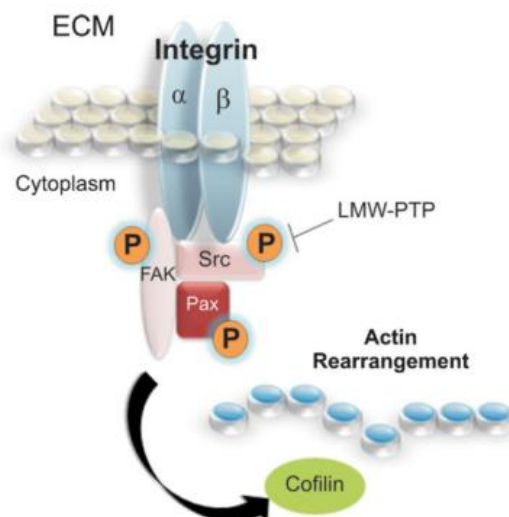


Figura 4 - Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular. Integrinas ligam o meio extracelular com o citoesqueleto da célula. Após captar sinais extracelulares as integrinas mobilizaram moléculas de sinalização para o ponto de adesão focal. O balanço da fosforilação de FAK, Src e paxilina e, ao final desta cascata, a cofilina levará um sinal intracelular que será responsável pelo rearranjo dos filamentos de actina. Estas alterações do citoesqueleto são responsáveis por adaptações celulares a superfícies diferentes. **Fonte:** ZAMBUZZI et al., 2011.

1.5 Quinoma

Em 1958, Francis Crick postulou o dogma central da biologia molecular. Nele Crick postulou como ocorre o fluxo de informações do código genético. Segundo este dogma, o fluxo da informação genética segue o seguinte sentido: DNA → RNA → PROTEÍNAS. Com a descoberta de enzimas capazes de sintetizar DNA através de uma fita de RNA, este dogma sofreu atualizações, porém ele contém uma importante mensagem desde sua postulação: a receita para se fazer proteínas se encontra no genoma.

O conjunto de genes que codificam proteínas quinases é conhecido como quinoma. Em seu trabalho, MANNING et al. identificaram 518 genes que codificam proteínas quinase. Estes genes são classificados em duas famílias de acordo com a presença, ou não, do domínio catalítico quinásico. A primeira família é denominada de proteínas quinases eucariotas (EPK), e contém todos os genes que codifiquem proteínas

quinases que possuam o domínio catalítico quinásico, totalizando 478 genes. Já a segunda família contém 40 genes que não possuem o domínio catalítico quinásico, porém apresentam atividade quinásica por isto são denominadas proteínas quinases atípicas (APK).

Como dito anteriormente, quinases são enzimas que catalisam a fosforilação. Devido a cada um destes genes codificarem um conjunto distinto de substratos, o conhecimento do quinoma em diferentes situações, como por exemplo no processo de interação célula-biomaterial, é de grande valia na busca pelo entendimento destes processos.

Classicamente métodos de estudos de fosforilação são muito trabalhosos, como Espectroscopia de massa e Western Blotting. Neste sentido microarranjo de peptídeos vem se mostrando uma ferramenta poderosa no estudo da fosforilação. Por meio desta técnica é possível a obtenção de informações referentes a quais quinases estão ativas em uma determinada condição celular (Quinoma diferencial), assim podendo relacionarmos a processos celulares que estas participem. Vale a ressalva que, por mais que esta técnica seja similar à de microarranjo de DNA, porém biologicamente é mais interessante o estudo da atividade enzimática do que na expressão gênica (ROSENBERGER et al., 2015).

1.6 Animais em experimentação

Na madrugada do dia 18/10/2012 militantes dos direitos dos animais invadiram o Insituto Royal, em São Roque-SP, e retiraram cerca de 170 cães da raça beagle, além de camundongos e coelhos. Os ativistas alegavam que o laboratório praticava maus-tratos contra os animais com a finalidade de produzir experiências científicas. O caso ganhou repercussão na mídia e reacendeu o debate sobre a experimentação em animais (fonte: <http://g1.globo.com/sao-paulo/sorocaba-jundiai/noticia/2014/10/invasao-ao-predio-do-instituto-royal-em-sao-roque-completa-um-ano.html>. Acessado em 23/09/2016).

No Brasil a lei que regulamenta os testes em animais é a lei de nº 11794, de 8 de outubro de 2008, sancionada pelo então presidente da república Luís Inácio Lula da Silva. Conhecida como lei Arouca, ela regulamenta os procedimentos para uso da experimentação em animais em território nacional, além de criar o Conselho Nacional

de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, com a competência de formular e zelar pelo cumprimento das normas na experimentação, credenciar instituições, monitorar e avaliar a introdução de novas técnicas que possam substituir a utilização de animais em ensino e pesquisa, dentre outras.

Mundialmente há uma tendência na diminuição da experimentação animal, bem como na criação, validação e implementação de métodos alternativos. Com o objetivo de diminuir o número de animais utilizados na pesquisa e minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*, houve o surgimento do programa dos três R's. Batizado assim devido as iniciais de suas principais ações visadas, **R**eplacement, **R**eduction e **R**efinement, em português, substituição, redução e refinamento, o programa foi criado em 1959 em um estudo publicado por William Russell e Rex Burch. (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004)



Figura 5 - O zoologista William M.S. Russell e o microbiologista Rex L. Burch publicaram em 1959, “The Principles of Humane Experimental Technique”. Este trabalho foi um marco para a experimentação em animais por inserir o conceito dos 3 Rs, Repleacement, Reduction e Refinement. Embora diversos avanços na área tenham ocorrido, o cerne da ética e da busca a métodos alternativos se encontra nesta obra.

O primeiro dos três princípios, substituição refere-se a métodos que permitem evitar ou substituir o uso de animais. As substituições podem ocorrer de duas formas: substituições relativas ou absolutas. Substituições absolutas é quando substituímos animais por sistemas inanimados, tais como programas de computador. Já as substituições relativas animais mais sensíveis, como os vertebrados, com animais que a

evidência científica atual indica um potencial significativamente mais baixo para a percepção da dor, tais como alguns invertebrados.

Já a alternativa de redução, refere-se a qualquer estratégia que irá resultar em menor número de animais a ser utilizado para obter dados suficientes para responder à questão de pesquisa, ou para maximizar a informação obtida por animal e, portanto, potencialmente limitando ou evitando o uso subsequente de animais adicionais, sem comprometer o bem-estar animal.

O último dos Rs, o refinamento, refere-se à modificação da criação ou procedimentos experimentais para minimizar a dor e angústia, e para melhorar o bem-estar de um animal usado na ciência a partir do momento que nasce até sua morte. (RUSSELL; BURCH, 1959).

Considerados estes pontos, ainda há o fato que não é possível relacionar dados obtidos com experimentação animal com seres humanos. Em um texto se posicionando sobre experimentação animal, a Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, afirma:

“...A experimentação funciona como uma escada. É preciso passar por vários degraus até se chegar ao ser humano. Quando se começa a desenvolver um novo medicamento contra o câncer, por exemplo, é necessário primeiramente utilizar a droga em culturas de células para verificar se ela é eficiente na eliminação de células cancerosas. O próximo passo é testar a droga em animais de laboratório de pequeno porte, que estejam com câncer, para se avaliar como o este organismos reagem. Posteriormente, a mesma droga será testada em animais de maior porte, que sejam mais próximos evolutivamente do homem, a fim de verificar se os efeitos da droga se mantêm quando lidamos com organismos mais parecidos com o ser humano.” (<http://agencia.fiocruz.br/perguntas-e-respostas>. Acessado em 17/09/2016)

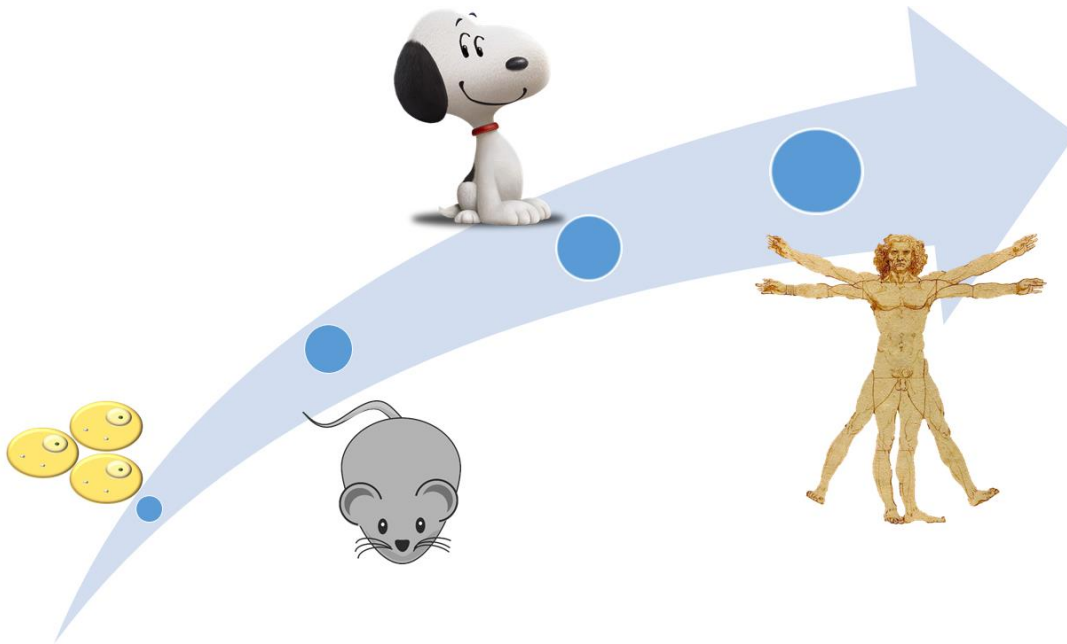


Figura 6 – Esquema das etapas necessárias para um medicamento, vacina ou, como em nosso caso, um biomaterial chegar ao ser humano. Primeiramente são realizados testes em culturas de células. A próxima etapa será experimentos em animais de pequeno porte, como ratos ou camundongos. O cãozinho Snoopy do desenho “Peanuts”, representa o passo seguinte, experimento em animais de maior porte como cães. Só aprovado em todos estes passos será levado ao ser humano.

No caso da pesquisa com biomaterias medico-odontológicas a despeito da importância ainda faltam alternativas à pesquisa com animais. Poucas são as metodologias de análise capazes de analisar e ranquear novos materiais a partir de ensaios *in vitro* ou *in silico*. Consequentemente, universidades e companhias recorrem, quase sempre, a testes convencionais fazendo uso de modelos animais, comprometendo avanços necessários nesta área.

1.7 Biologia sistêmica

Historicamente a ciência vem sendo construída utilizando-se do reducionismo. Partimos de fenômeno completo e buscamos fragmentá-lo para assim tentarmos entender suas partes isoladas, para então, somente após isso, reunir o conhecimento das partes e tentar compreender o todo do fenômeno.

A biologia sistêmica veio na contramão deste paradigma. Baseando-se no entendimento de que o todo é maior que a soma de suas partes, é o ramo que busca a compreensão das interações em redes gênicas, proteicas, metabólicas e assim por diante.

Redes de interação são construídas partindo de informações como interações físicas ou funções correlacionadas (NANDAGOPAL; ELOWITZ, 2011), e estudo destas redes de interações se faz útil pois possibilita ver de forma simples e explicativa fenômenos biológicos e patológicos, possibilitando assim aplicações biotecnológicas.

No caso da interação célula-biomaterial, uma vez conhecidas as quinases que estejam atuando neste processo a biologia sistêmica surge como uma opção na busca por elucidar vias e processos que atuem neste sentido. A partir de um pequeno número de proteínas, que aparentemente não tenham interações, é possível construir redes de interações complexas que revelem novas funções biológicas.

KARR et al. afirma que um dos problemas enfrentados na construção de redes, é a quantidade insuficiente de informações sobre estas interações. Embora nos últimos anos um grande número de dados tenha sido produzido, ainda carece de métodos matemáticos e computacionais para análise.

1.8 Bioinformática

Baseando-se em elementos da ciência da computação, matemática e estatística, a bioinformática é a área do conhecimento interdisciplinar que busca analisar e interpretar dados biológicos. Seu surgimento se deu com a necessidade de armazenar e manejar dados biológicos em rápida expansão, como por exemplo dados de biologia molecular.

A bioinformática foi uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de diversas áreas da biologia. Na genética por exemplo, permitiu sequenciar e anotar, e com isto possibilitando a detecção de mutações nas mesmas. Na biologia estrutural, auxiliou a elucidar estruturas de moléculas como DNA, RNA e principalmente proteínas. Já na biologia sistêmica possibilitou o entendimento de redes biológicas. Isto além de outras áreas, como a evolução.

Um dos grandes trunfos da bioinformática na resolução de problemas biológicos esta nos bancos de dados públicos online. O NIH – NCBI (National Institutes of Health – National Center for Biotechnology Information), por exemplo, abriga em seu site banco de dados de genes, genomas, RNAs, proteínas, artigos, livros, entre outros. Além disso, possui em seu site ferramentas como o BLAST (sigla em

inglês que significa: **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) que possibilita ao usuário comparar sequências de resíduos de aminoácidos de diferentes proteínas ou de nucleotídeos de diferentes DNA.

Os bancos de dados biológicos crescem a cada ano. O UniProt (www.uniprot.org), por exemplo, um banco de dados gratuito sobre forma e funções de proteínas, cresce ano a ano em número de proteínas. UniProt é fruto de um consórcio gerado pelos Instituto Europeu de Bioinformática (EBI), Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) e pelo Recurso de Informação de Proteína (PIR) (BATEMAN et al., 2015). Na figura 7 temos o gráfico do número de proteínas ano a ano no UniProt/Swiss-Prot. Outro banco de dados em constante expansão é o PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). PubMed compreende mais de 26 milhões de citações de literatura biomédica, periódicos de ciências da vida, e os livros on-line. PubMed também fornece acesso à web sites adicionais relevantes e links para outros recursos de biologia molecular NCBI. É desenvolvido e mantido pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), na Biblioteca Nacional EUA de Medicina (NLM), localizado no National Institutes of Health (NIH).

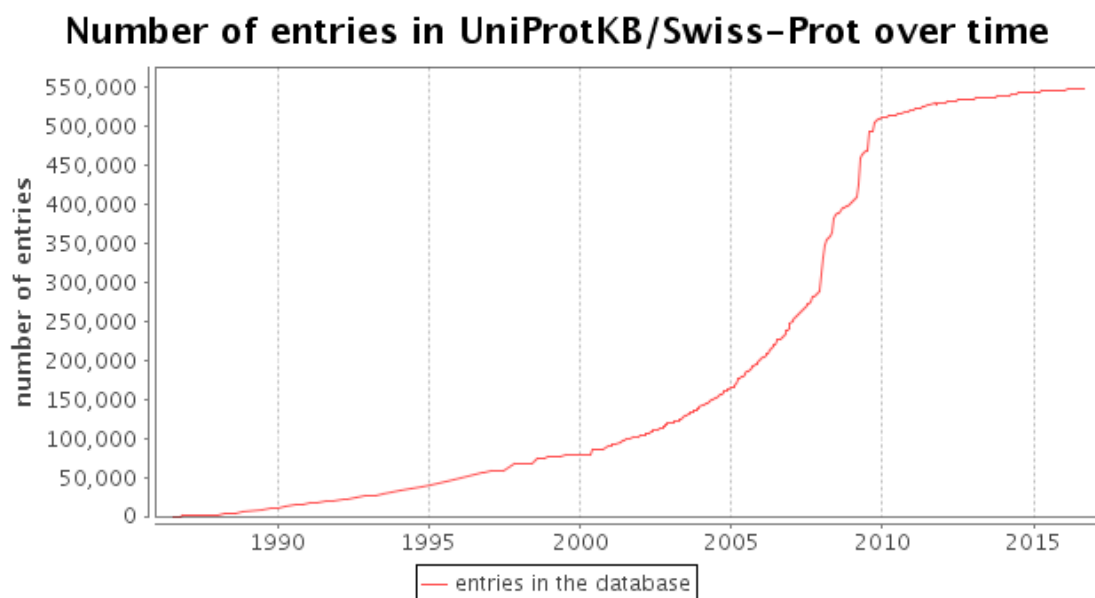


Figura 7 – Criado em 1986 o número de sequências depositadas cresce ano após ano desde então. Atualmente são 551.987 diferentes sequências depositadas. Fonte: <http://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot>

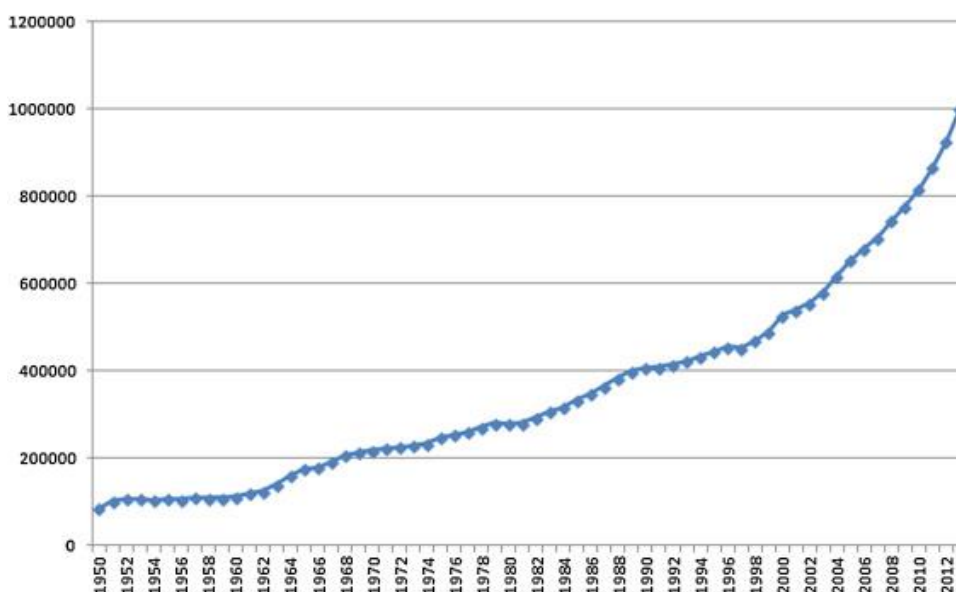


Figura 8 - Gráfico do número de trabalhos adicionados no PubMed por ano de 1950 até 2012. Fonte: VARDAKAS et al.

Com a consolidação dos bancos de dados de bioinformática novas ferramentas de análise foram criadas. STRING (SZKLARCZYK et al., 2015) é um banco de dados de interações proteicas. Alimentados por diversos outros bancos de dados como o próprio UniProt e o Pubmed, STRING é capaz de mostrar as interações entre proteínas isto permite a um pesquisador desenhar um mapa de interações que descreva um processo biológico observado a partir de algumas proteínas identificadas como relevantes em seus próprios experimentos.

Existem uma série de outros bancos de dados e ferramentas. Caso o pesquisador deseje trabalhar com drogas pode se utilizar do ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>) ou STITCH (KUHN et al., 2014). Caso deseje elucidar estruturas de proteínas o Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) é uma arma poderosa. Gene Ontology (ASHBURNER et al., 2000; BLAKE et al., 2015) é uma ferramenta poderosa para estudo de funções moleculares, processos biológicos e componentes relacionados a um conjunto de genes. Enfim, bancos de dados estão constantemente sendo atualizados, expandidos e criados, o que torna cada vez mais útil e prático para o pesquisador o uso de técnicas de bioinformática em seus projetos.

Utilizando estas ferramentas e bancos de dados foi possível a construção de uma ferramenta de análise de biomateriais visando a redução do uso de experimentação animal na área médico-odontológica, contribuindo ao setor produtivo.

6. Conclusão

Desta forma é possível concluir que, OsteoBLAST, aliado a uma abordagem de biologia sistêmica, pode auxiliar no desenvolvimento de biomateriais médico-odontológicos minimizando assim a experimentação animal na área.

8. Bibliografia

- ARREGUI, C. O. et al. Protein tyrosine phosphatase PTP1B in cell adhesion and migration. **Cell adhesion & migration**, v. 7, n. 5, p. 418–423, 2013.
- ARVIDSSON, A. K. et al. Tyr-716 in the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase insert is involved in GRB2 binding and Ras activation. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 10, p. 6715–6726, out. 1994.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nat Genet**, v. 25, n. 1, p. 25–29, maio 2000.
- BATEMAN, A. et al. UniProt: A hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 2015.
- BAXTER, R. M. et al. Full activation of the platelet-derived growth factor beta-receptor kinase involves multiple events. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 27, p. 17050–17055, jul. 1998.
- BLAKE, J. A. et al. Gene ontology consortium: Going forward. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1049–D1056, 2015.
- BRAGIN, P. E. et al. HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 1, p. 52–61, 2016.
- CARTER-SU, C.; SCHWARTZ, J.; ARGENTSINGER, L. S. Growth hormone signaling pathways. **Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, v. 28, p. 11–15, jun. 2016.
- CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.
- CITRI, A. et al. Hsp90 restrains ErbB-2/HER2 signalling by limiting heterodimer formation. **EMBO reports**, v. 5, n. 12, p. 1165–1170, 2004.
- CROOK, M. et al. EGFR Cell Survival Signaling Requires Phosphatidylcholine Biosynthesis. **G3 (Bethesda, Md.)**, set. 2016.

FERNANDES, G. V. O. et al. Osteoblast adhesion dynamics: a possible role for ROS and LMW-PTP. **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 6, p. 1063–9, 2014.

GEMINI-PIPERNI, S. et al. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 561, p. 88–98, nov. 2014.

HELIN, K.; BEGUINOT, L. Internalization and down-regulation of the human epidermal growth factor receptor are regulated by the carboxyl-terminal tyrosines. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 13, p. 8363–8368, maio 1991.

HENKEL, J. et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. **Bone Research**, v. 1, n. 3, p. 216–248, 2013.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 59, n. 2 SUPPL., p. 21–26, 2004.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.

KARR, J. R. et al. A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 389–401, 2012.

KIM, Y. et al. Differential Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors on Normal and Oncogenic EGFR Signaling and Downstream Effectors. **Molecular cancer research : MCR**, v. 13, n. 4, p. 765–774, abr. 2015.

KUHN, M. et al. STITCH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 401–407, 2014.

LI, Z. et al. Neuregulin-1 only induces trans-phosphorylation between ErbB receptor heterodimer partners. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 3, p. 466–471, 2007.

LONGO, G. et al. Improving Osteoblast Response In Vitro by a Nanostructured Thin Film with Titanium Carbide and Titanium Oxides Clustered around Graphitic Carbon. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0152566, 2016.

MANISCALCO, P.; CAFORIO, M. The importance of early rehabilitation in proximal humeral fracture: A clinical trial of efficacy and safety of a new endomedullary nail.

Journal of back and musculoskeletal rehabilitation, jul. 2016.

MANNING, G. et al. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends in biochemical sciences**, v. 27, n. 10, p. 514–520, out. 2002.

MILANI, R. **Desenvolvimento de um pipeline para análise em larga escala de um chip de proteínas quinases**. [s.l.] Universidade estadual de Campinas, 2010.

NANDAGOPAL, N.; ELOWITZ, M. B. Synthetic biology: integrated gene circuits. **Science (New York, N.Y.)**, v. 333, n. 6047, p. 1244–1248, set. 2011.

NTANASIS-STATHOPOULOS, I. et al. The Emerging Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Ovarian Cancer Treatment: A Systematic Review. **Cancer investigation**, v. 34, n. 7, p. 313–339, ago. 2016.

OKEGAWA, T. et al. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta biochimica Polonica**, v. 51, n. 2, p. 445–457, 2004.

OOFT, M. L. et al. Prognostic significance of the EGFR pathway in nasopharyngeal carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Biomarkers in medicine**, v. 9, n. 10, p. 997–1010, 2015.

PAUKKU, K. et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced activation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 is mediated by PDGF beta-receptor and is not dependent on c-src, fyn, jak1 or jak2 kinases. **The Biochemical journal**, v. 345 Pt 3, p. 759–766, fev. 2000.

ROSENBERGER, A. F. N. et al. Protein Kinase Activity Decreases with Higher Braak Stages of Alzheimer's Disease Pathology. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, out. 2015.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. [s.l.: s.n.].

SHANNON, P. et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SOHRABI, K. et al. How successful are small-diameter implants ? A literature review. 2012.

SUN, Z. et al. Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. **Nat Cell Biol**, v. 18, n. 9, p. 941–953, set. 2016.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research** , v. 43, n. D1, p. D447–D452, 28 jan. 2015.

VARDAKAS, K. Z. et al. An analysis of factors contributing to PubMed’s growth. **Journal of Informetrics**, v. 9, n. 3, p. 592–617, 2015.

WARDEGA, P.; HELDIN, C. H.; LENNARTSSON, J. Mutation of tyrosine residue 857 in the PDGF α -receptor affects cell proliferation but not migration. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 9, p. 1363–1368, 2010.

WEE, H. et al. Finite Element-Derived Surrogate Models of Locked Plate Fracture Fixation Biomechanics. **Annals of Biomedical Engineering**, 2016.

ZAMBUZZI, W. F. et al. On the road to understanding of the osteoblast adhesion: Cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 108, n. 1, p. 134–144, 2009.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Intracellular Signal Transduction as a Factor in the Development of “ Smart ” Biomaterials for Bone Tissue Engineering. v. 108, n. 6, p. 1246–1250, 2011a.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Intracellular signal transduction as a factor in the development of “smart” biomaterials for bone tissue engineering. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1246–1250, jun. 2011b.

ZAMBUZZI, W. F. et al. Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e95662, 2014.

ZAMBUZZI, W. F.; MILANI, R.; TETI, A. Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: Lessons from mice. **Biochimie**, v. 92, n. 4, p. 327–332, 2010.

ZHANG, H. et al. KRT6B, a key mediator of notch signaling in honokiol-induced human hepatoma cell apoptosis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 16880–16889, 2015.

