

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO GLOBAL DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO
ENVOLVIDO COM RESPOSTAS ADAPTATIVAS À
BIOMATERIAIS

GERSON SANTOS DE ALMEIDA

WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional (BCEF)

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2020**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDO GLOBAL DO PERFIL TRANSCRIPTÔMICO
ENVOLVIDO COM RESPOSTAS ADAPTATIVAS À
BIOMATERIAIS

GERSON SANTOS DE ALMEIDA

WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do
título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração
Biologia Celular Estrutural e Funcional (BCEF)

Willian Fernando Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Almeida, Gerson Santos de.

Estudo global do perfil transcriptômico envolvido com respostas adaptativas à biomateriais / Gerson Santos de Almeida. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 31302017

1. Bioengenharia. 2. Bioinformática. 3. Materiais biomédicos. 4. Regeneração.

Palavras-chave: bioengenharia; bioinformática; biomateriais; osteosubstitutos; regeneração tecidual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por tudo que fazem por mim, por todos os sacrifícios, por todas as lutas e por todo o apoio.

Agradeço a minha noiva Ana Carolina por estar sempre ao meu lado, por ser meu porto seguro, por todo o amor, confiança e respeito, obrigado por ser meu sol.

Agradeço a minha segunda família por sempre me receberem e pelo enorme carinho que doam, agradeço aos meus sogros e padrinhos Sandro e Marli e a minha cunhada e amiga Gabriela.

Agradeço ao meu orientador Professor Willian por ter me aceito como seu aluno e por não medir esforços para ajudar não só aos que conhece mas a todos aos que recorrem a ele. Agradeço seus conselhos, por ser um exemplo de profissional e por sempre tentar extrair o melhor de nós. Obrigado pela oportunidade e por sempre acreditar em nosso potencial, tornando-se um amigo além de orientador.

Agradeço aos meus amigos e colegas de turma e que sem eles este trabalho não seria possível, obrigado Carlos e Marcel por esses anos de parceria.

Agradeço aos meus amigos de laboratório por toda a ajuda, troca de experiências e por terem me acolhido, em especial a Geórgia, Thais, Anderson e Célio.

Agradeço aos meus companheiros de república, pelas conversas, companheirismo e por tornarem-se minha família em Botucatu, em especial agradeço ao Victor por sua amizade.

Agradeço ao Professor Vladimir por sempre estar disposto a ajudar a todos, por sua empatia e por sua vontade de ensinar, o vejo como um exemplo a ser seguido.

Agradeço a Professora Valéria Sandrim pela pessoa e profissional que é, e por ter me indicado o Professor Willian, obrigado por tê-lo colocado em meu caminho.

Agradeço ao Professor Gustavo por toda a ajuda na síntese de materiais e por ceder seu laboratório sempre que precisamos.

Agradeço a Professora Margarida pelo auxílio na caracterização dos materiais e por todas as dicas que nos ajudaram muito neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Wilson Araújo por ter acreditado na ideia e ter aceitado a parceria dos laboratórios.

Agradeço ao Pablo e a Dra. Roseane por se disporem em ajudar-nos com as células.

Agradeço aos funcionários do departamento de Química e Bioquímica por toda a ajuda.

Agradeço a equipe da Pós-graduação por sua disposição em sanar as dúvidas e colaborar no que for possível.

Agradeço aos meus amigos de longa data, por mais que nossos encontros sejam raros, carrego vocês comigo, obrigado por existirem, Sabrina, Gabriel, Itamar e Rodrigo.

Agradeço a Professora Carla Riccardi pelas correções e dicas para o trabalho.

Agradeço a Professora Dayse pela ajuda nas análises de DRX, e ao Departamento de Física da Unesp Campus de Bauru por disponibilizar o Rigaku DMax - Equipamento Multiusuário Fapesp.

Agradeço o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

“DON’T STOP ME NOW”

(*QUEEN* - 1978)

Resumo

Devido ao aumento de análises globais à processos biológicos, trazendo avanços na compreensão de aplicações no campo de biomateriais, faz-se necessário o uso de novas ferramentas *in silico* que sejam capazes de explorar esses dados, como é o caso de dados globais de transcriptomas gerados a partir de células osteogênicas interagindo com diferentes biomateriais. Para melhor análise, propomos neste estudo a aplicação de ferramentas de bioinformática, como os pacotes limma e GSVA na linguagem de programação R, para melhor realizar a expressão diferencial e análise de enriquecimento funcional em dados depositados em bancos públicos e registrado sob o acesso E-MTAB-7219. A partir da análise de variação de conjunto de genes (GSVA), foram obtidas expressões diferenciais entre os transcriptomas dos materiais hidroxiapatita (sinterizada à 1100, 1150 e 1250°C) e β -tricálcio fosfato, sinterizado à 1050 e 1100°C, além do poliestireno, considerado como controle. Gerou-se *Heatmaps* para cada grupo de assinaturas moleculares, sendo possível, a partir destes interpretar os materiais que apresentam uma melhor biocompatibilidade mediante sua resposta adaptativa aos materiais, identificando as principais vias enriquecidas para cada condição; dentre as quais destacam-se as vias envolvidas com a viabilidade e padrões osteogênicos dessas células testadas, compostas por genes importantes em eventos de comportamento celulares frente a eventos de sobrevivência e diferenciação osteoblástica. A partir do diagrama de Venn foram observados 4 genes da intersecção com os 5 grupos de materiais e os específicos para cada um deles. Para confirmar os dados, cultivo celular foi realizado a partir do enriquecimento do meio de cultura com os biomateriais, avaliando assim a toxicidade, viabilidade e genes específicos envolvidos o fenótipo osteoblástico, como àqueles relatados com proliferação celular, osteoclastogênese e MAPKs (envolvidas com fenótipo proliferativo e de sobrevivência). Considerando nossos resultados, foi mostrado que protocolos de síntese de biomateriais promovem assinaturas específicas de expressão gênica. Destacamos ainda a importância destes ensaios *in vitro* e *in silício* e que estes devem ser considerados no planejamento para ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: biomaterial; bioinformática; bioengenharia; regeneração tecidual; bioativas.

Abstract

Due to the increase of global analysis to biological processes, bringing advances in the understanding of applications in the field of biomaterials, it is necessary to use new *in silico* tools that are able to exploit this data, as is the case of global transcriptome data generated from cells interacting with different biomaterials, obtained from different sintering temperatures. To better analyze this data, we propose in this study the application of bioinformatics tools, such as the limma and GSVA packages in the R programming language, to better perform differential expression and functional enrichment analysis on data deposited in public banks and registered under access. E-MTAB-7219. From the analysis of gene set variation (GSVA), differential expressions were obtained between the transcripts of hydroxyapatite (sintered at 1100, 1150 and 1250°C) and sintered β -tricalcium phosphate at 1050 and 1100°C, besides the control material (polystyrene), used here as a control. Heatmaps were generated for each group of molecular signatures. From these, it was possible to interpret the materials that present the best biocompatibility through their adaptive response to the materials, identifying the main enriched pathways for each condition; Among them, we highlight the pathways involved with the viability and osteogenic patterns of these cells tested, composed by genes important in cellular behavioral events against survival events and osteoblastic differentiation. From the Venn diagram were observed 4 genes of intersection with the 5 groups of materials and specific to each one of them. To confirm the data, cell culture was performed from the culture medium enrichment with biomaterials, thus evaluating the toxicity, viability and specific genes involved in the osteoblastic phenotype, such as those reported with cell proliferation, osteoclastogenesis and MAPKs (involved with proliferative phenotype and survival). Considering our results, it has been shown that biomaterial synthesis protocols promote specific gene expression signatures. We also highlight these as a necessary tool to be considered as a prerequisite for *in vivo* assays.

Keywords: biomaterial; bioinformatics; bioengineering; tissue regeneration; bioactive.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O Tecido Ósseo.....	18
1.2. Biomateriais	19
1.2.1 Hidroxiapatita	23
1.2.2 Fosfato tricálcio	24
1.3 Interação células e biomaterial.....	25
1.4 Bioinformática	27
1.4.1 GSE.....	28
1.4.2 GSVA	29
1.4.3 MSigDB.....	30
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4 RESULTADOS	42
4.1 Bioinformática	42
4.2 Caracterização dos Materiais.....	54
4.2.1 TGA.....	54
4.2.2 FTIR.....	54
4.2.3 DRX	56
4.3 Cultivo Celular	58
4.4.RT-qPCR.....	59
5 DISCUSSÃO	65
6 CONSTATAÇÕES	70
7 CONCLUSÃO.....	71
8 BIBLIOGRAFIA	72
9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de aplicações de Biomateriais. a. Madeira utilizada pelos egípcios, datado entre 1065 e 740 aC; b. Implante de quadril SYNERGY. Figura disponível em HUEBSCH; MOONEY, 2009.	20
Figura 2: Exemplo de aplicação de implantes a base de fosfato de cálcio, imagem disponível em Habraken 2016.	21
Figura 3: Gráfico representando as aplicações mais utilizadas de biomateriais no mercado mundial. Gráfico disponível em https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biomaterials-market-industry	22
Figura 4: Número de Artigos abordando HA entre 1969 a 2019 na plataforma SCOPUS (Fonte: Próprio Autor (Janeiro, 2020)).....	23
Figura 5: Principais Aplicações Hidroxiapatita em busca na plataforma SCOPUS, destacando as diferentes áreas, como ciências dos materiais, engenharias, medicina, química e bioquímica, odontologia e farmacologia. Fonte: Próprio Autor.	24
Figura 6: Publicações com o termo “bioinformática” no período de 1991 a 2019. Fonte: Próprio Autor (Janeiro 2020).	28
Figura 7: Desenho experimental para obtenção dos dados biológicos. Os materiais foram calcinados no forno tipo Mufla, cada amostra em uma determinada temperatura. Após os materiais foram autoclavados para garantir a ausência de contaminantes biológicos. Foram adicionados aproximadamente uma grama de cada material em 10 ml de meio isento de soro, após 24 horas os meios foram filtrados e adicionado o soro fetal bovino, as células foram cultivadas nas placas para os testes durante 48 horas e depois extraídas as amostras para MTT, Cristal Violeta, Vermelho Neutro e PCR, o meio foi coletado para a Zimografia.	34
Figura 8: Genes diferencialmente expressos para o TCP, 2984 para o material sinterizado a 1050°C e 370 para o de 1100°C, e 135 comuns aos dois	42
Figura 9: Diagrama de Venn ilustrando os genes diferencialmente expressos nos 3 grupos, 5 em comum, 216 exclusivos da HA 1100, 36 da 1150 e 49 da 1250	43
Figura 10: Diagrama de Venn dos genes diferencialmente expressos, ilustrando os genes compartilhados entre os materiais e os diferencialmente expressos.	43
Figura 11: Heatmap para os marcadores: adesão, diferenciação, inflamação e viabilidade respectivamente, a proximidade ao Ps indica uma maior similaridade nas expressões dos conjuntos de genes, quanto mais próximo mais similar.	45

Figura 12: Assinaturas C1: conjuntos de genes posicionais, indicando uma maior similaridade entre o HA-1250 e o Ps, o HA-1150 apresentou a menor similaridade, no grupo TCP o tratado a 1100 apresentou maior similaridade que o tratado a 1050.....	46
Figura 13: Assinaturas C2: conjuntos de genes curados, HA-1150 apresentou a maior diferença que os outros dois tratamentos térmicos, HA-1250 apresentou a maior similaridade. No grupo TCP o tratado a 1100 foi o mais similar entre os dois tratamentos.	47
Figura 14: Assinaturas C3: Conjuntos de genes de Motif: representando alvos potenciais de regulação por fatores de transcrição ou microRNAs, no grupo HA, o tratamento menos similar foi o 1150, seguido do 1100, o HA-1250 foi o que mais se assemelhou. No grupo TCP o tratado a 1100 apresentou mais similaridade ao Ps.....	48
Figura 15: Assinaturas C4: conjuntos de genes computacionais. No grupo HA, o tratamento a 1150 foi o menos similar ao Ps, o tratamento a 1250 foi o mais similar ao padrão, pelo posicionamento é possível observar uma maior similaridade entre a HA-1250 e HA-1100. No grupo TCP o tratado a 1050 foi mais similar, é visualizado a diferença entre os dois tratamentos.	49
Figura 16: Assinaturas Coleção C5: Conjuntos de genes Gene Ontology, nesta assinatura no grupo HA, o tratamento a 1250 foi o mais similar, há uma maior similaridade entre os tratamentos 1100 e 1150 do que com o padrão. No grupo TCP o tratamento 1100 foi o mais similar, pelo posicionamento destes é possível observar a diferença entre os materiais.	50
Figura 17: C6: Assinaturas Oncogênicas: conjuntos de genes que representam assinaturas de vias celulares frequentemente desreguladas no câncer, no grupo HA, os materiais apresentam diferenças entre eles, o mais similar ao Ps é o tratamento a 1250. No grupo TCP é possível visualizar que eles são similares, porém o TCP 1100 apresenta uma maior similaridade com o Ps.	51
Figura 18: C7: assinaturas imunológicas, a posição da HA-1250 próxima ao Ps indica a maior similaridade com o controle, seguido da HA-1100. No tratamento TCP, o mais similar foi o TCP 1100 ao controle, a partir da expressão dos conjuntos de genes é possível visualizar a diferença entre os materiais, visto que um tem expressões positivas e o outro negativas.	52
Figura 19: Coleção H: conjuntos de genes de marcação (Hallmark), no grupo HA é indicada a diferença entre os materiais e a maior similaridade entre o HA-1250 e o Ps. No grupo TCP é apresentado uma maior similaridade entre os tratamentos e do tratamento a 1100 com o controle.	53
Figura 20: Gráfico do TGA para hidroxiapatita, em verde representando a variação térmica diferencial e em vermelho a Termogravimetria, em 1 temos a evaporação da água adsorvida, 2	

condensação dos grupos –OH estruturais da HA e em 3 decomposição do material para posterior formação de outras fases de fosfatos de cálcio.	54
Figura 21: Espectro do FTIR da HA, a banda referente a H ₂ O adsorvida, b banda referente a água (modo estiramento) e c bandas de fosfatos nas regiões de 1100 – 1000 cm ⁻¹ e 600 – 550 cm ⁻¹ ...	55
Figura 22: Espectro do FTIR do A. TCP 1050 e B. TCP 1100, a presença de água adsorvida, b presença de CO ₂ , e c bandas de fosfatos foram observados nas regiões de 1100 – 1000 cm ⁻¹ e 600 – 550 cm ⁻¹	56
Figura 23: Difratograma das amostras de HA calcinadas a 1100, 1150 e 1250°C, sendo possível observar os picos característicos, permitindo relacionar os materiais com a literatura, os picos representativos da fase hidroxiapatita (HA) estequiometria na composição (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ como plano principal de difração.	57
Figura 24: Difratograma do TCP, sendo possível observar os picos representativos da fase fosfato tricálcico-β na composição (Ca ₃ (PO ₄) ₂ com plano principal de difração.	57
Figura 25: Efeito da viabilidade celular comparada por duas metodologias. Após 24 horas de condicionamento o meio foi utilizado para tratar MG63 por mais 24 horas. Após esse período as células foram avaliadas quanto a viabilidade por incorporação do sal de MTT (a, b) e por marcação de vermelho neutro (c, d). Os dados foram normalizados pela porcentagem do controle com n = 6. **p<0.0017: Diferença estatística quando comparado ao controle.....	58
Figura 26: Perfil de adesão celular de MG63 submetidas ao contato com TCP ou Ha. Após 24 horas de condicionamento do meio de cultivo, o mesmo foi coletado e utilizado para ressuspender as células MG63 que foram avaliadas quanto ao perfil de adesão por incorporação de Cristal Violeta. As células receberam o meio condicionado por TCP (a) e por Ha (b) nas diferentes temperaturas de síntese. Os experimentos representam n = 6.	59
Figura 27: Efeito de biomateriais na expressão de genes relacionados com proliferação e ciclo celular. Após 24 horas de tratamento as células foram coletadas e o RNA extraído para estudo da expressão gênica por qPCR dos genes CDK2 (a, d), CDK4 (b, e) e CDK6 (c, f) normalizados pelo GAPDH em triplicata.	60
Figura 28: Meio enriquecido com biomateriais parece modular o perfil de expressão de genes envolvidos com ciclo celular. Expressão gênica de CDC25 (a, d), p15 (b, e) e p21 (c, f) foi avaliada por qPCR nas células MG63 tratadas indiretamente com diferentes biomateriais e um efeito maior no gene de um regulador da fase G1 do ciclo celular, o p15, foi observado nos grupos TCP-1100 e HA-1250 com um aumento em relação ao controle mostrando essa modulação.	61
Figura 29: Modulação da expressão gênica de constituintes relacionados com o fenótipo osteoblástico. Para avaliar o perfil do fenótipo da célula osteoblástica em resposta ao tratamento com os diferentes biomateriais, foi investigada a expressão de genes envolvidos nesse cenário	

como RUNX2 (a,d) que não demonstrou diferenças entre os grupos, já o gene Osterix também foi investigado e revelou uma redução em ambos grupos TCP (b) e um aumento nos grupos HA-1100 e HA-1250 (e).....62

Figura 30: Análise de expressão gênica de genes envolvidos com Osteoclastogênese e reabsorção óssea. Genes relacionados com a diferenciação de Osteoclastos, OPG e RankL (a-d), foram avaliados por PCR em tempo real comparados pelo grupo controle e normalizados pelo gene de referência GAPDH (*housekeeping*). As diferenças significativas foram consideradas quando * $p < 0.05$, ** $p < 0.0017$, *** $p < 0.0002$ quando comparado ao controle. ** $p < 0.0017$ quando comparado HA-1100.63

Figura 31: Genes MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) foram avaliados por qPCR em resposta aos biomateriais. Perfis de transcritos de MAPKs revelaram apenas uma redução no grupo TCP-1050 na expressão do gene JNK (a), nos demais grupos e nos outros genes ERK (b,e) e P38 (c,f) não se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os dados foram normalizados pelo GAPDH considerado como gene de referência.64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Materiais utilizados por Groen et al.	36
Tabela 2: Sequências dos primers de expressão e condições do ciclo qPCR.....	40
Tabela 3: Marcadores para funções biológicas	44

LISTA DE ABREVIACES

18S	RNA ribossomal
ANOVA	Análise de Variância
BCP	Bifosfato de Cálcio
CAGR	Taxa anual de crescimento composta
CDK2	Quinase 2 dependente de ciclina
CDK4	Quinase 4 dependente de ciclina
CDK6	Quinase 6 dependente de ciclina
cDNA	cido Desoxirribonucleico Complementar
DMEM	Duldecco's Modified Eagle Medium
DRX	Difraco de Raios X
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	Ontologia Gênica
GSE	Enriquecimento de Conjunto de Genes
GSEA	Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes
GSVA	Análise de Variao de Conjunto de Genes
HA	Hidroxiapatita
JNK	c-Jun quinases terminais N
MEM	Meio Mínimo Essencial (Minimum Essential Medium)
mRNA	cido Ribonucleico Mensageiro
MSigDB	Molecular Signatures Database
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanmetro
OCT	Osteocalcina
P38	Proteína quinase ativada por mitgeno p38
PBS	Tampo fosfato-salino
PCR	Reao de cadeia polimerase
Ps	Poliestireno
RNA	cido Ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de cido Ribonucleico
RUNX2	Fator de Transcrio relacionado ao RUNT2

SFB	Soro Fetal Bovino
TGA	Análise por Termogravimetria
TCP	Fosfato tricálcio ou Tricalcium phosphate
TFT	Alvos de Fatores de Transcrição
VN	Vermelho Neutro

1. INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento da população, doenças relacionadas a idade tornam-se mais incidentes, aumentando os gastos em saúde, como cirurgias, tratamentos, afastamentos e pensões, em destaque às lesões ósseas, causadas por doenças ou acidentes. Como tecido importante no corpo humano, o osso desempenha um papel vital não apenas protegendo os órgãos, mas também fornecendo suporte mecânico, hematopoese, armazenamento mineral e função endócrina. Embora o osso tenha uma certa capacidade de regeneração e auto reparo, grandes defeitos ósseos segmentares causados por trauma grave, ressecção de tumor, câncer ou doenças congênitas só podem ser reparados por enxerto ósseo, com auxílio de um biomaterial. Neste sentido, tem crescido a demanda por biomateriais osteossubstitutos e, desta forma, entender os processos moleculares da interação do biomaterial com as células é de grande importância para o progresso e desenvolvimento na área.

1.1. O Tecido Ósseo

O tecido ósseo, fornece um suporte mecânico ao corpo, juntamente com o tecido muscular e tendões são os responsáveis por gerar e transferir forças que estão envolvidas na locomoção; fornecem proteção mecânica e sustentação para órgãos vitais, atua como reservatório de vários minerais, principalmente cálcio e fosfato, e também armazena fatores de crescimento, ácidos graxos, além de metais pesados e outros elementos tóxicos. Além da função de absorção e liberação de sais, responsáveis por eventos de tamponamento do sangue e prevenção de grandes variações de pH (HAIDER et al., 2017; SADOWSKA et al., 2019; SUNTERS et al., 2010).

Muito se tem discutido nos dias atuais quanto sua função endócrina, onde o osso é colocado como um tecido capaz de modular atividades celulares distintas em outros tecidos, extrapolando a função latente do osso. O hormônio osteocalcina que é produzido, liberado e carboxilado pelas células ósseas está sendo relacionado com a capacidade de resposta ao aumento da glicemia e, mais atualmente, ao estresse, principalmente em situações de perigo (BERGER et al., 2019).

Além de seus componentes minerais e proteicos, o osso também é histologicamente composto por células, macromoléculas e vasos sanguíneos, dos quais angiogênese e osteogênese estão acoplados. Três tipos de células particulares estão envolvidas na manutenção de uma estrutura óssea saudável, a saber: osteócitos, osteoclastos e osteoblastos. Por sua vez, os osteócitos localizam-se em cavidades embebidas na matriz óssea mineralizada; os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis por reabsorver a matriz mineralizada e são fundamentais no processo de remodelação óssea, juntamente com os osteoblastos, que são capazes de produzir componentes da matriz óssea e também promover sua mineralização (ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010b).

Por meio da ação cooperativa de osteoblastos e osteoclastos, o osso é constantemente remodelado em resposta a exigências fisiológicas. Devido sua importância, as maneiras de curar o tecido ósseo comprometido em tempo hábil podem ser consideradas como uma das tarefas mais importantes para as quais a medicina pode contribuir, sobretudo intervindo com biomateriais aplicados a processos biomédicos (BEZERRA et al., 2017). Por sua complexidade, diariamente tem crescido estudos transversais e interdisciplinares, onde são necessárias abordagens biológicas e métodos físico-químicos para se tentar compreender as estruturas e as propriedades dos ossos (GEMINI-PIPERNI et al., 2014a).

1.2. Biomateriais

De acordo com Williams “Um biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária”(WILLIAMS, 2009).

Biomateriais são materiais projetados com a função de substituir partes do corpo e, assim, permitindo a recuperação tecidual e funcional do tecido, por vezes afetados por doenças ou acidentes. Principais diferenciais dos aspectos funcionais dos materiais biomédicos tratam aspectos de biocompatibilidade e biofuncionalidade, características necessárias para que esses exerçam essas funções diversas. Por definição, biocompatibilidade refere-se a aceitação do biomaterial pelo corpo, e a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada, restabelecendo o tecido com suas características anatômico-funcionais (HAIDER et al., 2017; SHIN et al., 2016).

A utilização de biomateriais pelos homens data de tempos antigos, mesmo sem o conhecimento da função biológica, médica e propriedades de materiais, onde civilizações antigas usavam diversos materiais como próteses de membros, dentes e suturas metálicas, fazendo uso de ferro, madeira, chumbo, ouro, prata e até conchas marítimas, como ilustrado na **Figura 1** (HUEBSCH; MOONEY, 2009; JANDT, 2007). Porém, muitas destas aplicações geravam rejeições, por conceitos importantes relacionados à infecção, compatibilidade e reação biológica adversa aos materiais implantados (CORREA et al., 2018; GROEN et al., 2015).

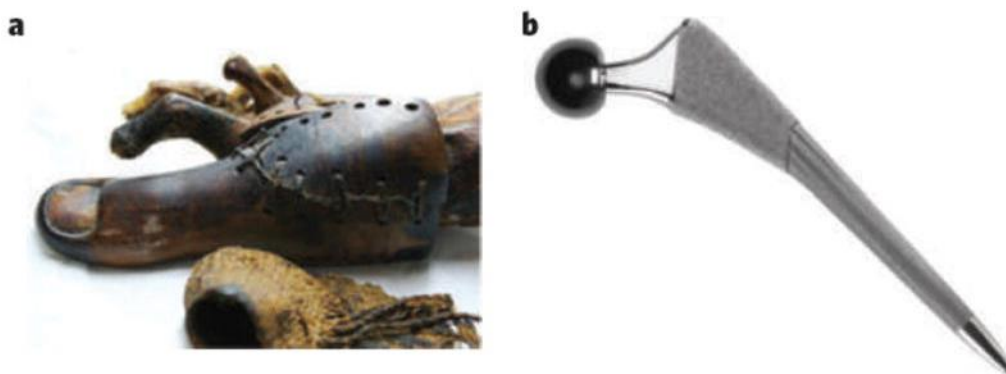


Figura 1: Exemplos de aplicações de Biomateriais. **a.** Madeira utilizada pelos egípcios, datado entre 1065 e 740 aC; **b.** Implante de quadril SYNERGY. Figura disponível em HUEBSCH; MOONEY, 2009.

Com os avanços na área de desenvolvimento de biomateriais, atrelado ao progresso integrado na área biológica, pesquisadores têm incorporados novas tecnologias em seus estudos, principalmente com os avanços nos conceitos da biologia molecular, avanços da genômica e proteômica, abrindo novos horizontes para o *design* de biomateriais, trabalhando a resposta do hospedeiro aos materiais implantados, ajudando a entender seu desempenho e também como aprimorar a resposta biológica (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; RATNER; BRYANT, 2004). Com esse desenvolvimento tecnológico, os biomateriais vêm sendo aplicados em diversas áreas como a cardiovascular, cirurgia plástica, cicatrização de feridas, engenharia de tecidos, neurológica, odontológica, oftalmologia, ortopédica e também em outros tipos de aplicações que incluem sistemas de administração de medicamentos, aplicações gastrointestinais, cirurgia bariátrica e aplicações urinárias (GAO et al., 2017; MANO, 2014).

Atualmente o mercado de biomateriais é dividido com base no tipo de material, sendo classificados quanto a sua composição química, por exemplo materiais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. São exemplos do tipo metálico o aço inoxidável, titânio e ligas de titânio, ligas de cromo-cobalto, prata, ouro e magnésio. Exemplos de cerâmica como o óxido de alumínio, zircônia, fosfato de cálcio, sulfato de cálcio, carbono e vidro. Exemplificando os polímeros como o polimetilmetacrilato, polietileno, poliéster, cloreto de polivinilo, borracha de silicone, nylon, polietereetercetona, ácido poli-láctico, poli-ácido glicólico & PLGA e outros biomateriais poliméricos. Os biomateriais naturais são segmentados em ácido hialurônico, colágeno, gelatina, fibrina, celulose, quitina, alginato e seda (GAO et al., 2017; HENCH, 1998; JANDT, 2007).

Os biomateriais naturalmente derivados são normalmente aplicados para restaurar ou substituir a função e a estrutura dos órgãos ou tecidos danificados (**Figura 2**) (HABRAKEN et al., 2016). Oferecendo suporte adequado para migração celular, favorecendo eventos celulares como adesão e proliferação, levando a diferenciação adequada. As vantagens de usar biomateriais

naturais para implantes é a capacidade de buscar semelhanças com os tecidos do corpo. Estes materiais não apresentam problemas de toxicidade, o que é frequentemente associado a biomateriais sintéticos (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; HU et al., 2001), características por vezes encontradas no materiais autógenos.

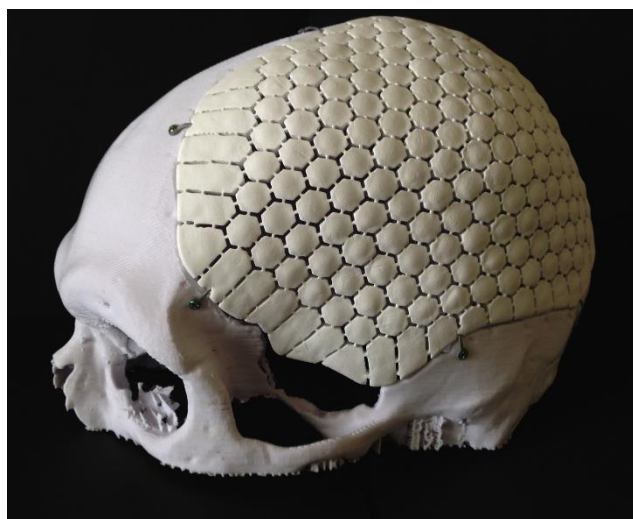


Figura 2: Exemplo de aplicação de implantes a base de fosfato de cálcio, imagem disponível em Habraken 2016.

Economicamente, o mercado mundial de biomateriais no ano de 2017 foi avaliado em US\$ 82,6 bilhões e a perspectiva com o crescimento de aplicações e desenvolvimento de materiais é que até 2024, ultrapasse US\$ 215 bilhões, sendo divulgada em 2019 a taxa anual de crescimento composta (CAGR) de 14,4% para o período segundo o *MarketWatch*, ainda afirmando os números o *Grand View Research Inc.*, o mercado global de biomateriais tem uma expectativa de crescimento de USD 250.4 bilhões para 2025, exibindo uma CAGR de 14.7% durante o período. De acordo com o site *Mordor Intelligence*, especialista no mercado de biomateriais, a divisão da aplicação dos biomateriais pode ser representada na **Figura 3:**

Biomaterials Market: Revenue Share (%), By Application, Global, 2018

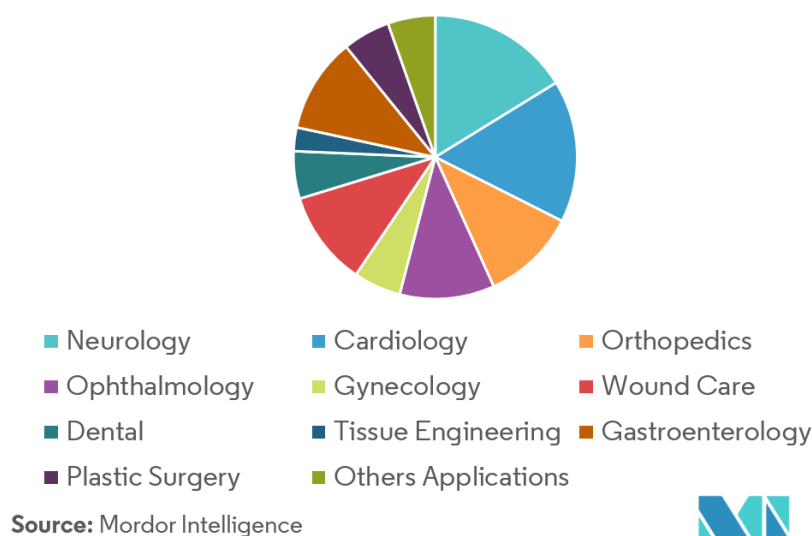


Figura 3: Gráfico representando as aplicações mais utilizadas de biomateriais no mercado mundial. Gráfico disponível em <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biomaterials-market-industry>

Os primeiros implantes apresentavam falhas principalmente devido à infecções ou falta de conhecimento sobre suas toxicidades. A utilização dos fosfatos de cálcio devido a sua semelhança mineral aos ossos e dentes tornara-os uma escolha mais óbvia e viável no planejamento de biomateriais implantáveis (STEVENS et al., 2005; WANG et al., 2009).

Os fosfatos de cálcio são considerados de relevância nesse cenário, uma vez que são substitutos ósseos comuns devido à sua semelhança com a fração inorgânica do osso. A troca iônica promovida com os fluidos extracelulares e, mais especificamente, sua capacidade de diminuir localmente a concentração de íons cálcio e fosfato, associada em alguns casos com a formação de uma camada de apatita, tem sido proposta como um dos mecanismos desencadeadores de seu potencial osteoindutivo intrínseco. Assim, os efeitos dos fosfatos de cálcio em respostas imunológicas ou em na formação do osso vem sendo amplamente estudados (GROEN et al., 2015; HAIDER et al., 2017; SADOWSKA et al., 2019; WANG et al., 2015) .

Cerâmicas bioativas como a hidroxiapatita (HA) e o fosfato β -tricálcico (TCP) têm sido utilizadas como substitutos ósseos artificiais por sua biocompatibilidade. São dois membros da família dos materiais a base de fosfato de cálcio, que são comumente usados em ortopedia e odontologia. A HA cria um revestimento de apatita na sua superfície e funde-se diretamente ao osso esponjoso natural e dificilmente é absorvida no organismo, enquanto o β -TCP é uma das formas existentes de TCP, que depende do método de fabricação e calcinação, sendo naturalmente

reabsorvido *in vivo* (HE et al., 2017; LUKIĆ et al., 2011; SADOWSKA et al., 2019). Por suas características esses materiais vem sendo muito estudados e entende-los é de enorme importância no campo dos biomateriais.

1.2.1 Hidroxiapatita

A Hidroxiapatita (HA) é um membro da família apatita (consiste de cálcio e fosfato) com a fórmula geral $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, e a fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Na célula unitária de HA, Ca e fosfatos são dispostos de tal maneira que quatro átomos de Ca estão rodeados por nove átomos de O dos grupos fosfato na posição M1, e os outros seis átomos de Ca estão rodeados pelos seis átomos de O restantes as porções fosfato na posição M2 (HAIDER et al., 2017). Por sua importância na fase inorgânica do osso, a HA é tema de muitos estudos no mundo todo, como ilustrado na **Figura 4**. Por ser um material de características únicas e de apelo biomédico, esses materiais são amplamente utilizados (HAIDER et al., 2017; HE et al., 2017).

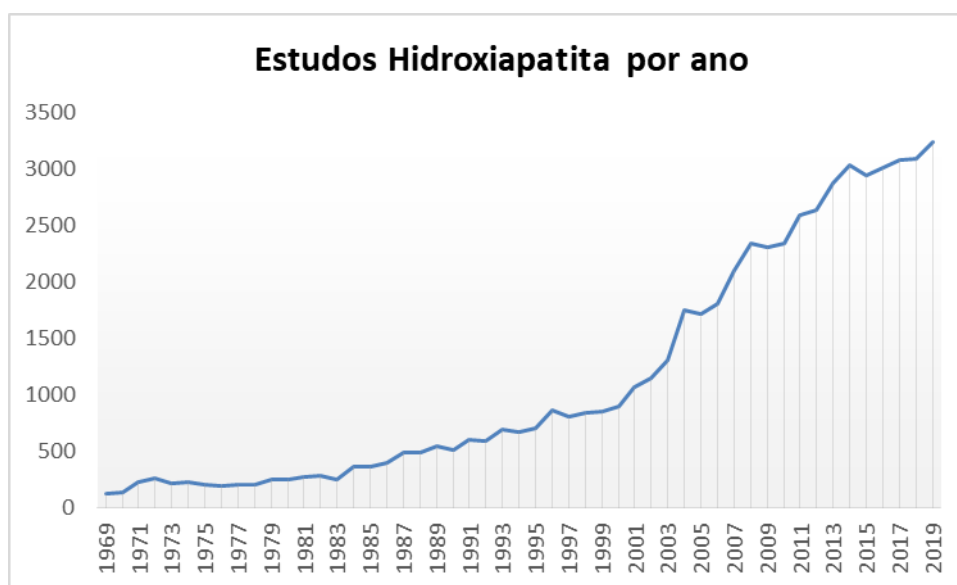


Figura 4: Número de Artigos abordando HA entre 1969 a 2019 na plataforma SCOPUS (**Fonte:** Próprio Autor (Janeiro, 2020))

Por suas características químicas e estruturais, seu uso varia em aplicações na área de ortopedia, farmacologia e odontologia - exemplos destas aplicações, como ilustrado na **Figura 5** (plataforma SCOPUS), mostra que em ortopedia é utilizada como revestimento de próteses metálicas para promover a interação interfacial estável entre o material implantado e o tecido vivo do hospedeiro (HAIDER et al., 2017). Na área farmacológica, em especial no tratamento de tumores, a hidroxiapatita é empregada como suporte para sistemas de liberação controlada de

fármacos, permitindo assim uma liberação gradual do composto farmacológico no organismo. Na odontologia, esse biomaterial vem sendo utilizado com o objetivo de evitar a perda óssea após extração de elementos dentários, e também em recuperação de áreas com taxas de reabsorção ósseas.

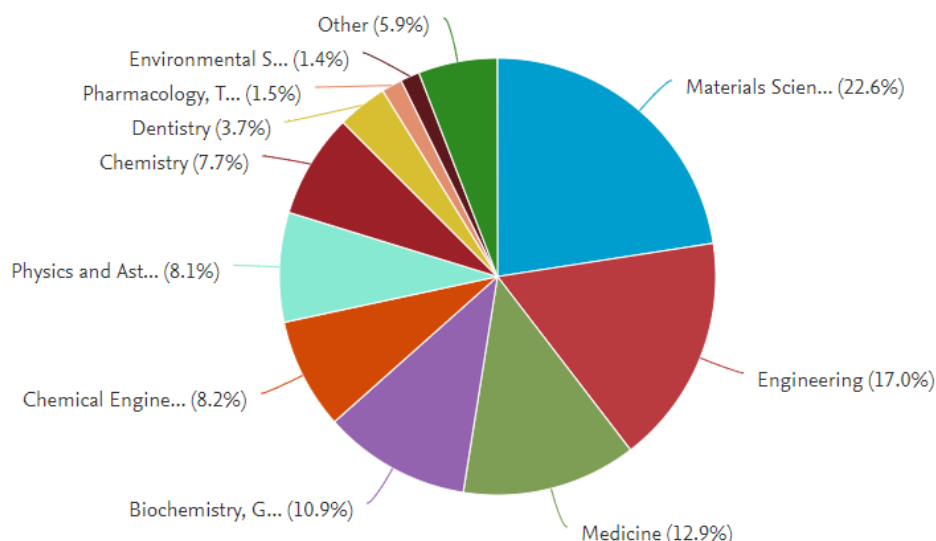


Figura 5: Principais Aplicações Hidroxiapatita em busca na plataforma SCOPUS, destacando as diferentes áreas, como ciências dos materiais, engenharias, medicina, química e bioquímica, odontologia e farmacologia. **Fonte:** Próprio Autor.

1.2.2 Fosfato tricálcio

O β -TCP possui uma semelhança química com o componente material de dentes e ossos dos mamíferos, por isso, juntamente com HA, vem sendo amplamente propostos para serem utilizados como substituto ósseo, sendo sua fórmula química $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (SAKKA; BOUAZIZ; BEN, 2013). O crescimento de sua aplicação deve-se principalmente à sua biocompatibilidade e por suas propriedades biodegradáveis, além de possuir um bom equilíbrio entre a absorção, degradação e neoformação óssea, além de preservar a estabilidade estrutural, liberando uma grande quantidade de íons cálcio (Ca^{2+}), sal inorgânico indispensável para a formação de novos ossos (EBRAHIMI; BOTELHO; DOROZHUKIN, 2017; KIVRAK; TAŞ, 2005).

Seu uso como substituto ósseo tem destaque nos campos cirúrgicos, sendo bem semelhantes às aplicações de HA. A principal limitação ao uso do β -TCP como biomaterial nos ossos longos, é em relação suas propriedades mecânicas, tornando-se frágil, com baixa resistência à fadiga. Seu pobre comportamento mecânico é ainda mais evidente quando usado para fazer

cerâmica e *scaffolds* mais porosos (EBRAHIMI; BOTELHO, 2017; SAKKA; BOUAZIZ; BEN, 2013).

1.3 Interação células e biomaterial

Para entender o comportamento celular e as interações célula-biomaterial, Caplan e Shah 2009 sugerem que existe um modelo central, envolvendo a ativação de receptores de membrana, em que a transdução de sinal ocorre pela ativação de cascatas específicas e ordenadas; além disso, direcionando o comportamento celular a partir da alteração da expressão de genes específicos (CAPLAN; SHAH, 2009; GEMINI-PIPERNI et al., 2014a; MEHRA et al., 2011).

A literatura mostra que as células apresentam respostas diferentes diante de várias superfícies de materiais e entender esses mecanismos envolvidos com adesão, proliferação e diferenciação celulares torna-se fundamental para projetar novos materiais (ZAMBUZZI et al., 2011). Exemplificando, materiais utilizados em implantes odontológicos, quando ocorre uma rápida osteointegração é porque a interação osteoblástica na superfície do material implantado foi bem sucedida, com processos sequenciais de proliferação e diferenciação sendo enfatizados. Mecanismos celulares são controlados por mecanismos de transdução de sinal, que respondem a diversos estímulos, como as propriedades químicas das superfícies dos materiais (DA COSTA FERNANDES et al., 2018b; ZAMBUZZI et al., 2011).

Somados, os trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Prof. Willian Zambuzzi, em Botucatu, São Paulo, relata a necessidade de buscar biomarcadores da interação célula/material, com o objetivo de auxiliar na compreensão dos mecanismos de transdução de sinal desencadeados pela performance de osteoblastos e, assim, contribuir no desenvolvimento de materiais inteligentes, com respostas biológicas parcialmente previstas (ZAMBUZZI et al., 2011).

O processo no qual uma célula responde a estímulos externos e modifica seu estado e atividade é chamado de transdução de sinal. Por meio de receptores transmembranares, a célula é capaz de capturar estímulos físicos e químicos, como estresse mecânico ou moléculas, como hormônios e fatores de crescimento. Esses estímulos alteram a conformação espacial desses receptores, e essa alteração é responsável por desencadear uma cascata de eventos intracelulares, provocados por esses estímulos e causadores de variações pós-traducionais de proteínas através de mecanismos de fosforilação transiente, guiado por quinases e fosfatases, classes de enzimas transferases e hidrolases, respectivamente, responsáveis pelo metabolismo antagônico do grupamento fosforil. Portanto, o equilíbrio entre quinases e fosfatases é responsável por guiar o mecanismo celular em diferentes direções, oferecendo diferentes respostas ao mecanismo de contextualização celular (GEMINI-PIPERNI et al., 2014a; ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010a).

Eventos celulares como proliferação, diferenciação, adesão, controle do ciclo celular, entre outros, são exemplos de cascatas de reações controladas pelo mecanismo de transdução de sinal. Nos eucariotos, a fosforilação pode ocorrer apenas em três resíduos de aminoácidos: Serina (S), Treonina (T) e Tirosina (Y), acrescentando-se a Histidina nos procariotos. Em se tratando de mecanismos das quinases, reporta-se a necessidade de reconhecimento por estas a uma sequência definida de resíduos de aminoácidos, variando entre 7-11 resíduos, chamada de sequência consenso, a qual traz especificidade à essas enzimas (ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010a).

Dentre as quinases, as proteínas tirosina quinases (PTK) têm sido frequentemente associadas à promoção da adesão celular. Após a ativação da integrina, a fosforilação desses PTKs cria locais de acoplamento para a ativação de outras proteínas citosólicas, já associadas em migração, organização do citoesqueleto, expressão gênica e progressão do ciclo celular. Posteriormente, as moléculas do citoesqueleto e de sinalização correlata são recrutadas para estruturas de adesão focal que promovem a fosforilação transitória de quinases específicas como FAK e Src em resíduos de Tyr, alterando o comportamento celular (BERTAZZO et al., 2009; ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010b).

Quando ativadas, as integrinas formam dímeros na membrana plasmática, favorecendo o recrutamento e ativação de proteínas intracelulares, iniciando uma cascata de eventos biológicos, inicialmente através da fosforilação da FAK e culminando na reorganização dos filamentos de actina, componentes do citoesqueleto, através da regulação da atividade da cofilina, cuja a regulação se dá pelo balanço da fosforilação de seu resíduo Serina 03. Portanto, essas moléculas têm sido consideradas biossensores de adesão celular e, para o desenvolvimento de materiais, podem ser exploradas para a caracterização biológica de diferentes superfícies, prevendo a qualidade da integração celular e material (KANG et al., 2018; ZAMBUZZI et al., 2009b, 2011).

Em outros materiais como a zircônia, a sinalização celular parece envolver mecanismos de respostas que levam a indução de proliferação celular, bem como ao aumento da expressão gênica de colágeno tipo I e do osteopontina. Da Costa Fernandes et al. (2018) demonstraram parte do mecanismo molecular envolvido em sua resposta biológica, revelando um repertório de moléculas de sinalização capazes de propor a remodelação da Matriz Extracelular (MEC) como pré-requisito ao fenótipo pré-osteoblástico, através de mecanismos de ancoragem (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a), além disso, as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) foram ativadas significativamente. A fim de avaliar se essas cascatas de fosforilação envolvidas com a sobrevivência culminam no controle de proliferação, estes autores relataram, ainda, um aumento significativo da fosforilação de CDK2, enquanto a expressão de p15 apresentou uma leve redução. Sabe-se que o balanço entre CDK2 e p15 está envolvido na progressão do ciclo celular. Neste ponto, parece que o balanço de fosforilação de Ser/Thr é um importante biomarcador da resposta

relacionada à zircônia. Por essa razão, a proposta de sugerir envolvimento de Ser/Thr fosfatases parece uma realidade, como é o caso da PP2A (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a; KOUTSOPOULOS et al., 2002; ZAMBUZZI et al., 2009b).

Embora com grandes avanços acerca dos mecanismos biológicos envolvidos na resposta à diferentes materiais já tenham sido feitos, a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos nos diferentes estágios da resposta tecidual à implantação de HA e o TCP ainda não é compreendido, motivo pelo qual estudos de expressão global têm sido conduzidos a fim de se conhecer as mudanças fenotípicas desencadeadas pela resposta biológica de células respondendo a esses materiais. Neste contexto, uma compreensão acerca dos processos biológicos desencadeados intracelularmente e responsáveis pelo comportamento das células durante a interação com a superfície desses materiais será gerado, contribuindo na busca pelo material biomédico ideal e aumentando sua eficácia. Como já reportado anteriormente, conhecer os mecanismos que regem desfechos celulares envolvidos com migração, adesão e proliferação celular em resposta à superfícies dos biomateriais é relevante, uma vez que já foram descritos como pré-requisitos importantes para iniciar o processo de regeneração tecidual (GEMINI-PIPERNI et al., 2014b; ZAMBUZZI et al., 2009b).

1.4 Bioinformática

Envolvidos muitas vezes em análises globais e em biologia de sistemas, as ferramentas computacionais tem sido fundamentais na organização dos dados, como por exemplo bancos de dados biológicos para as mais diversas áreas, além de estarem em constante desenvolvimento de novos métodos de bioanálises *in silico*. Posto isto, a obtenção e organização de biomarcadores da interação célula-biomaterial pode guiar o processo de produção destes, além de contribuir sobremaneira na busca por métodos alternativos ao uso de animais de experimentação. Assim a utilização de banco de dados para reunir informações preliminares afim de direcionar os experimentos tem sido estratégia importante, uma vez que muito se tem gasto para geração desses dados massivos, porém com pouco desenvolvimento de suas análises. Uma mostra da crescente demanda na área de bioinformática pode ser vista na **Figura 6**, onde uma busca simples retorna crescimento vertiginoso na última década, justamente como uma resposta à análises dos dados gerados nas eras da genômica e proteômica.

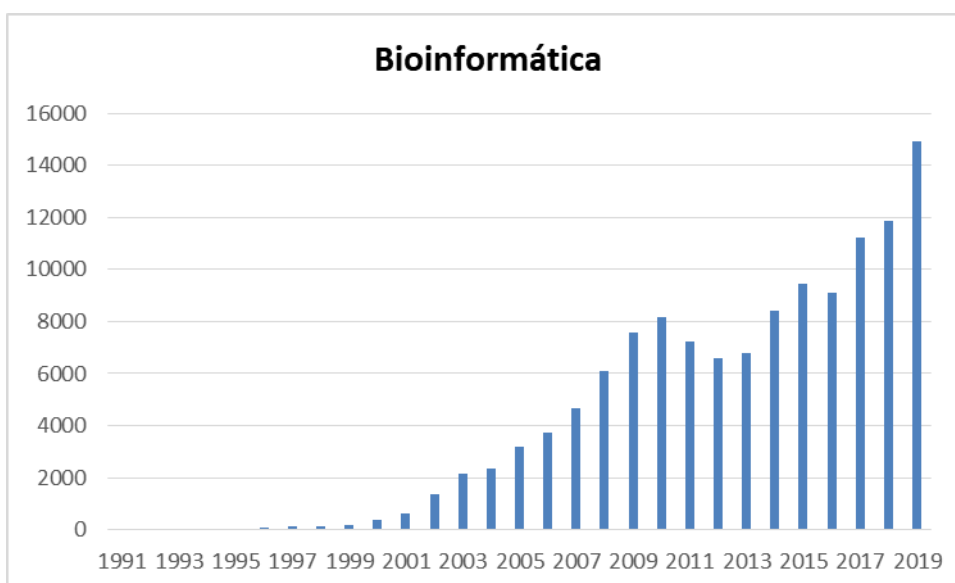


Figura 6: Publicações com o termo “bioinformática” no período de 1991 a 2019. **Fonte:** Próprio Autor (Janeiro 2020).

1.4.1 GSE

Dentre as estratégias dentro da temática de bioinformática, a análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSE) trata de uma estrutura capaz de agrupar informações de perfis de expressão gênica em um caminho ou assinatura. O diferencial desta abordagem é o fato que, a partir da análise de um único gene, incluem redução de ruído e dimensão, trazendo maior interpretabilidade biológica. À medida que os experimentos de perfis moleculares vão evoluindo, além de apenas estudos simples de caso-controle, são necessárias metodologias robustas e flexíveis de GSE que possam modelar a atividade da via dentro de conjuntos de dados altamente heterogêneos (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2018).

A capacidade de medir a abundância de mRNA em escala genômica tem levado ao desenvolvimento de diversas ferramentas para catalogar os diversos padrões moleculares subjacentes aos processos biológicos. Os métodos GSE tornam-se uma solução encontrada para auxiliar na interpretação e organização de longas listas de genes resultantes de experimentos de *microarray*, medindo e separando sistematicamente perfis moleculares que são inerentemente ruidosos e difíceis de interpretar. As análises de GSE se iniciam com a obtenção de uma lista de genes classificados, a partir de experimentos de *microarray* que estudem mudanças de expressão gênica entre dois grupos. Os genes são então mapeados em conjuntos de genes pré-definidos e sua estatística de expressão gênica é resumida em uma única pontuação de enriquecimento para cada conjunto de genes. Uma das principais vantagens destes métodos baseados em rotas é a interpretabilidade: a função do gene é exercida coletivamente e pode variar por estímulos ambientais, modificações genéticas ou dependendo de estados ou níveis de doença. Portanto, a

organização de genes em conjuntos de genes fornece um contexto mais intuitivo e estável para avaliar a atividade biológica (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2013).

Muitas variações metodológicas dos métodos de GSE foram propostas, como estatísticas de enriquecimento não paramétrico, testes de bateria e testes de conjunto de genes focados. Os métodos de teste de bateria visam identificar conjuntos de genes que se destacam de uma grande coleção de caminhos anotados e assinaturas gênicas. Métodos focados de testes de genes tentam avaliar cuidadosamente alguns conjuntos de genes que são relevantes para o experimento que está sendo analisado. Os métodos de GSE tem sido aplicados com sucesso em muitas condições experimentais para interpretar a estrutura da via de estados biológicos, a exemplo de doença metabólica e câncer.

Uma distinção importante entre muitos dos métodos de GSE é a definição da hipótese nula que é testada. A hipótese nula de um teste declara que não há diferenças entre os genes dentro e fora do conjunto de genes. Um teste autônomo define sua hipótese nula apenas em termos dos genes dentro do conjunto de genes que está sendo testado. Portanto, para um teste autônomo em um conjunto de genes, a expressão diferencial de apenas um de seus genes permite rejeitar a hipótese nula de não haver expressão diferencial para esse conjunto de genes (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2013; HUNG et al., 2012).

1.4.2 GSVA

Um outro método de GSE, apresentado pelo grupo Bioconductor e que estima a variação da atividade da via sobre uma população de amostra de uma maneira não supervisionada, é chamado de Análise de Variação do Conjunto de Gene (GSVA). O GSVA calcula os escores de enriquecimento do conjunto de genes por amostra como uma função de genes dentro e fora do conjunto de genes, de forma análoga a um teste de conjunto de genes competitivo. Além disso, estima a variação do enriquecimento do conjunto de genes sobre as amostras independentemente de qualquer rótulo de classe. Conceitualmente, essa metodologia pode ser entendida como uma mudança nos sistemas de coordenadas para dados de expressão gênica, de genes a conjuntos de genes. Essa transformação facilita a construção post-hoc de modelos centrados na via, como a identificação de atividade de uma via diferencial ou previsão de sobrevivência. O método também demonstrou a flexibilidade do GSVA aplicando-o aos dados de RNA-seq (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2013, 2018; HUNG et al., 2012).

O GSVA fornece maior sensibilidade para detectar mudanças sutis na atividade da via em uma população de amostra em comparação com os métodos correspondentes. Enquanto os métodos GSE são geralmente considerados como pontos finais de uma análise bioinformática, a GSVA constitui um ponto de partida para construir modelos de biologia centrados na via. Além

disso, o GSVA contribui para a necessidade atual de métodos de GSE para dados de RNA-seq. O GSVA é um pacote de software de código aberto para o R (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2018).

1.4.3 MSigDB

O banco de dados de assinaturas moleculares, sendo uma tradução livre para *Molecular Signatures Database* (MSigDB), é um dos mais amplamente utilizados quando se trabalha com análises para enriquecimentos de conjunto de genes. Possui em torno de 17.810 conjuntos de genes em seu banco de dados, sendo divididos em oito coleções principais, Hallmark – conjunto de genes de marcação, incluem genes agrupados por sua localização no genoma humano (C1), vias canônicas e assinaturas experimentais curadas a partir de publicações (C2), genes compartilhando motivos cis-regulatórios a montante ou a jusante de suas sequências codificadoras (C3), agrupamentos de genes co-expressos em compêndios de microarray (C4), genes agrupados de acordo com a categoria de ontologia gênica (GO) (C5), assinaturas de ativação da via oncogênica (C6), e uma grande coleção de condições imunológicas (C7) e diversas sub-coleções (LIBERZON et al., 2015).

Esses conjuntos estão disponíveis no site do MSigDB e, segundo o banco de dados, estão resumidos abaixo:

Coleção H: conjuntos de genes de marcação (Hallmark): Os conjuntos de genes Hallmark juntos somam cerca de 50 conjuntos, resumem e representam estados ou processos biológicos específicos bem definidos e exibem expressão coerente. Esses conjuntos de genes foram gerados por uma metodologia computacional baseada na identificação de sobreposições entre conjuntos de genes em outras coleções MSigDB e na retenção de genes que exibem expressão coordenada. As marcas reduzem o ruído e a redundância e fornecem um espaço biológico melhor delineado para o GSEA (LIBERZON et al., 2015);

C1: conjuntos de genes posicionais: Composto por 326 conjuntos de genes, esses conjuntos são correspondentes a cada cromossomo humano e cada banda citogenética que possui pelo menos um gene. Esses conjuntos de genes podem ser úteis na identificação de efeitos relacionados a deleções ou ampliações cromossômicas, compensação de dosagem, silenciamento epigenético e outros efeitos regionais;

C2: conjuntos de genes curados: Sendo composto por 4762 conjuntos de genes, estes sendo selecionados de várias fontes, como bancos de dados de caminhos on-line, literatura biomédica e

conhecimento de especialistas em domínio. A página do conjunto de genes para cada conjunto de genes lista sua origem. A coleção C2 é dividida em duas sub-coleções: perturbações químicas e genéticas (CGP) e vias canônicas (CP);

CGP: perturbações químicas e genéticas, o subconjunto é formado por 3433 conjuntos de genes, estes representam assinaturas de expressão de perturbações genéticas e químicas. Alguns destes conjuntos de genes vêm em pares: conjunto de genes xxx_UP (e xxx_DN) representando genes induzidos (e reprimidos) pela perturbação.

CP: este subconjunto é dividido em quatro, caminhos canônicos (1329 conjuntos de genes), biocarta (217 conjuntos de genes), KEGG (186 conjuntos de genes) e Reactome (674 conjuntos). Este subconjunto e suas divisões são referentes a banco de dados de caminho, sendo representações canônicas de processos biológicos compilados por especialistas de domínio;

C3: Conjuntos de genes de Motif: Composto por 836 conjuntos de genes, representando alvos potenciais de regulação por fatores de transcrição ou microRNAs. Os conjuntos consistem em genes agrupados por motivos de sequência curta que eles compartilham em suas regiões codificadoras não proteicas. Os motivos representam elementos reguladores cis conhecidos ou prováveis em promotores e 3'-UTRs. Estes conjuntos de genes tornam possível ligar as mudanças em um experimento de perfil de expressão a um elemento regulatório cis. A coleção C3 é dividida em duas sub-coleções: alvos de microRNA (MIR) e alvos de fatores de transcrição (TFT).

C4: conjuntos de genes computacionais: Composto por 858 conjuntos de genes computacionais definidos pela mineração de grandes coleções de dados microarray orientados para o câncer. A coleção C4 é dividida em duas sub-coleções: CGN e CM.

CGN: 427 conjuntos de genes definidos por vizinhança de expressão centrados em 380 genes associados ao câncer.

CM: 431 conjuntos de genes relacionados com módulos de câncer. Resumidamente, os autores compilaram conjuntos de genes ('módulos') de uma variedade de recursos, como KEGG, GO e outros. Ao extrair um grande compêndio de dados de microarray relacionados ao câncer, eles identificaram 456 desses módulos como significativamente alterados em uma variedade de condições de câncer (SEGAL et al., 2004) .

Coleção C5: Conjuntos de genes Gene Ontology (GO). Composto por 5917 conjuntos de genes, nesta coleção são derivados de anotações Gene Ontology (GO). No GO foi elaborado para desenvolver e usar ontologias para apoiar a anotação biologicamente significativa de genes e seus produtos. Uma anotação GO consiste em um termo GO associado a uma referência específica que

descreve o trabalho ou a análise na qual a associação entre um termo GO específico e o produto gênico é baseado. Um produto genético pode estar associado a um ou mais termos GO, esta coleção é dividida em três sub-coleções baseadas em ontologias GO: BP, CC e MF.

Processo Biológico BP: 4436 Conjuntos de genes derivados da Ontologia do Processo Biológico GO.

Componente Celular CC: 580 conjuntos de genes derivados da ontologia de componentes celulares.

Função Molecular MF: 901 conjuntos de genes derivados da ontologia de Função Molecular.

C6: Assinaturas Oncogênicas: 189 conjuntos de genes que representam assinaturas de vias celulares frequentemente desreguladas no câncer. A maioria das assinaturas foi gerada diretamente a partir de dados de microarranjos do GEO do NCBI ou de experimentos internos de caracterização não publicados envolvendo perturbação de genes conhecidos do câncer.

C7: assinaturas imunológicas: 4872 conjuntos de genes que representam estados celulares e perturbações dentro do sistema imunológico. As assinaturas foram geradas por curadoria manual de estudos publicados em imunologia humana e de camundongos.

Por fim, esse estudo se justifica pela análise global dos eventos transcricionais envolvidos na resposta celular a diferentes temperaturas de síntese de HA e TCP. Com seu desenvolvimento, sobretudo através de metodologias *in silico*, como aquelas já citadas aqui, um panorama melhor será relatado acerca dos mecanismos envolvidos com mudanças fenotípicas desses desencadeados por esses materiais. Por outro lado, seu desenvolvimento também reforça a necessidade de modelos alternativos aos animais de experimentação, uma vez que testes de biomateriais têm sido, por anos, avaliados em modelos animais.

Estudos *in silico*, como esse proposto nesta dissertação, pode ter seus dados validados em modelos experimentais fazendo uso de cultivo celular *in vitro*. Embora com limitações, modelos biológicos celulares são amplamente empregados em diversos estudos. Com a necessidade de testar os biomateriais e suas aplicações, os testes *in vitro* possibilitam a detecção precoce de toxicidade destes e potenciais reações adversas, previstas internacionalmente pela ISO10993. Os testes como o de toxicidade, por exemplo, é o teste base para o início das aplicações metodológicas *in vitro*, pois busca avaliar tanto em contato direto como indireto com a célula.

7 CONCLUSÃO

Os estudos *in silico* vêm crescendo e demonstrando importância no direcionamento de experimentos e na produção de biomateriais e, quando unidos à processos de validação através de cultivo celular, propõe-se uma nova estratégia de bioanálise, diminuindo e otimizando procedimentos com experimentação animal, trazendo impacto ético e econômico ao desenvolvimento de biomateriais.

8 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in immunology**, v. 20, n. 2, p. 86–100, abr. 2008.
- ASHBURNER, M. et al. **Gene ontology: Tool for the unification of biology** *Nature Genetics*, maio 2000.
- BALOUL, S. S. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during Tooth Movement. **Frontiers of oral biology**, v. 18, p. 75–9, 2016.
- BERGER, J. M. et al. Mediation of the Acute Stress Response by the Skeleton. **Cell Metabolism**, p. 1–13, set. 2019.
- BERTAZZO, S. et al. Bioactivation of alumina by surface modification: A possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 3, p. 288–293, mar. 2009.
- BEZERRA, F. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 8, p. 1888–1898, 1 ago. 2017.
- CAO, Y. et al. Osterix, a transcription factor for osteoblast differentiation, mediates antitumor activity in murine osteosarcoma. **Cancer Research**, v. 65, n. 4, p. 1124–1128, 15 fev. 2005.
- CAPLAN, M. R.; SHAH, M. M. **Translating biomaterial properties to intracellular signaling** *Cell Biochemistry and Biophysics*, jul. 2009.
- CHEN, H.; BOUTROS, P. **CRAN - Package VennDiagram**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/index.html>>. Acesso em: 23 out. 2019.
- CHEN, J. et al. Angiogenic and Osteogenic Synergy of Human Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells Cocultured on a Nanomatrix. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- CORREA, D. R. N. et al. Development of Ti-15Zr-Mo alloys for applying as implantable biomedical devices. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 749, p. 163–171, 15 jun. 2018.
- CZEKANSKA, E. M. et al. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. **European Cells and Materials**, v. 24, n. 2012, p. 1–17, 2012.
- CZEKANSKA, E. M. et al. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 8, p. 2636–2643, 1 ago. 2014.
- DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Fibroblast contributes for osteoblastic phenotype in a MAPK-ERK and sonic hedgehog signaling-independent manner. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 436, n. 1–2, p. 111–117, 2017.
- DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 4, 2018a.
- DA COSTA FERNANDES, C. J. et al. Titanium-enriched medium drives low profile of ECM remodeling as a pre-requisite to pre-osteoblast viability and proliferative phenotype. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 50, p. 339–346, 1 dez. 2018b.
- DALLABRIDA, A. L. et al. Caracterização de biocerâmica de fosfatos de cálcio microestruturada em diferentes composições em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2018.
- DOUGALL, W. C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. **Genes & development**, v. 13, n. 18, p. 2412–24, 15 set. 1999.
- EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. Biphasic calcium phosphates (BCP) of hydroxyapatite (HA) and

- tricalcium phosphate (TCP) as bone substitutes: Importance of physicochemical characterizations in biomaterials studies. **Data in Brief**, v. 10, p. 93–97, 2017.
- EBRAHIMI, M.; BOTELHO, M. G.; DOROZHKIN, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 1293–1312, 1 fev. 2017.
- ENGBLOM, C. et al. Osteoblasts remotely supply lung tumors with cancer-promoting SiglecFhigh neutrophils. **Science (New York, N.Y.)**, v. 358, n. 6367, p. eaal5081, 1 dez. 2017.
- GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, p. 17059, 21 dez. 2017.
- 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, 2014a.
- GEMINI-PIPERNI, S. et al. Kinome profiling of osteoblasts on hydroxyapatite opens new avenues on biomaterial cell signaling. . set. 2014 b, p. 1900–1905.
- GHEISARI, H.; KARAMIAN, E.; ABDELLAHI, M. A novel hydroxyapatite -Hardystonite nanocomposite ceramic. **Ceramics International**, v. 41, n. 4, p. 5967–5975, 2015.
- GROEN, N. et al. Exploring the Material-Induced Transcriptional Landscape of Osteoblasts on Bone Graft Materials. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 11, p. 1691–1700, 1 ago. 2015.
- GU, Z. et al. Circlize implements and enhances circular visualization in R. **Bioinformatics**, v. 30, n. 19, p. 2811–2812, 2 abr. 2014.
- GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 18, p. 2847–9, 2016.
- HABRAKEN, W. et al. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? **Materials Today**, v. 19, n. 2, p. 69–87, 2016.
- HADLEY, W. **Package “dplyr” Type Package Title A Grammar of Data Manipulation Depends R (≥ 3.2.0)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/dplyr/dplyr.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2019.
- HAIDER, A. et al. **Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review**RSC Advances, 2017.
- HÄNZELMANN, S.; CASTELO, R.; GUINNEY, J. GSVA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 16 jan. 2013.
- HÄNZELMANN, S.; CASTELO, R.; GUINNEY, J. **GSVA: The Gene Set Variation Analysis package for microarray and RNA-seq data**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://cancergenome.>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- HE, F. et al. Multiscale characterization of the mineral phase at skeletal sites of breast cancer metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10542–10547, 3 out. 2017.
- HENCH, L. L. **Biomaterials: A forecast for the future**Biomaterials. [s.l.] Elsevier, 1 ago. 1998. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0142961298001331/1-s2.0-S0142961298001331-main.pdf?_tid=074d0e1f-a5f0-4148-9f91-a8348a51466f&acdnat=1555421743_9c71014408788922f6f0b2ba504b240e>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- HU, W. J. et al. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions (vol 98, pg 1231,

- 2001). **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1231–1238, 2001.
- HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 426–32, 26 nov. 2009.
- HUNG, J.-H. et al. Gene set enrichment analysis: performance evaluation and usage guidelines. **Briefings in Bioinformatics**, v. 13, n. 3, p. 281–291, 1 maio 2012.
- JANDT, K. D. Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science-A Perspective**. 2007.
- JIANG, Y. et al. Effects of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr wear particles on differentiation and functions of bone marrow stromal cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101, n. 10, p. 2817–2825, out. 2013.
- KANEHISA, M. et al. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 1 jan. 2017.
- KANG, H. R. et al. Mg–Al and Zn–Al Layered Double Hydroxides Promote Dynamic Expression of Marker Genes in Osteogenic Differentiation by Modulating Mitogen-Activated Protein Kinases. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2018.
- KIVRAK, N.; TAŞ, A. C. Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate (HA-TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 9, p. 2245–2252, 20 jan. 2005.
- KOUTSOPOULOS, S. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 4, p. 600–612, 15 dez. 2002.
- LEE, K. et al. Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, 1 out. 2018.
- LI, Q. et al. RUNX2 promotes epithelial differentiation of ADSCs and burn wound healing via targeting E-cadherin. **Oncotarget**, v. 9, n. 2, p. 2646–2659, 2018.
- LIBERZON, A. et al. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. **Cell Systems**, v. 1, n. 6, p. 417–425, 23 dez. 2015.
- LUKIĆ, M. et al. Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 31, n. 1–2, p. 19–27, 1 jan. 2011.
- LYNCH, C. C. et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 485–496, 1 maio 2005.
- MANO, J. F. Featured Letter Designing biomaterials for tissue engineering based on the deconstruction of the native cellular environment. 2014.
- MEHRA, R. et al. Characterization of bone metastases from rapid autopsies of prostate cancer patients. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 12, p. 3924–32, 15 jun. 2011.
- MILLAR, S. A. et al. **Osteocalcin, vascular calcification, and atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis** *Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., , 31 jul. 2017.
- MURALITHRAN, G.; RAMESH, S. The Effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite. **Ceramics International**, v. 26, n. 2, p. 221–230, 1 mar. 2000.
- NEUWIRTH, E. RColorBrewer: ColorBrewer palettes. R package. 2011.
- REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.
- RITCHIE, M. E. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 6 jan. 2015.

- RUJITANAPANICH, S.; KUMPAPAN, P.; WANJANOI, P. Synthesis of hydroxyapatite from oyster shell via precipitation. **Energy Procedia**, v. 56, n. C, p. 112–117, 2014.
- SADOWSKA, J. M. et al. The effect of biomimetic calcium deficient hydroxyapatite and sintered β -tricalcium phosphate on osteoimmune reaction and osteogenesis. **Acta biomaterialia**, 30 jun. 2019.
- SAKKA, S.; BOUAZIZ, J.; BEN, F. Mechanical Properties of Biomaterials Based on Calcium Phosphates and Bioinert Oxides for Applications in Biomedicine. In: **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. [s.l: s.n.].
- SEGAL, E. et al. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. 2004.
- SHIN, S. R. et al. Graphene-based materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 255–274, 2016.
- SHOKOUHI, B. et al. The role of multiple toll-like receptor signalling cascades on interactions between biomedical polymers and dendritic cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 22, p. 5759–5771, 1 ago. 2010.
- SISAY, M.; MENGISTU, G.; EDESSA, D. The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: potential targets for anticancer therapy. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 3801–3810, 2017.
- STEVENS, M. M. et al. In vivo engineering of organs: The bone bioreactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 32, p. 11450–11455, 2005.
- SUNTERS, A. et al. Mechano-transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor α -mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor-i. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 12, p. 8743–8758, 19 mar. 2010.
- TANAKA, H. et al. TPD, FTIR, and molecular adsorption studies of calcium hydroxyapatite surface modified with hexanoic and decanoic acids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 214, n. 1, p. 31–37, 1999.
- WANG, H. et al. The Osteogenic Niche Promotes Early-Stage Bone Colonization of Disseminated Breast Cancer Cells. **Cancer Cell**, v. 27, n. 2, p. 193–210, 9 fev. 2015.
- WANG, Y. et al. Novel application of HA-TCP biomaterials in distraction osteogenesis shortened the lengthening time and promoted bone consolidation. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 27, n. 4, p. 477–82, abr. 2009.
- WICKHAM, H.; WINSTON, C. **Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2019.
- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.
- ZAMBUZZI, W. F. et al. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, n. 1–2, p. 143–150, 2009a.
- 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, 1 set. 2009b.
- 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, 1 jun. 2011.
- 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**, abr. 2010a.

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, 1 abr. 2010b.