



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS 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 Veen 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 osteosubstitutos 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).

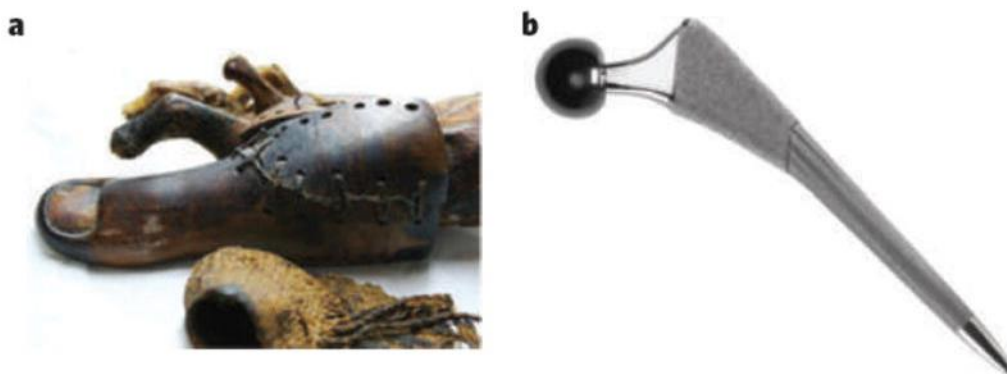


Figura 1: Exemplos de aplicações de Biomateriais. **a.** Madeira utilizada pelos egípcios, datado entre 1065 e 740 aC; **b.** Implante de quadril SYNERGY. Figura disponível em HUEBSCH; MOONEY, 2009.

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.

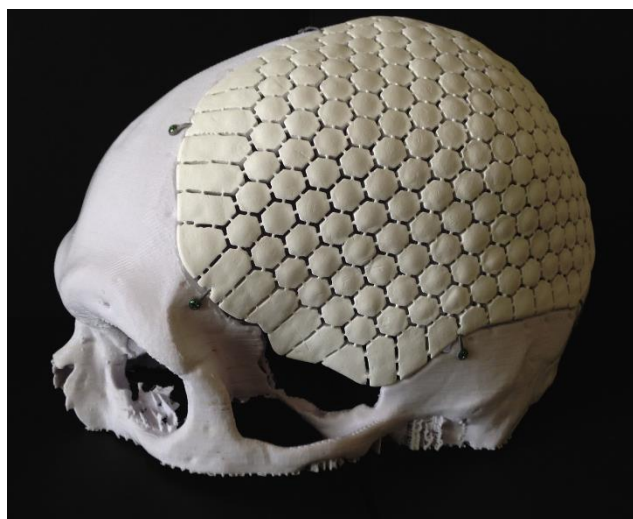


Figura 2: Exemplo de aplicação de implantes a base de fosfato de cálcio, imagem disponível em Habraken 2016.

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

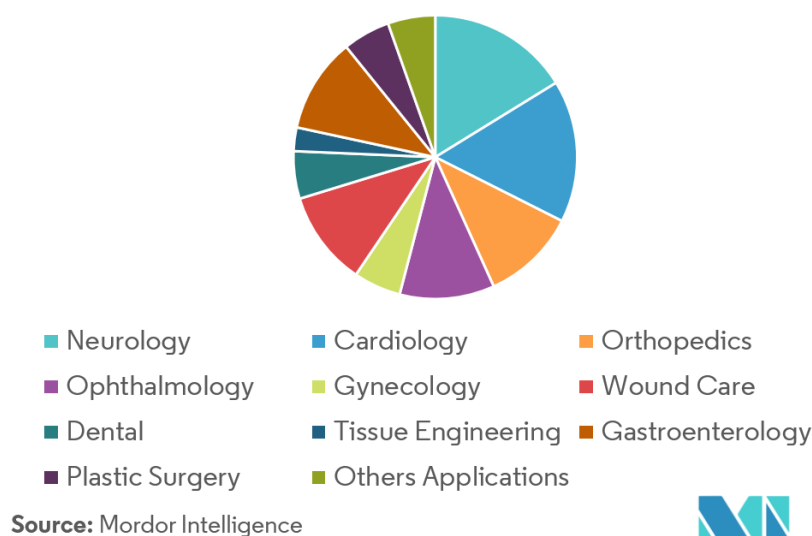


Figura 3: Gráfico representando as aplicações mais utilizadas de biomateriais no mercado mundial. Gráfico disponível em <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biomaterials-market-industry>

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).

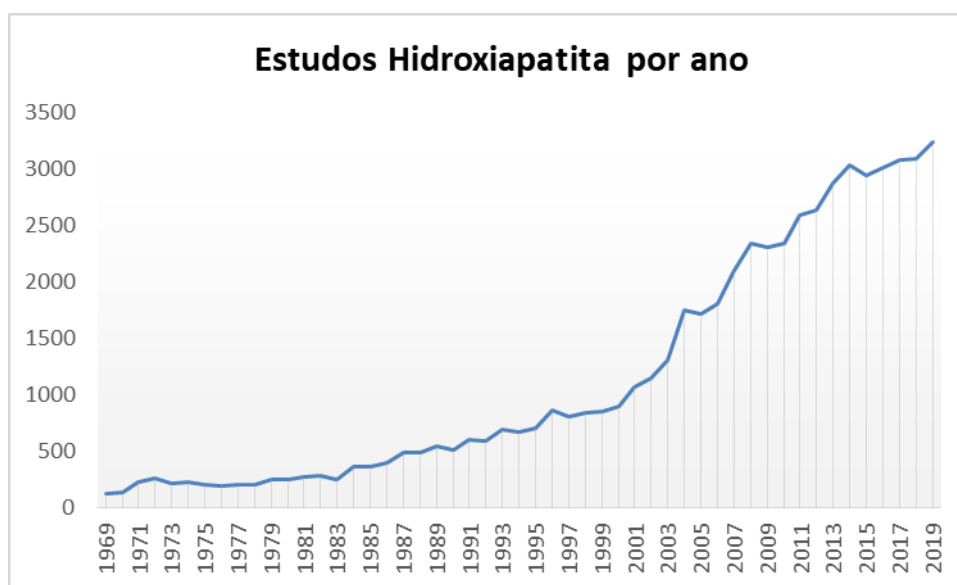


Figura 4: Número de Artigos abordando HA entre 1969 a 2019 na plataforma SCOPUS (**Fonte:** Próprio Autor (Janeiro, 2020))

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.

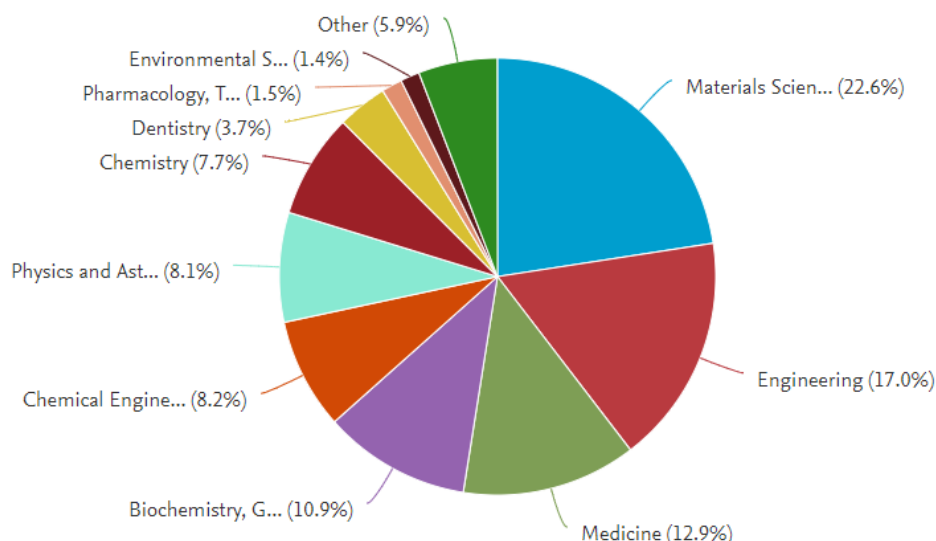


Figura 5: Principais Aplicações Hidroxiapatita em busca na plataforma SCOPUS, destacando as diferentes áreas, como ciências dos materiais, engenharias, medicina, química e bioquímica, odontologia e farmacologia. **Fonte:** Próprio Autor.

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.

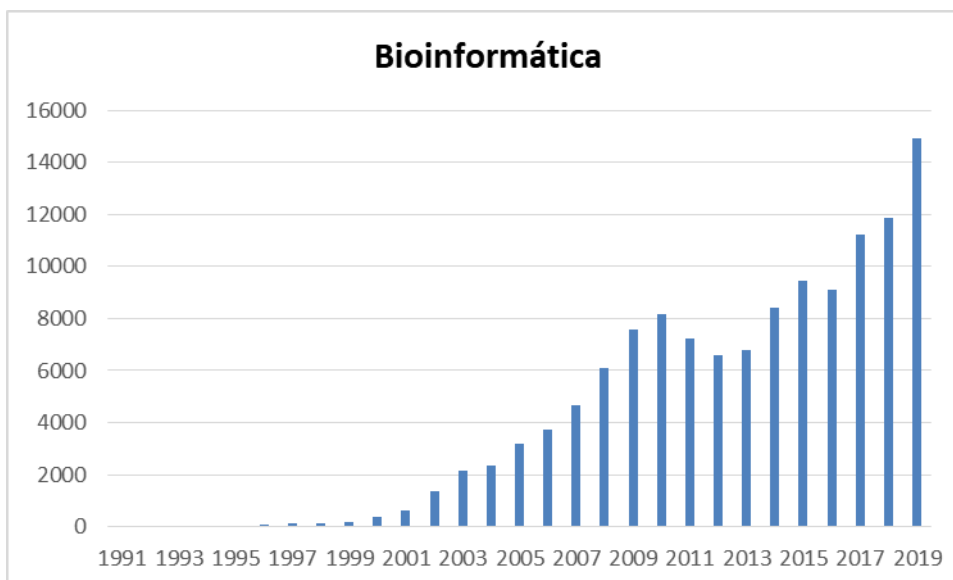


Figura 6: Publicações com o termo “bioinformática” no período de 1991 a 2019. **Fonte:** Próprio Autor (Janeiro 2020).

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.

2 OBJETIVOS

Com a utilização de ferramentas *in silico*, este trabalho teve como objetivo investigar os perfis de expressão gênica de células osteogênicas em relação à diferentes biomateriais a base de HA e TCP, obtidos a partir de diferentes temperaturas de calcinação. Especificamente, nossos objetivos são:

1. Melhor avaliar dados globais disponibilizados em ArrayExpression, sob o código de acesso: E-MTAB-7219;
2. Utilizar análises GSEA e GSVA para os dados de assinaturas dos processos biológicos, expressão diferencial e análise de enriquecimento;
3. Para validação dos dados, propomos a síntese e caracterização parcial dos materiais avaliados;
4. Para validação dos dados, propomos o desafio de células *in vitro* com os diferentes materiais para análise gênica individual através de RTqPCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desenho Experimental

O desenho experimental do experimento está resumido e pode ser visualizado na **Figura 7**. Após síntese e caracterização, os materiais foram utilizados para tratamento das células, de modo indireto.

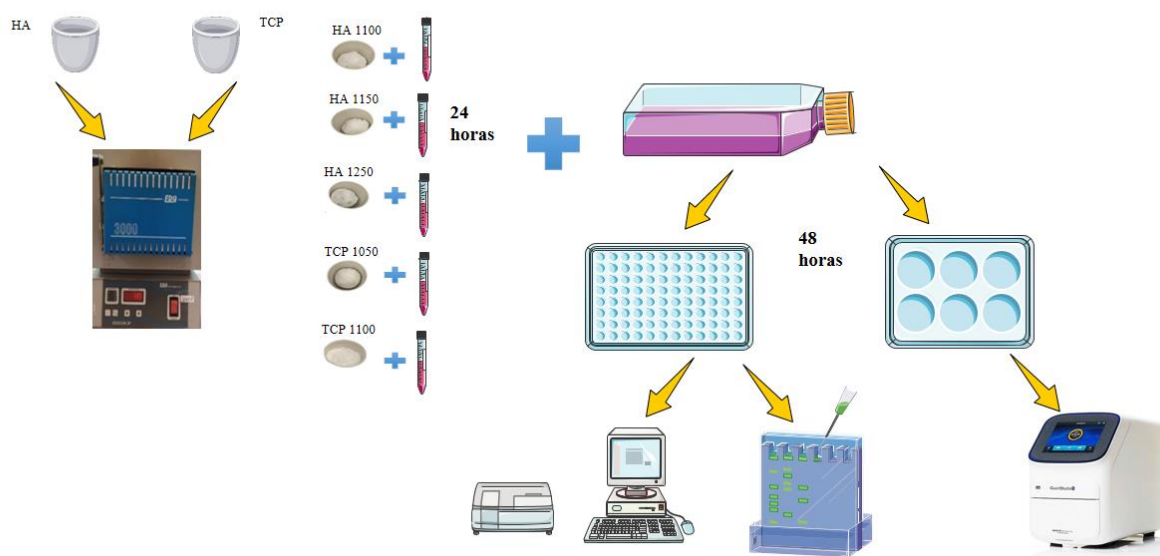


Figura 7: Desenho experimental para obtenção dos dados biológicos. Os materiais foram calcinados no forno tipo Mufla, cada amostra em uma determinada temperatura. Após os materiais foram autoclavados para garantir a ausência de contaminantes biológicos. Foram adicionados aproximadamente uma grama de 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.

3.1 BIOINFORMÁTICA

Para este trabalho foi utilizado o array de acesso E-MTAB-7219, disponibilizado a partir do artigo “Transcription profiling by array of MG-63 cells grown on different biomaterials used in bone grafts”. Este contém dados do perfil transcriptômico de células MG-63 cultivadas sobre 15 diferentes biomateriais, dentre eles três variações de hidroxiapatita e duas de fosfato tricálcio. Este array foi depositado por Dennis Hebel e Jan de Boer (GROEN et al., 2015). As análises foram realizadas utilizando a linguagem de programação R. Os dados foram transformados utilizando os pacotes dplyr (WICKHAM; WINSTON, 2019), tidyr (HADLEY, 2019; WICKHAM; WINSTON, 2019) e purr (WICKHAM; WINSTON, 2019). Análise de expressão diferencial foi realizada utilizando o pacote Limma (RITCHIE et al., 2015). Análise de enriquecimento funcional de ontologias, Gene ontology (ASHBURNER et al., 2000), e vias de sinalização, KEGG pathway (KANEHISA et al., 2017), foram realizadas utilizando DAVIDtools (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>). Análises de GSEA e GSVA foram realizadas com o pacote RGSEA (MA, 2018) e GSVA (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2013). Os gráficos foram produzidos utilizando diferentes pacotes da linguagem como ggplot2 (WICKHAM; WINSTON, 2019), ComplexHeatmap (GU; EILS; SCHLESNER, 2016), circlize (GU et al., 2014), VennDiagram (CHEN; BOUTROS, 2011) e RColorBrewer (NEUWIRTH, 2011). Abaixo seguem os procedimentos realizados pelos autores do array:

Resumidamente, os autores utilizaram a linhagem celular MG-63 (fibroblastos de osteossarcoma humano) cultivada em meio consistindo de meio essencial alfa-mínimo (alfa-MEM, Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal, ácido ascórbico 0,2 mM (Asap, Life Technologies), 2 mM de L-glutamina (Life Technologies), 100 U/mL de penicilina e 100 pg/mL de estreptomicina. O meio foi renovado duas vezes por semana e todas as experiências com material celular foram realizadas a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram semeadas por 150 µl de material previamente humedecido com meio, com densidade de 2*10⁶ células/mL e, após quatro horas (tempo de ligação), foi adicionado meio adicional ao poço. A lista completa de biomateriais utilizados neste documento está contida na íntegra na Tabela 1. Após 48 h, as células foram recolhidas seguindo as instruções fornecidas no kit de isolamento de RNA Nucleospin (Macherey-Nagel). A partir de 275 ng de RNA, o cRNA foi sintetizado utilizando o kit de amplificação de RNA Illumina TotalPrep (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante. Tanto a qualidade do RNA como do cRNA foram verificadas em um Bioanalyzer 2100 (Agilent). Microarrays foram realizados usando beadchips de expressão Illumina HT-12 v4. Resumidamente, 750 ng de cRNA foram hibridados na matriz durante a noite, após o que a matriz foi lavada e bloqueada. Então, pela adição da estreptavidina Cy-3, um sinal fluorescente foi desenvolvido. Os arrays foram escaneados em um leitor Illumina Beadarray e os valores de intensidade bruta foram

corrigidos em segundo plano no BeadStudio (Illumina). Dados normalizados por quartis foram transformados usando estabilização de variância (VSN).

Tabela 1: Materiais utilizados por Groen et al.

Nome	Material	Tipo
HAa	HA – Ts = 1150 °C	Ceramic
HAb	HA – Ts = 1250 °C	
HAc	HA – Ts = 1100 °C	
BCPa	HA/TCP (80/20) – Ts = 1150 °C	
BCPb	HA/TCP (80/20) – Ts = 1300 °C	
BCPc	HA/TCP (80/20) – Ts = 1150 °C	
BCPd	HA/TCP (70/30) – Ts = 1150 °C	
BCPe	HA/TCP (60/40) – Ts = 1150 °C	
TCPa	β TCP – Ts = 1050 °C	
TCPb	β TCP – Ts = 1100 °C	Polymer
PLA	PLA	
PLA-OCP	PLA-OCP coated	CaP coating
PLAC	PLA/nCaP (50 wt%)	Composite
PCa	PLA/nCaP (50 wt%), 0 m NaOH	
PCb	PLA/nCaP (50 wt%), 0.125 m NaOH	
PCc	PLA/nCaP (50 wt%), 0.25 m NaOH	
PCd	PLA/nCaP (50 wt%), 0.5 m NaOH	
PCe	PLA/nCaP (50 wt%), 1 m NaOH	
bECM	Decellularized trabecular bone	
DBM	Demineralized and decellularized trabecular bone	

Ti	Porous titanium	Titanium
Ti-OCP	Porous titanium-OCP coated	CaP coating
PS	Polystyrene	Polymer

3.2 SÍNTESE DOS MATERIAIS HA E TCP

As sínteses de HA e TCP foi realizada em parceria com o Prof. Gustavo Rocha de Castro, do Dep. Química e Bioquímica, IBB-UNESP e os métodos de obtenção dos materiais foram:

3.2.1 Hidroxiapatita

A reação de síntese de HA partiu dos seguintes reagentes: Ácido Fosfórico (H_3PO_4) – 0,3 M, Hidróxido de Sódio (NaOH) 1,2 M e Nitrato de Cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 0,5 M. Para um volume final de 100 ml, foi adicionado 1,765 mL de H_3PO_4 ao NaOH diluído em 50 mL de água deionizada, o valor de pH da mistura foi medido após 30 minutos, observada a estabilidade em $10,64 \pm 0,37$. O $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ também foi diluído em 50 mL de água deionizada, que foi gotejado aproximadamente 1 gota/s. A solução final foi lavada para a retirada de excessos de sais e posteriormente armazenada numa estufa a 80°C para secagem.

3.2.2 TCP

A síntese do fosfato tricálcio foi obtida a partir da reação de estado sólido, iniciada com a mistura a seco de carbonato de cálcio ($0,35 \text{ mol L}^{-1}$) e fosfato de cálcio bibásico dihidratado ($0,70 \text{ mol L}^{-1}$). A mistura foi umidificada com excesso de acetona P.A. e, posteriormente, a suspensão ficou sem agitação por 24 h. O precipitado foi seco em uma estufa a 80°C por 24 horas.

3.2.3 Calcinação dos Materiais

A hidroxiapatita após seca, foi calcinada na temperatura de 1000°C num forno tipo Mufla (marca EDG, modelo F3000) por 2 horas com rampa de 15°C/min . O material total foi dividido em três grupos, os quais foram calcinados nas temperaturas 1.100, 1.150 e 1.250°C , conforme as utilizadas do trabalho tomado como base. Por sua vez, o TCP foi calcinado da mesma forma descrita para HA, no entanto, respeitando as temperaturas de 1.050 e 1.100°C .

Para os testes de validação em culturas de células, ambos os grupos de materiais foram utilizados para avaliação da resposta biológica no contato indireto das células com o biomaterial.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA HA E TCP

3.3.1. Termogravimetria

Análise Termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas utilizando analisador térmico simultâneo (STA 449 F3 Jupiter, Netzsch). Aproximadamente 9,69 mg da amostra foi colocada em cadinho de 50 ml de alumina e as curvas TGA-DTA coletadas usando os seguintes parâmetros: faixa de temperatura, 30 - 1100°C; taxa de aquecimento, 10°C min⁻¹; e taxa de fluxo, 50 mL min⁻¹ em atmosfera de ar seco.

3.3.2 Espectroscopia na região do Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificar os grupos funcionais característicos dos materiais, a técnica de FTIR foi utilizada (spectrômetro de FTIR, Nicolet Nexus 670, Thermo, USA), 200 scans com resolução de 4 cm⁻¹ em modo de transmitância. Para esta análise, as amostras foram preparadas na forma de pastilhas com 200 mg de KBr contendo 2% de amostra.

3.3.3 Difração por Raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios-X em pó (DRX) foram coletados usando um difratômetro de bancada (MiniFlex de 6ª geração, Rigaku), empregando radiação CuK α 1 (λ = 1,5406 Å; 40 kV; 15 mA), na faixa de 5 a 80° taxa de 4° min⁻¹ e um tamanho de passo de 0,04°. As amostras em pó foram montadas em suportes para amostras de fundo zero antes da análise.

3.4 VALIDAÇÃO POR CULTIVO CELULAR

Foram cultivadas osteoblastos humanos (linhagem MG-63), os quais foram cultivados em meio DMEM, contendo antibióticos (100U/ml penicilina, 100mg/ml estreptomicina), e 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). Foram mantidas a 37°C e à atmosfera de 5% de CO₂.

Para os ensaios de contato indireto, após o subcultivo de rotina das células, estas foram lavadas com PBS, tripsinizadas, e replaqueadas em meio de cultivo enriquecidos com o biomaterial (0,1g/mL⁻¹), de acordo com a norma ISO 10993-12. Previamente, o meio, isento de soro, foi enriquecido por 24 horas com os biomateriais e, após esse tempo, foi filtrado e adicionado o soro fetal bovino. As placas foram cultivadas por 24 e 48 horas, após esse tempo foram extraídas amostras para os experimentos.

3.4.1 Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

As células foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24h de adesão, tratadas com os meios enriquecidos pelos materiais no período de 48 horas. Após o período, o meio de cultura

celular foi removido, e adicionado o MTT (1 mg mL^{-1}) por 3 horas. Posteriormente, o meio contendo MTT foi removido e $100 \mu\text{L}$ de DMSO foi adicionado para solubilização do corante azul vital formado por células viáveis. Em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplaca (leitor multi-modo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA).

3.4.2 Vermelho Neutro (VN)

O corante vermelho neutro é fracamente catiônico penetrando nas membranas celulares por difusão passiva não iônica e concentra-se nos lisossomos, onde se liga por ligações hidrofóbicas eletrostáticas aos grupos aniônicos e / ou fosfato da matriz lisossomal. O corante é então extraído das células viáveis usando uma solução de etanol acidificado.

As células MG-63 foram semeadas com os diferentes biomateriais numa placa de cultura de 96 poços. O meio vermelho neutro foi adicionado e, após 3 h de incubação a 37°C , o corante foi extraído e a captação foi quantificada em 540 nm usando um leitor de microplaca (leitor multi-modo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

3.4.3 Ensaio de Adesão Celular - Cristal Violeta

Para avaliar a influência do meio enriquecido na adesão celular, usando a abordagem do teste de cristal violeta, pode-se estimar a quantidade de células aderidas, uma vez que se trata de um corante capaz de intercalar e corar o DNA. As células, após serem cultivadas com o meio convencional, foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em microplaca de 96 poços (100×10^3 células/ml). Para cada grupo de materiais foi utilizado um grupo controle, o qual foi cultivado com o meio convencional, o meio enriquecido com os materiais foi adicionado as células e cultivado por 24 horas em condições convencionais. Após 24 h de cultivo, as células foram coradas e a adesão celular estimada pela incorporação do cristal violeta. A absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas (leitor multimodo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA), que foi utilizado para estimar o perfil de células aderentes (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a).

3.4.4 Extração de mRNA e análise por RT-qPCR

Após o tratamento por 48 horas com meio enriquecido com os materiais, as células foram coletadas e o RNA total extraído utilizando Reagente Ambion TriZOL (Life Sciences – Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e tratadas com DNase I (Invitrogen, Carls-band, CA, USA). A síntese de cDNA foi realizada com o Kit de Transcrição Reversa cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O PCR tempo real foi realizado em um total de $10 \mu\text{L}$, contendo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x ($5 \mu\text{L}$) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), $0,4 \mu\text{M}$ de cada primer, 50 ng de

cDNA e H2O livre de nuclease. Os resultados foram expressos como quantidades relativas dos transcritos usando GAPDH e 18S como genes de referência (*gene housekeeping*), usando o método do *cycle threshold* (ct). *Primers* e detalhes de corrida estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Sequências dos *primers* de expressão e condições do ciclo qPCR.

Gene	Primer	5-3' Sequência	Condições de Reação
ERK	Forward 1	AACAGGCTCTGGCCCACCCAT	95°C - 3s;
	Forward 2	CGCCCCCTCCAAACGGCTCAA	55°C - 8s;
	Reverse	GCAGCGCCTCCCTTGCTAGA	72°C - 20s
JNK	Forward 1	AAAGGTGGTGTGTTTGTCCAGGT	95°C - 3s;
	Forward 2	TGGATTTATGGTCTGTGGGGTGCA	55°C - 8s;
	Reverse	TGATGATGGATGCTGAGAGCCATTG	72°C - 20s
P38	Forward	GAGAACTGCGGTTACTTA	95°C - 3s;
	Reverse	ATGGGTCACCAGATACACAT	55°C - 8s; 72°C - 20s
P15	Forward	GGGACTAGTGGAGAAGGTGC	95°C - 3s;
	Reverse	CATCATCATGACCTGGATCGC	55°C - 8s; 72°C - 20s
CDC 25	Forward	GCACTCGGTCAGTGTTGAAG	95°C - 3s;
	Reverse	CATGGGCCTTCTCTGGATTA	55°C - 8s; 72°C - 20s
CDK2	Forward	CTTTGCTGAGATGGTGACTCG	95°C - 3s;
	Reverse	GCCTCCCAGATTCTCATGC	55°C - 8s; 72°C - 20s
CDK4	Forward	CTCTCTAGCTTGC GGCCCTG	95°C - 3s;
	Reverse	GCAGGGATACATCTCGAGGC	55°C - 8s; 72°C - 20s
CDk6	Forward	CTGCAGGGAAAGAAAAGTGCAA	95°C - 3s;
	Reverse	CAAGACTTCGGGTGCTCTGT	55°C - 8s; 72°C - 20s
P21	Forward	GCTGCCGAAGTCAGTTCCTT	95°C - 3s;
	Reverse	ATCTGTCATGCTGGTCTGCC	55°C - 8s; 72°C - 20s
GAPDH	Forward	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	95°C - 3s;
	Reverse	TGCCTGCTTC ACCACCTTCT	55°C - 8s; 72°C - 20s
Osterix (OTX)	Forward	CCAGGCAACACTCCTACTCC	95°C - 3s;
	Reverse	GCCTTGCCATACACCTTGC	55°C - 8s; 72°C - 20s
RUNX2	Forward	CCG TCC ATC CAC TCT ACC AC	95°C - 3s;

	Reverse	ATG AAA TGC TTG GGA ACT GC	55°C - 8s; 72°C - 20s
OTC	Forward	ATG AGA GCC CTC ACA CTC CTC	95°C - 3s;
	Reverse	GCC GTA GAA GCG CCG ATA GGC	55°C - 8s; 72°C - 20s
P15	Forward	TACAGGAGTCTCCGTTGGC	95°C - 3s;
	Reverse	GTGAGAGTGGCAGGGTCTG	55°C - 8s; 72°C - 20s
RANKL	Forward	AGGGACTCCATCCAAGAAGG	95°C - 3s;
	Reverse	GCAGTTTCTGTTCTATTATTCAGGTG	55°C - 8s; 72°C - 20s
18S	Forward	CGGACAGGATTGACAGATTGATAGC	95°C - 3s;
	Reverse	TGCCAGAGTCTCGTTCGTTATCG	55°C - 8s; 72°C - 20s

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, EUA), pela análise de variância (unidirecional, ANOVA) e com o pós-teste de correção de Bonferroni ou análise não paramétrica. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Bioinformática

O pacote *Limma* do R foi utilizado para a obtenção da expressão diferencial de células MG-63 cultivadas sobre os seguintes biomateriais: hidroxiapatita sinterizada a 1100 ° C (HA 1100), hidroxiapatita sinterizada a 1150 ° C (HA 1150), hidroxiapatita sinterizada a 1250 ° C (HA 1250), tricálcio fosfato sinterizado a 1050 ° C, (TCP 1050) tricálcio fosfato sinterizado a 1100 ° C (TCP 1100) e poliestireno (controle). Os parâmetros utilizados foram $p\text{-valor} \leq 0,01$ e $\log_2(|\text{Fold change}|) \geq 1$. Para o grupo HA 1100 foram obtidos 259 genes diferencialmente expressos, 73 para o grupo HA 1150, 72 para o grupo HA 1250, o grupo TCP 1050 resultou em 3119 e 505 genes para o grupo TCP 1100. A **Figura 8** contém o diagrama de *Venn* dos genes diferencialmente expressos para o TCP, a **Figura 9** para a HA e a **Figura 10** o diagrama ilustrando os 5 grupos.

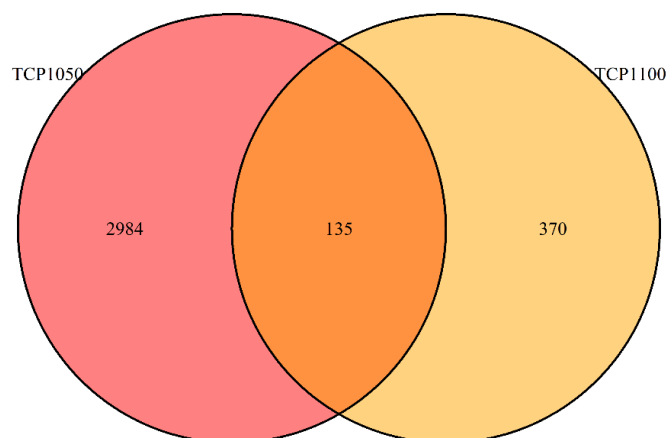


Figura 8: Genes diferencialmente expressos para o TCP, 2984 para o material sinterizado a 1050°C e 370 para o de 1100°C, e 135 comuns aos dois

A análise GSVA foi realizada para as coleções das assinaturas moleculares citadas anteriormente. O Heatmap (mapa de calor) mostra os genes (agrupados) nos subconjuntos das linhas. Em um mapa de calor, os valores de expressão são representados como cores, onde o intervalo de cores (vermelho, rosa, azul claro, azul escuro) mostra o intervalo de valores de expressão (alto, moderado, baixo, mais baixo). O pacote GSVA (HÄNZELMANN; CASTELO; GUINNEY, 2013) foi utilizado para os cálculos dos scores, estes vão de -2 a 2, sendo a expressão da assinatura definida por esse escore. O GSEA utilizando do mesmo score torna visível o quanto os conjuntos de genes são expressos em cada assinatura.

A posição dos heatmaps em cada tipo de conjunto é relacionada com a semelhança entre as assinaturas de cada material com o padrão (poliestireno), quanto mais semelhante ao padrão mais próximo estará o material. Esta semelhança é mostrada por meio de dendrogramas, estes que ilustram as linhas ligadas segundo os níveis de similaridade, neste tipo de gráfico, por exemplo, as assinaturas de HA-1250 ficaram posicionadas para todos os conjuntos o mais próximo do controle, no grupo TCP houve variações, assim ilustrando a diferença entre os materiais mesmo no próprio grupo.

Com o uso de marcadores conhecidos e utilizados pelo grupo para funções biológicas de interesse (**Tabela 3**), na **Figura 11** o heatmap para os materiais foi realizado utilizando marcadores para adesão, diferenciação, inflamação e viabilidade:

Tabela 3: Marcadores para funções biológicas

Adhesion	Viability	Differentiation	Inflammation
PTK2	PTEN	RUNX2	IL1R
SRC	IRS	ALPL	IL1B
ITGB1	PI3K	BMP2	IL6
PXN	AKT	BMP7	IL10
CFL1	mTOR	SPP1	IL13
RAC1	IGFR	TNFRSF11B	IL18
RHOC	Rheb	BGLAP	IL33
RHOA	ERK	SP7	NFKB2
CSK	RASA1	IBSP	NLRP3
	RAF	TNFSF11	PYCARD
	MEK	SMAD2	TNFA
		SMAD3	CASP1

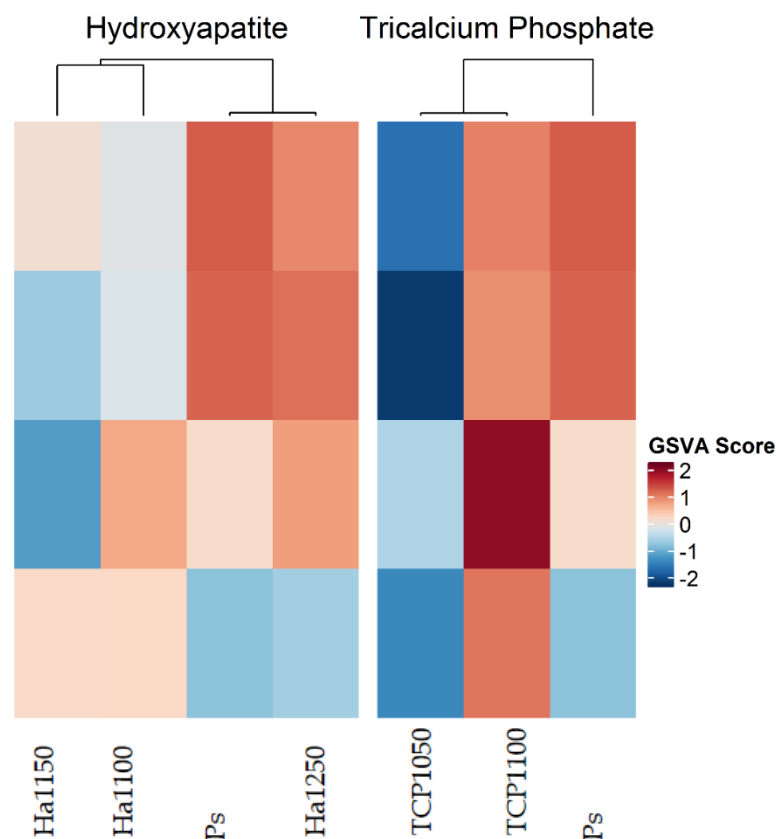


Figura 11: Heatmap para os marcadores: adesão, diferenciação, inflamação e viabilidade respectivamente, a proximidade ao Ps indica uma maior similaridade nas expressões dos conjuntos de genes, quanto mais próximo mais similar.

Para as assinaturas disponíveis a partir do banco de dados MsigDB, as quais envolvem diferentes processos biológicos característicos para cada uma delas estão na sequência, a **Figura 12** contém o heatmap para as assinaturas C1, que como descrita anteriormente é relacionada ao conjunto de genes posicionais. O heatmap ilustra a expressão de cada conjunto para os diferentes materiais, comparando-os com o poliestireno, quanto mais similar a expressão com o padrão, mais próximo o material estará dele.

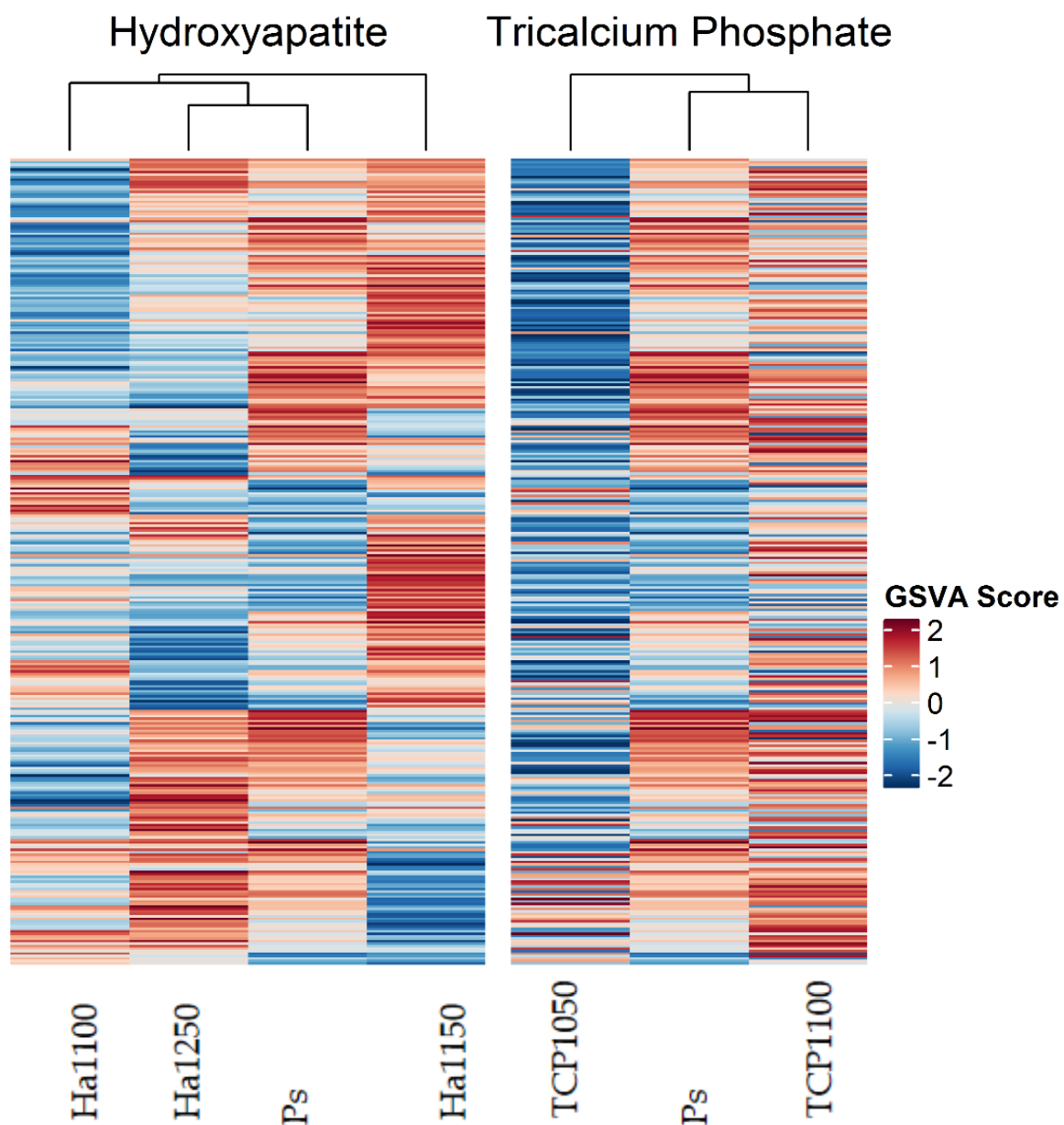


Figura 12: Assinaturas C1: conjuntos de genes posicionais, indicando uma maior similaridade entre o HA-1250 e o Ps, o HA-1150 apresentou a menor similaridade, no grupo TCP o tratado a 1100 apresentou maior similaridade que o tratado a 1050.

Os conjuntos de genes curados C2, é uma reunião de dados selecionados de diferentes fontes, a **Figura 13** ilustra o heatmap para esta assinatura.

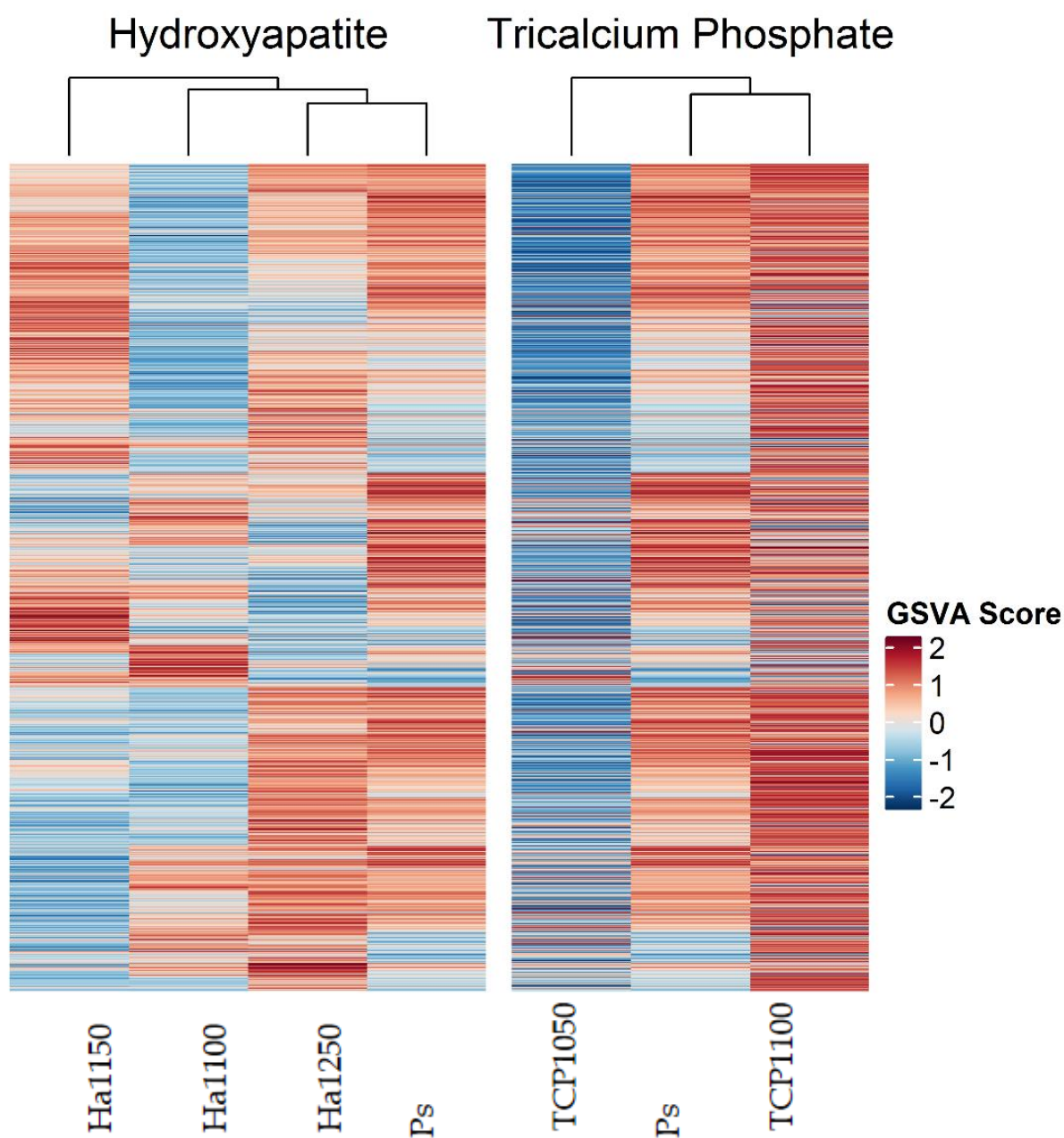


Figura 13: Assinaturas C2: conjuntos de genes curados, HA-1150 apresentou a maior diferença que os outros dois tratamentos térmicos, HA-1250 apresentou a maior similaridade. No grupo TCP o tratado a 1100 foi o mais similar entre os dois tratamentos.

A **Figura 14** representa o heatmap para o conjunto de genes de Motif, C3. Os conjuntos consistem em genes agrupados por motivos de sequência curta que eles compartilham em suas regiões codificadoras não proteicas, assim sendo possível ligar as mudanças em um experimento de perfil de expressão a um elemento regulatório cis.

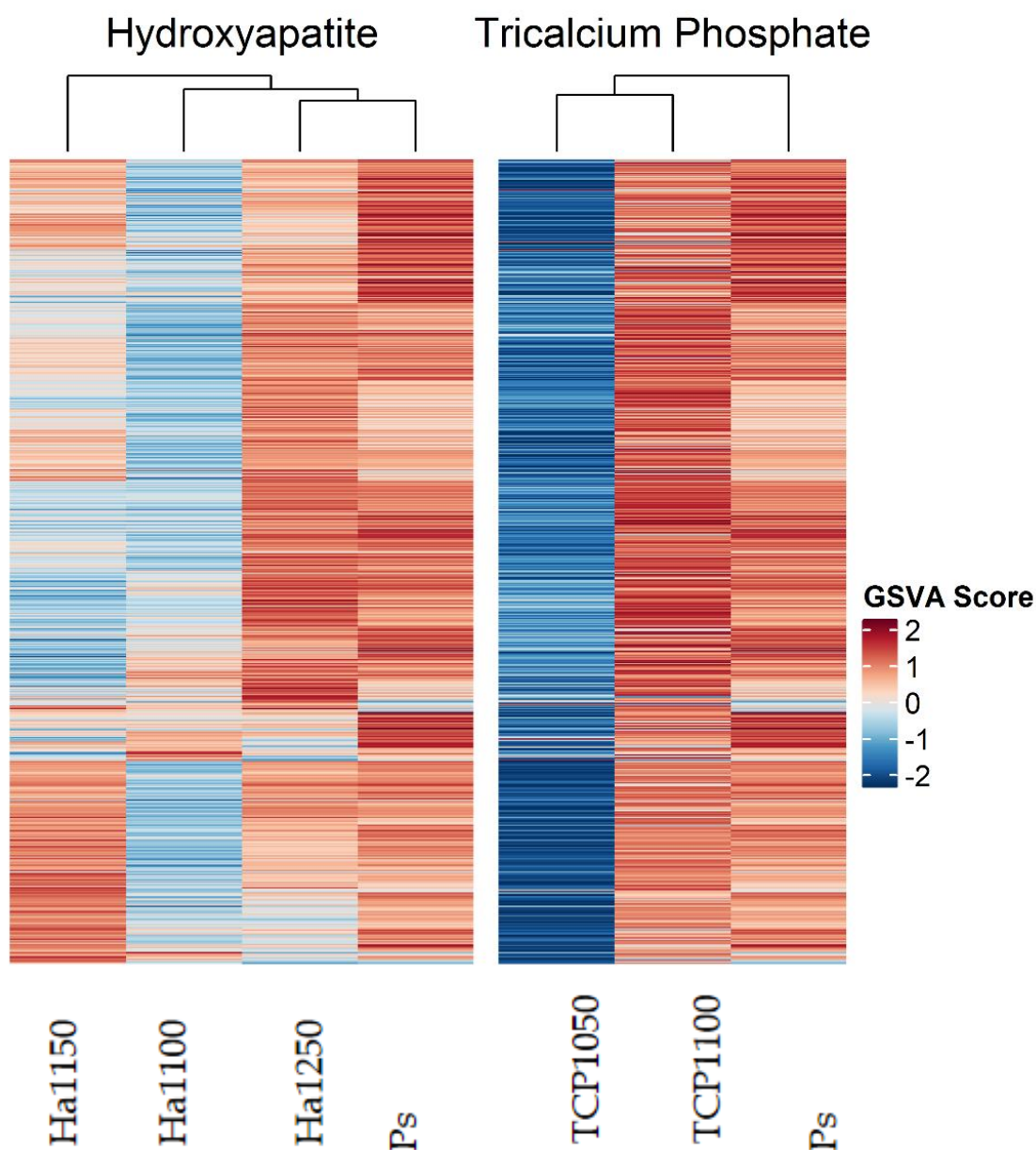


Figura 14: Assinaturas C3: Conjuntos de genes de Motif: representando alvos potenciais de regulação por fatores de transcrição ou microRNAs, no grupo HA, o tratamento menos similar foi o 1150, seguido do 1100, o HA-1250 foi o que mais se assemelhou. No grupo TCP o tratado a 1100 apresentou mais similaridade ao Ps.

A **Figura 15** ilustra o heatmap da assinatura C4, envolvendo o conjunto de genes computacionais, esta assinatura envolve genes relacionados a partir de coleções de dados de microarray relacionados ao câncer.

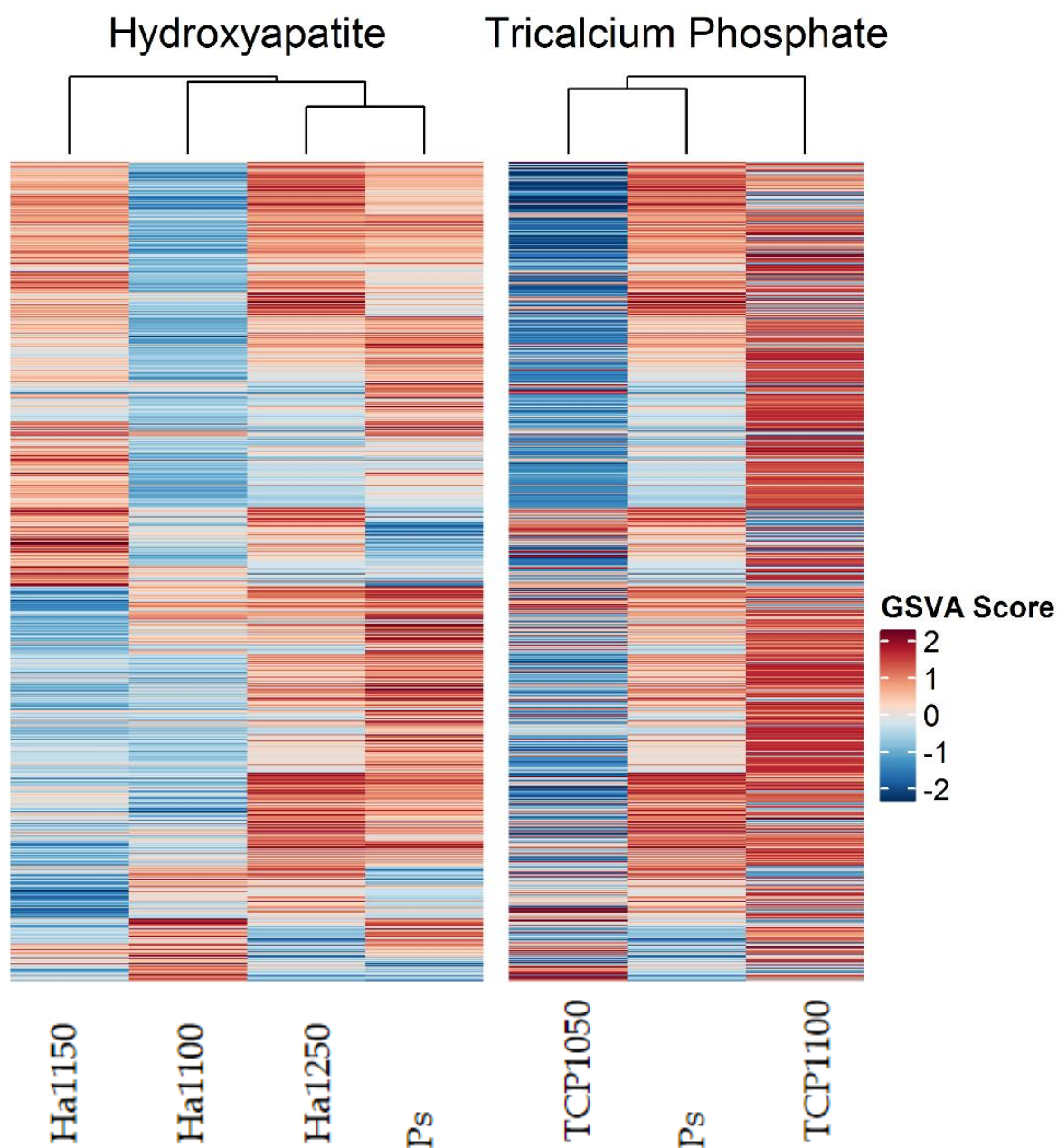


Figura 15: Assinaturas C4: conjuntos de genes computacionais. No grupo HA, o tratamento a 1150 foi o menos similar ao Ps, o tratamento a 1250 foi o mais similar ao padrão, pelo posicionamento é possível observar uma maior similaridade entre a HA-1250 e HA-1100. No grupo TCP o tratado a 1050 foi mais similar, é visualizado a diferença entre os dois tratamentos.

A **Figura 16** ilustra o heatmap da assinatura C5, do conjunto de genes GO, estes que ilustram a relação de um produto genético com os genes que dão origem a este, visto que um produto genético pode estar associado a mais de um GO, como processo biológico, componente celular ou função molecular.

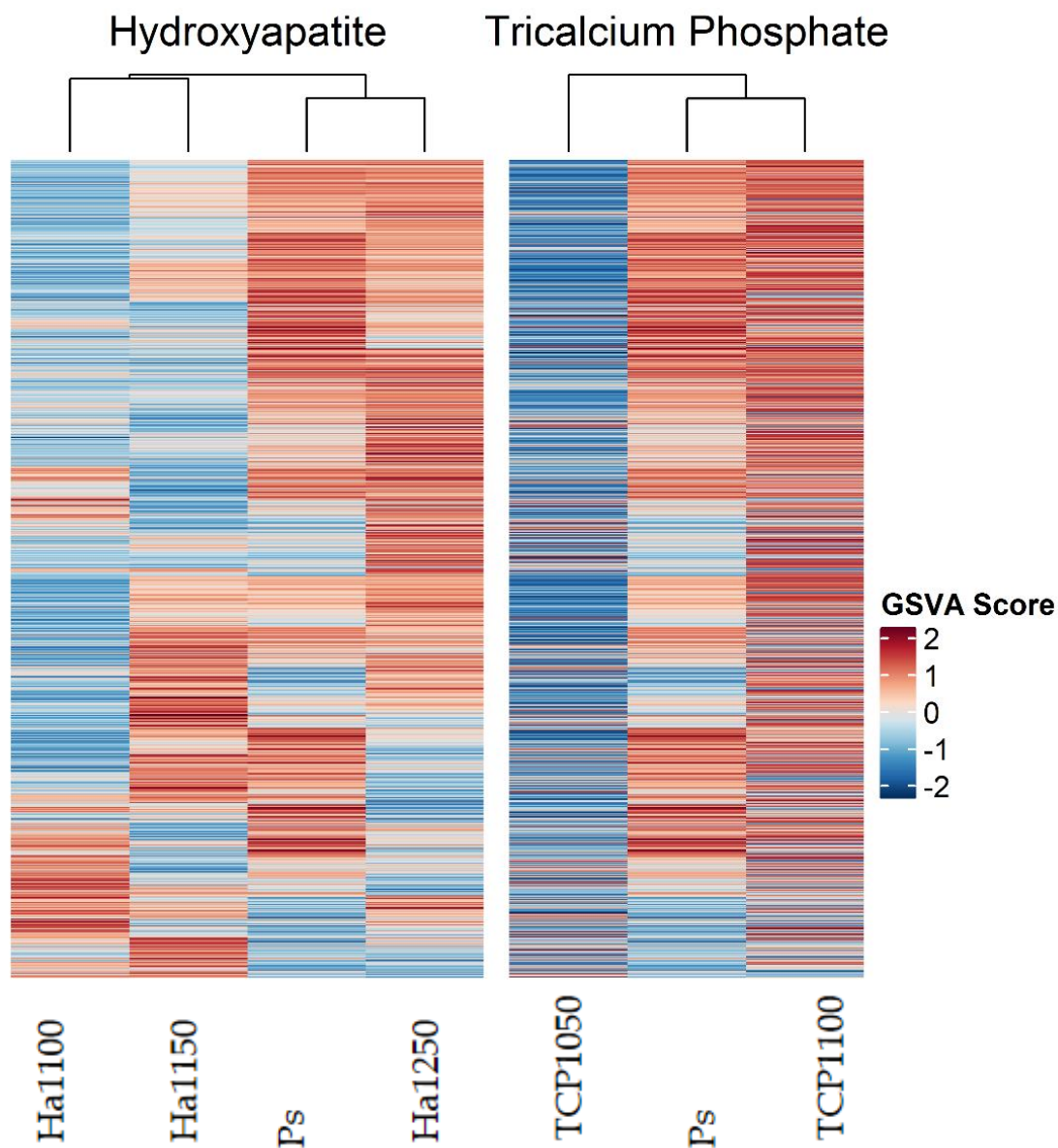


Figura 16: Assinaturas Coleção C5: Conjuntos de genes Gene Ontology, nesta assinatura no grupo HA, o tratamento a 1250 foi o mais similar, há uma maior similaridade entre os tratamentos 1100 e 1150 do que com o padrão. No grupo TCP o tratamento 1100 foi o mais similar, pelo posicionamento destes é possível observar a diferença entre os materiais.

O conjunto C6 representa assinaturas oncogênicas, a **Figura 17** representa o heatmap deste conjunto, os dados foram gerados a partir de dados de microarranjos de banco de dados, representando assinaturas de vias celulares que geralmente estão desreguladas em diferentes tipos de câncer.

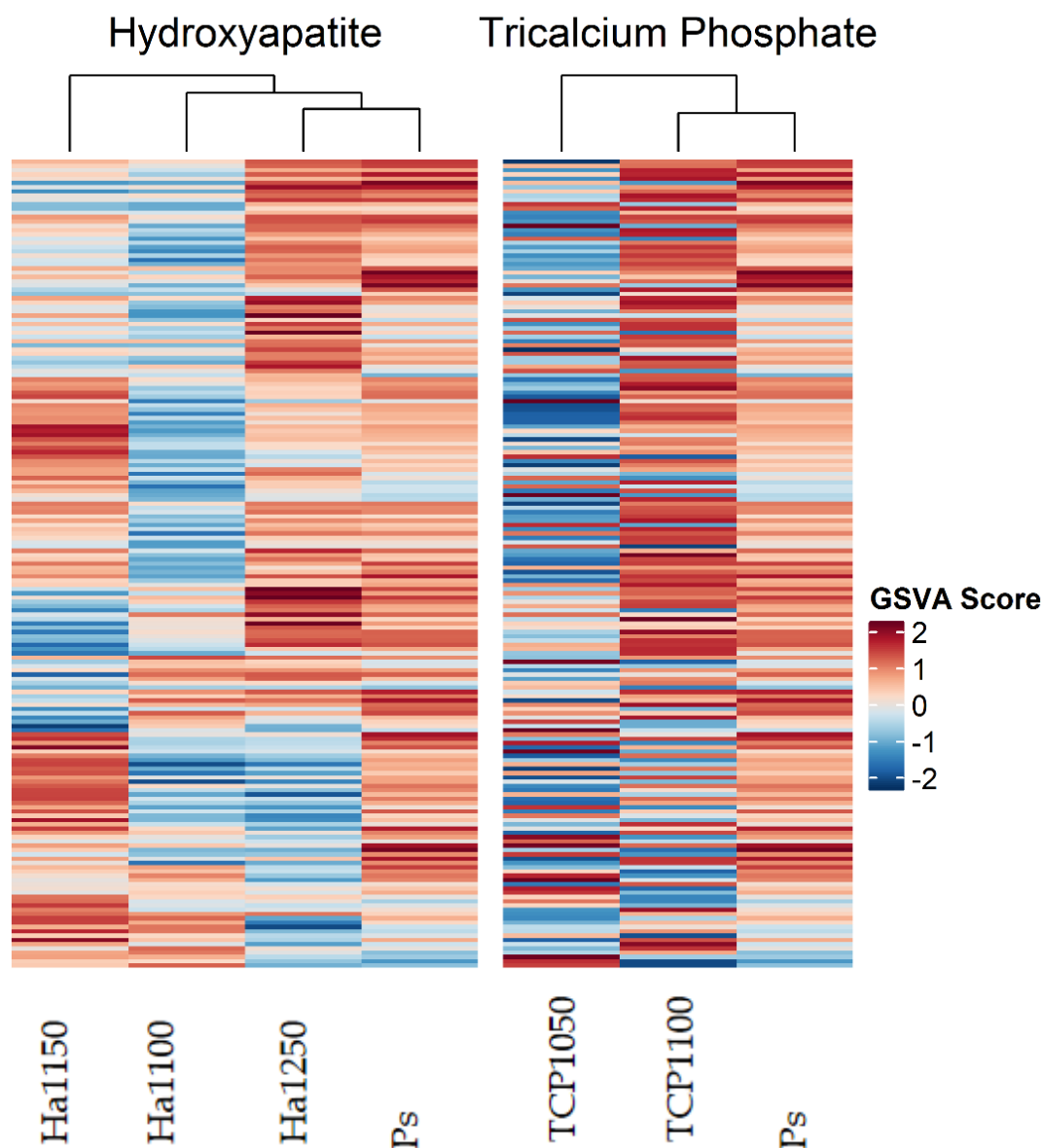


Figura 17: C6: Assinaturas Oncogênicas: conjuntos de genes que representam assinaturas de vias celulares frequentemente desreguladas no câncer, no grupo HA, os materiais apresentam diferenças entre eles, o mais similar ao Ps é o tratamento a 1250. No grupo TCP é possível visualizar que eles são similares, porém o TCP 1100 apresenta uma maior similaridade com o Ps.

O heatmap (**Figura 18**) gerado para as assinaturas imunológicas, estes foram gerados a partir de dados com estudos com imunologia de humanos e camundongos.

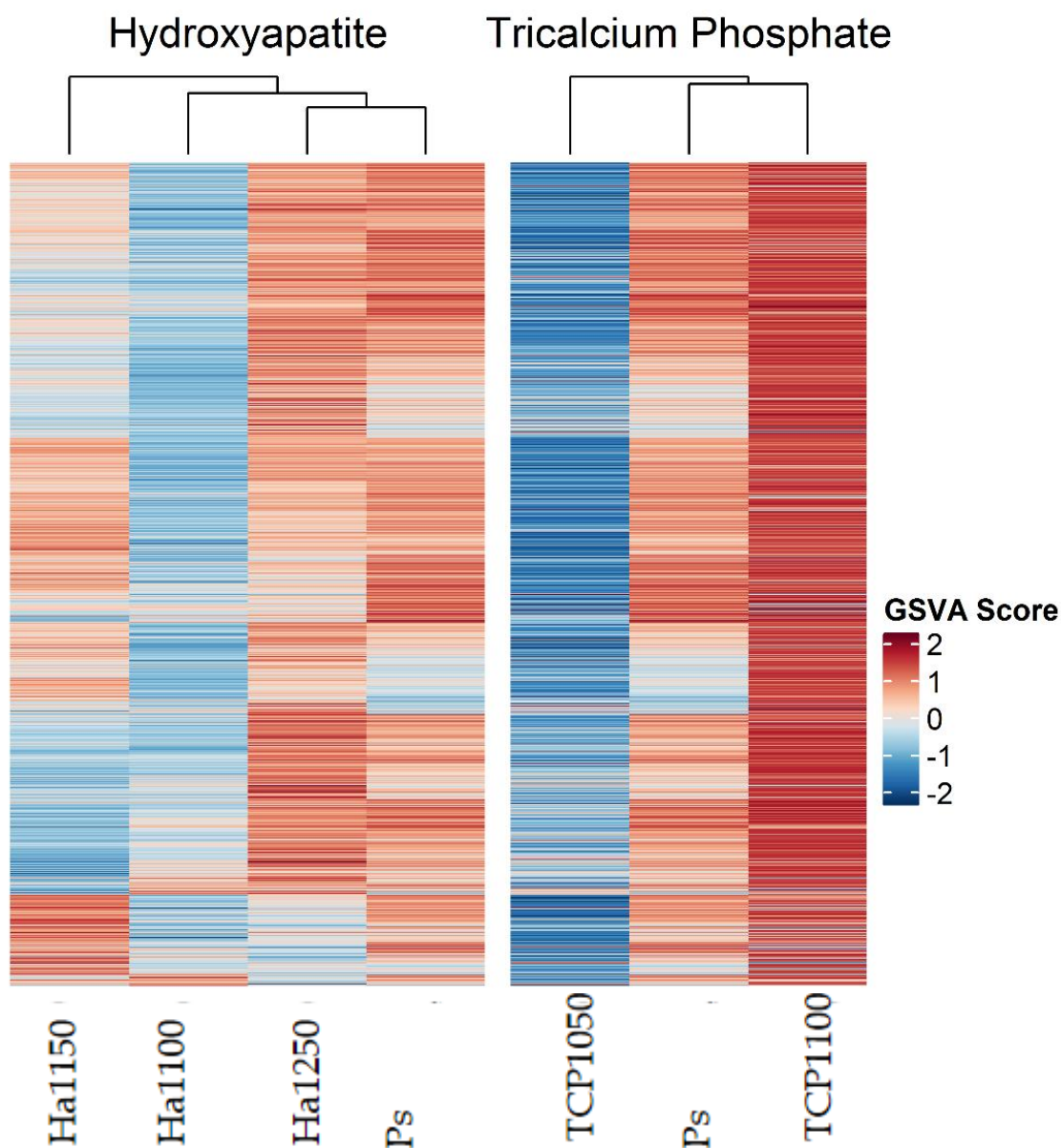


Figura 18: C7: assinaturas imunológicas, a posição da HA-1250 próxima ao Ps indica a maior similaridade com o controle, seguido da HA-1100. No tratamento TCP, o mais similar foi o TCP 1100 ao controle, a partir da expressão dos conjuntos de genes é possível visualizar a diferença entre os materiais, visto que um tem expressões positivas e o outro negativas.

A **Figura 19** representa o heatmap gerado para a coleção H ou conjuntos de genes de marcação Hallmark, este conjunto de genes soma cerca de 50 conjuntos, representando estados ou processos biológicos, estes que podem ser acessados no banco de dados MSigDB.

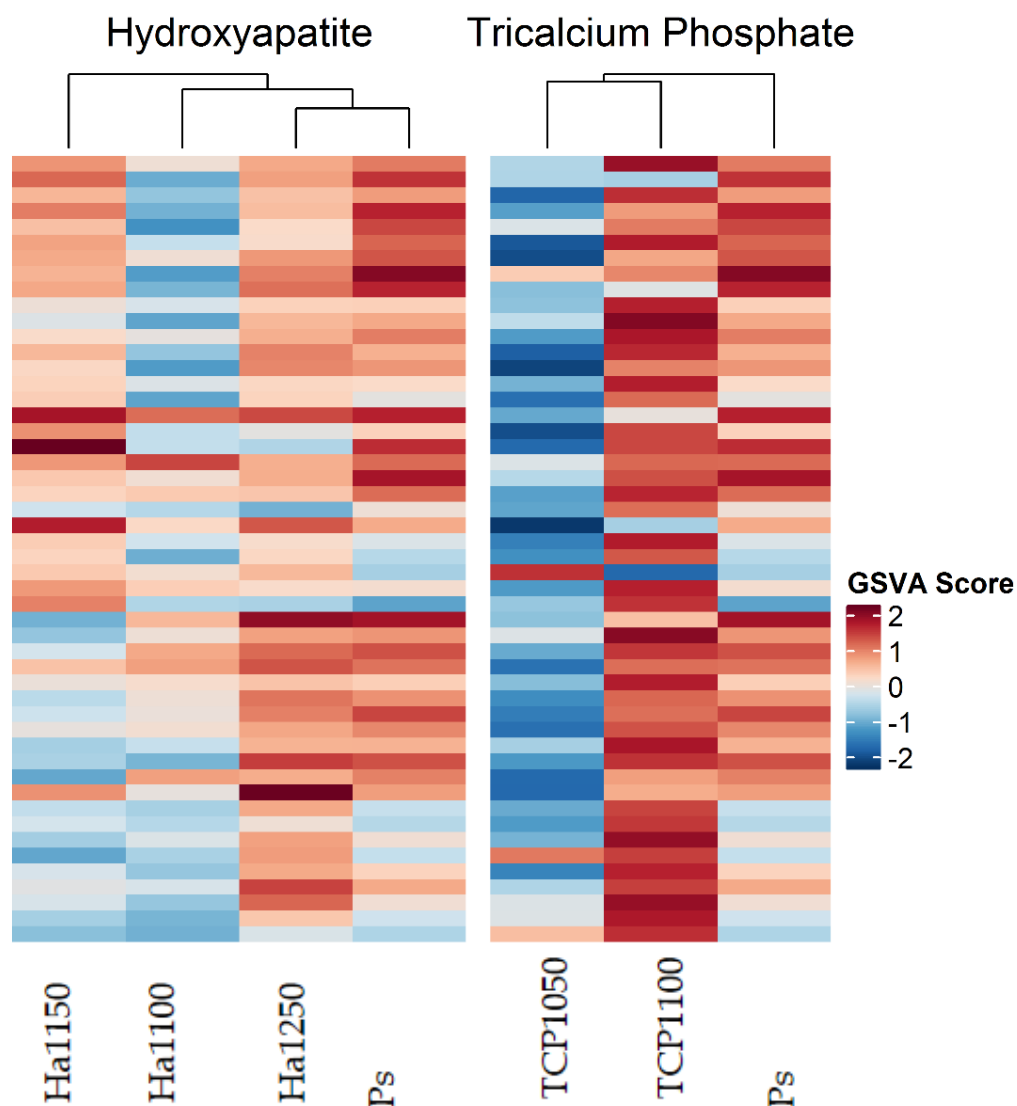


Figura 19: Coleção H: conjuntos de genes de marcação (Hallmark), no grupo HA é indicada a diferença entre os materiais e a maior similaridade entre o HA-1250 e o Ps. No grupo TCP é apresentado uma maior similaridade entre os tratamentos e do tratamento a 1100 com o controle.

4.2 Caracterização dos Materiais

4.2.1 TGA

Pela análise do TGA foram encontradas três variações de massa: em 300°C (redução de 3,66%), entre 500 e 590°C (redução de 8,57%) e entre 640 e 750°C (redução de 25,72 %). Análise térmica diferencial retornou quatro picos endotérmicos: em 305°C (0,559 $\mu\text{V/mg}$), em 584°C (1,878 $\mu\text{V/mg}$), em 678°C (1,962 $\mu\text{V/mg}$) e em 752°C (1,405 $\mu\text{V/mg}$).

A partir destes resultados a hidroxiapatita foi calcinada nas temperaturas em destaque **Figura 20**, assim observando mudanças na massa e em características do material na amostra.

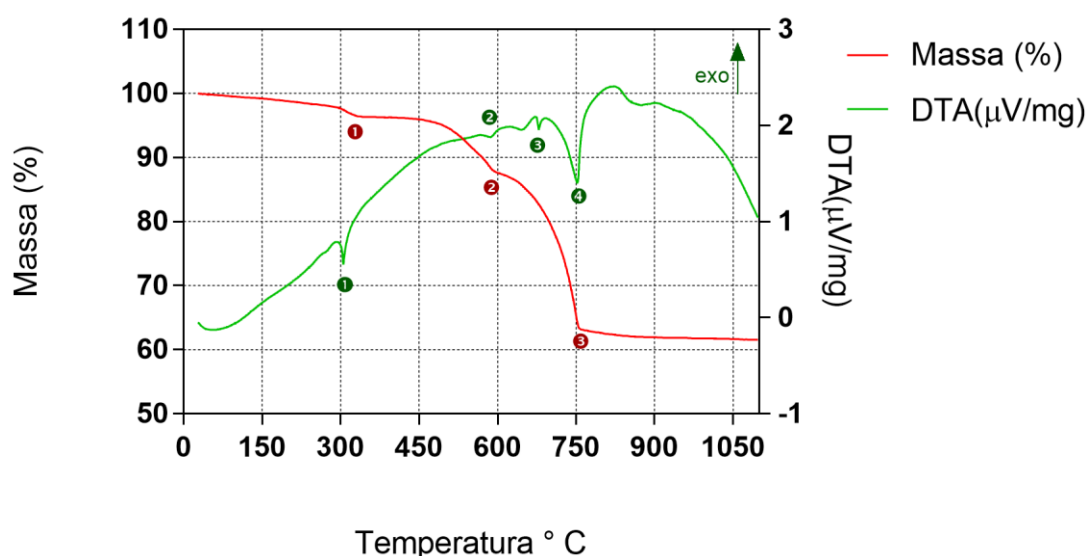


Figura 20: Gráfico do TGA para hidroxiapatita, em verde representando a variação térmica diferencial e em vermelho a Termogravimetria, em 1 temos a evaporação da água adsorvida, 2 condensação dos grupos $-\text{OH}$ estruturais da HA e em 3 decomposição do material para posterior formação de outras fases de fosfatos de cálcio.

4.2.2 FTIR

A análise do espectro de FTIR da HA (**Figura 21**) demonstrou a presença de bandas de fosfatos nas regiões de $1100 - 1000 \text{ cm}^{-1}$ e $600 - 550 \text{ cm}^{-1}$. Foi observado entre as bandas 560 e 605 cm^{-1} a presença de deformação tripla degenerada de ligações O-P-O de grupos fosfatos, e em 632 cm^{-1} ao modo do tipo rotacional da ligação $-\text{OH}$ livre (GHEISARI; KARAMIAN; ABDELLAHI, 2015; LUKIĆ et al., 2011; TANAKA et al., 1999). Em algumas amostras foram identificados bandas em 3428 cm^{-1} referente a H_2O adsorvida (modo estiramento), em 1640 cm^{-1} (modo de deformação) e em 3572 cm^{-1} ($-\text{OH}$ livre), às vibrações de estiramento de grupos OH presentes na HA podem ser provenientes de água fisissorvida sobre a superfície do material. A banda presente na região de 1050 cm^{-1} correspondeu à deformação assimétrica dos grupos fosfatos

(PO_4^{3-}). Sobre o fosfato também se pode destacar a banda em 611 cm^{-1} referente à deformação assimétrica P-O. A ausência de bandas em 680 , 710 e 745 cm^{-1} e banda de intensidade forte em 3540 cm^{-1} descartam formação de HA rica em Ca e a ausência de bandas em 610 - 615 , 800 , 1102 e 1145 cm^{-1} descartam a formação de HA deficiente em Ca (GHEISARI; KARAMIAN; ABDELLAHI, 2015; TANAKA et al., 1999).

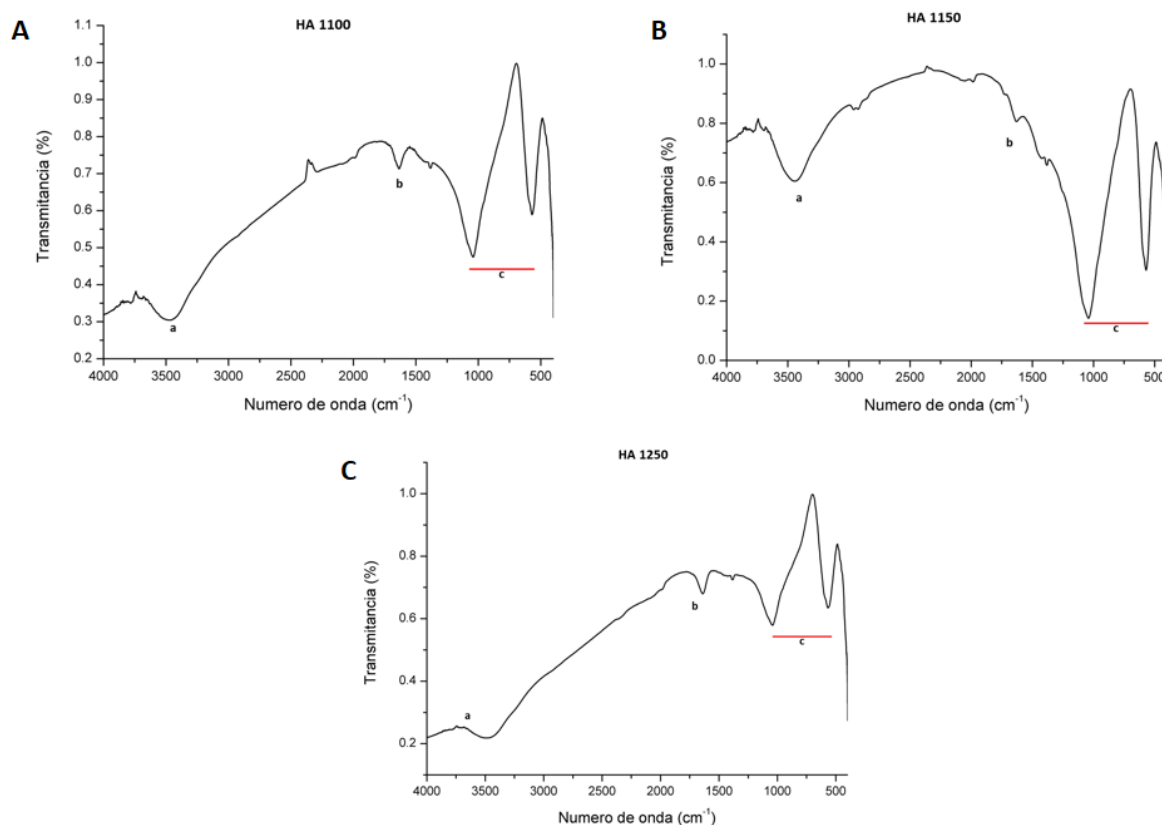


Figura 21: Espectro do FTIR da HA, **a** banda referente a H_2O adsorvida, **b** banda referente a água (modo estiramento) e **c** bandas de fosfatos nas regiões de $1100 - 1000\text{ cm}^{-1}$ e $600 - 550\text{ cm}^{-1}$

As amostras de fosfato tricálcio (**Figura 22**) apresentaram bandas relacionadas com fosfatos nas regiões de $1100 - 1000\text{ cm}^{-1}$ e $600 - 550\text{ cm}^{-1}$, ainda em 725 cm^{-1} presença de P-O-P, possivelmente por associação de tetraedros de PO_4^{3-} em dímeros HPO_4^{2-} por consequência da interação de moléculas de água na estrutura. O βTCP é caracterizado pela presença de uma banda larga entre 900 e 1200 cm^{-1} , também é possível descartar a formação de αTCP pela ausência de banda entre 460 e 740 cm^{-1} , nem como banda isolada em $\sim 600\text{ cm}^{-1}$ (GHEISARI; KARAMIAN; ABDELLAHI, 2015).

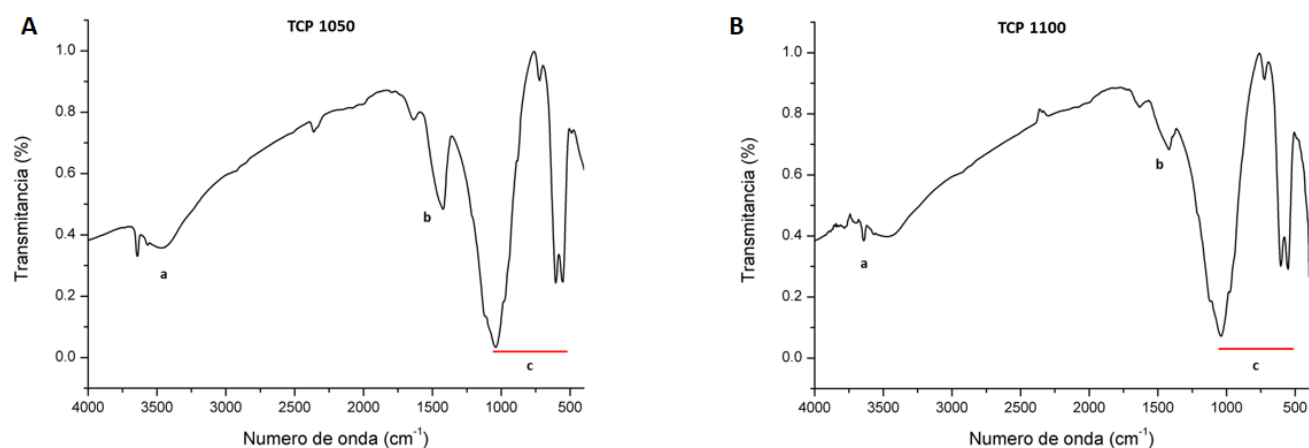


Figura 22: Espectro do FTIR do **A.**TCP 1050 e **B.** TCP 1100, **a** presença de água adsorvida, **b** presença de CO₂, e **c** bandas de fosfatos foram observados nas regiões de 1100 – 1000 cm⁻¹ e 600 – 550 cm⁻¹.

4.2.3 DRX

A análise por difração de raios-x retornou o padrão cristalográfico e picos correspondentes de HA e β -TCP de acordo com a base de dados do ICDD (Centro Internacional para Dados de Difração). Na figura 23 pela difratometria de raios X, sobre as amostras de HA revelou os picos representativos da fase hidroxiapatita como plano principal de difração podemos observar os picos referentes ao fosfato de cálcio difratogramas (LUKIĆ et al., 2011; TANAKA et al., 1999). Na figura 24 podemos observar os picos referentes a fase β TCP como plano principal. Utilizando autores como Lukic 2011 e Tanaka 1999, podemos relacionar os picos encontrados com os da literatura, algumas variações nos difratograma podem ocorrer devido a erros sistemáticos, variações na tensão, filtro e na síntese. Por conta dos agentes utilizados algumas diferenças são apresentadas em relação com a literatura, porém a presença dos picos de padrões semelhantes podem ser utilizadas para validar o material (DALLABRIDA et al., 2018; LUKIĆ et al., 2011; RUJITANAPANICH; KUMPAPAN; WANJANOI, 2014; TANAKA et al., 1999).

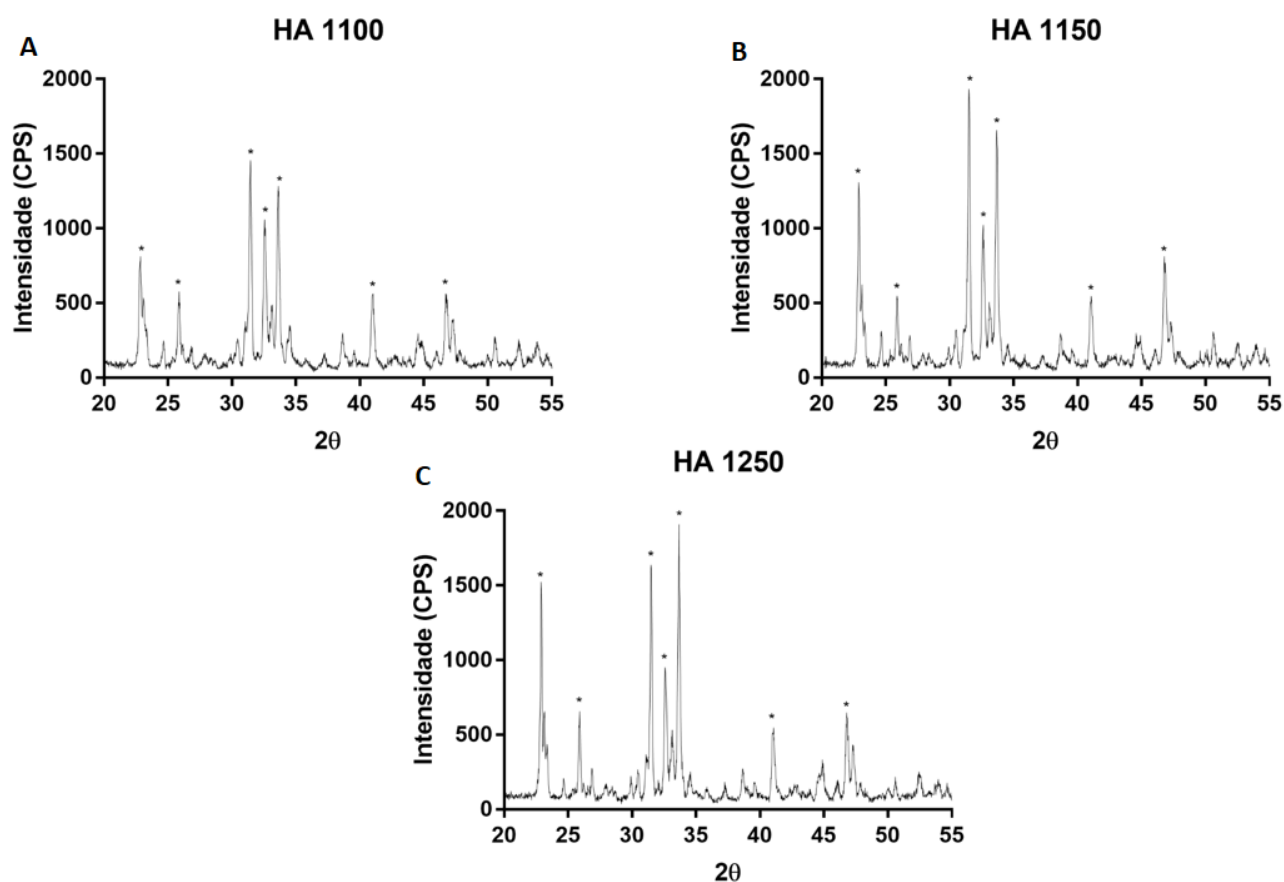


Figura 23: Difratoograma das amostras de HA calcinadas a 1100, 1150 e 1250°C, sendo possível observar os picos característicos, permitindo relacionar os materiais com a literatura, os picos representativos da fase hidroxiapatita (HA) estequiometria na composição $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ como plano principal de difração.

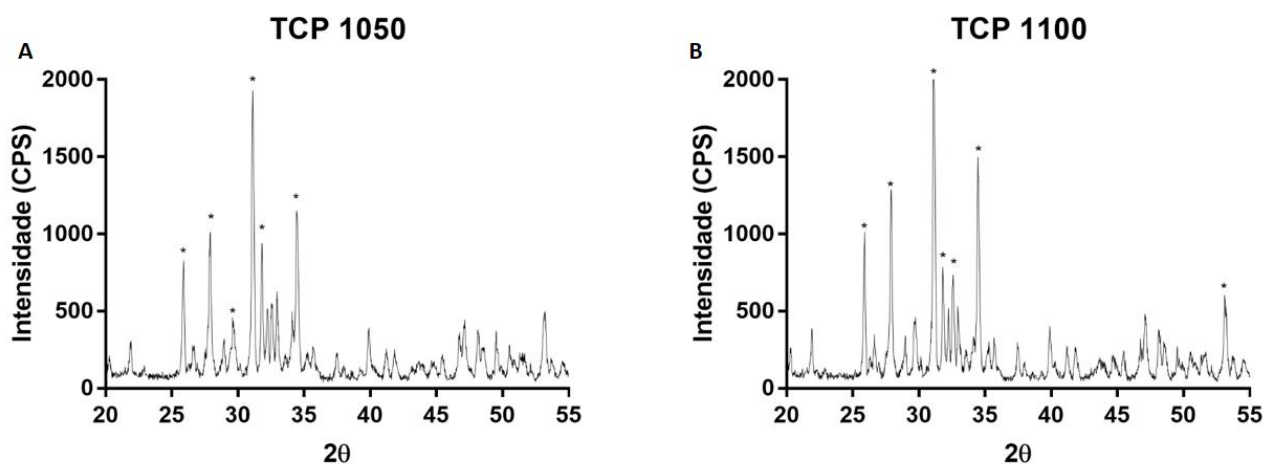


Figura 24: Difratoograma do TCP, sendo possível observar os picos representativos da fase fosfato tricálcico- β na composição $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ com plano principal de difração.

4.3 Cultivo Celular

4.3.1 MTT E VERMELHO NEUTRO

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular. O gráfico (**Figura 25**) demonstra a relação linear entre o número de células e a absorbância. A quantidade de corante retido é proporcional ao número de células viáveis. O ensaio quantifica a viabilidade celular e pode ser usado para medir a replicação celular, efeitos citostáticos ou morte celular, dependendo da densidade da semeadura. O gráfico (**Figura 25**) ilustra que não houve diferença significativa entre os grupos, quando as células foram desafiadas pelos diferentes biomateriais avaliados nesse estudo.

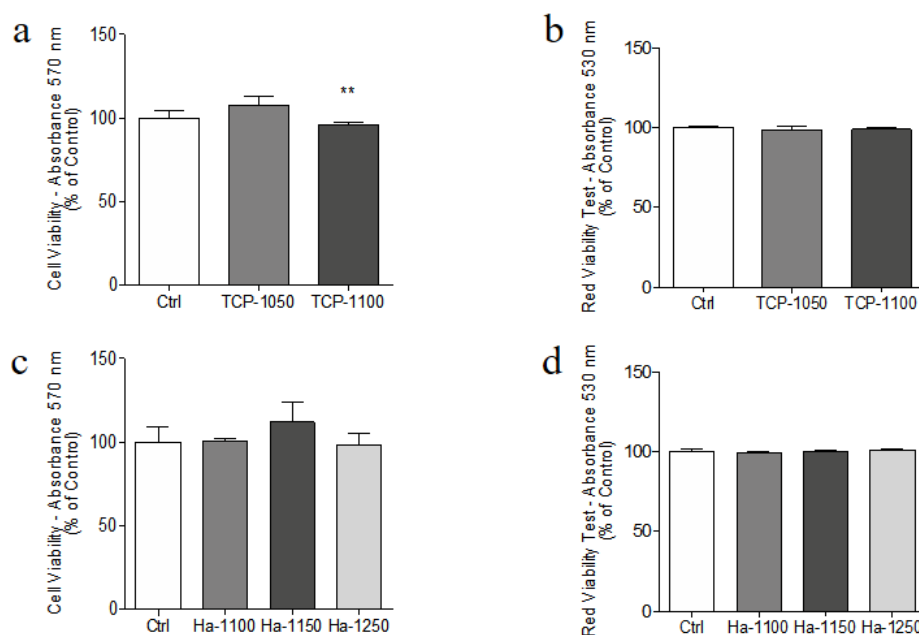


Figura 25: Efeito da viabilidade celular comparada por duas metodologias. Após 24 horas de condicionamento o meio foi utilizado para tratar MG63 por mais 24 horas. Após esse período as células foram avaliadas quanto a viabilidade por incorporação do sal de MTT (**a, b**) e por marcação de vermelho neutro (**c, d**). Os dados foram normalizados pela porcentagem do controle com n = 6. **p<0.0017: Diferença estatística quando comparado ao controle.

4.3.3 CRISTAL VIOLETA

Com o objetivo de avaliar a influência do meio condicionado na adesão das células, as células foram coradas pelo método de cristal violeta. A **Figura 26** mostra que há influência significativa do meio condicionado nos materiais em mecanismos envolvidos com adesão celular, sobretudo àqueles desenvolvidos pelo HA.

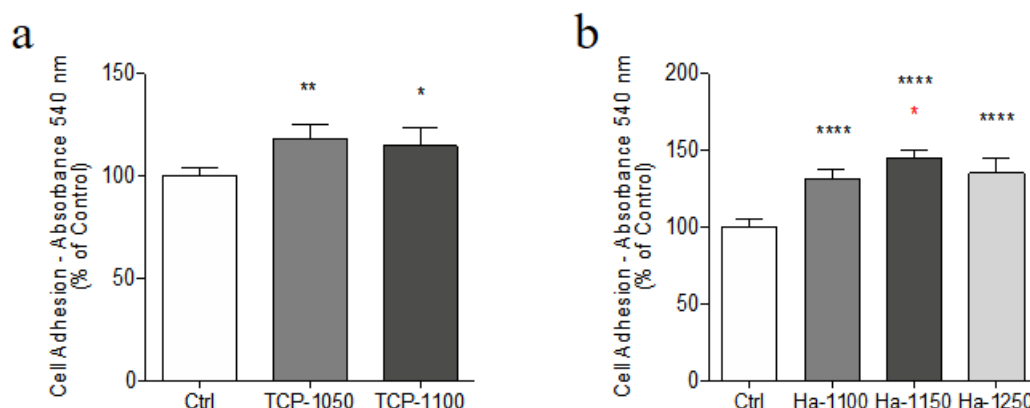


Figura 26: Perfil de adesão celular de MG63 submetidas ao contato com TCP ou Ha. Após 24 horas de condicionamento do meio de cultivo, o mesmo foi coletado e utilizado para ressuspender as células MG63 que foram avaliadas quanto ao perfil de adesão por incorporação de Cristal Violeta. As células receberam o meio condicionado por TCP **(a)** e por Ha **(b)** nas diferentes temperaturas de síntese. Os experimentos representam $n = 6$.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.0017$, **** $p < 0.0001$: Diferença estatística quando comparado ao controle.

* $p < 0.05$: Diferença estatística quando comparado HA-1100.

4.4.RT-qPCR

Com o intuito de investigar alguns mecanismos moleculares da célula osteoblástica (MG63) em resposta aos tratamentos indiretos com os diferentes tipos de biomateriais, foram realizados ensaios de expressão gênica através da técnica de PCR quantitativo em tempo real, de marcadores gênicos envolvidos com fenótipos celulares de interesse na viabilidade celular em resposta aos materiais testados. Assim, o perfil de expressão gênica envolvidos com o ciclo e proliferação celulares foi avaliado e diferenças significantes foram observadas na expressão dos genes CDKs (**Figura 27**), principalmente o gene CDK6 com um aumento significativo nos grupos TCP-1100, HA-1100, HA-1150 e HA-1250 (**Figura 27c,f**), ocorrendo neste último uma diferença de cerca de 70 vezes em relação ao controle. O gene CDK2, por sua vez, também demonstrou

diferença significativa no grupo HA-1250, com um aumento em sua expressão (**Figura 27d**), enquanto que o gene CDK4 não demonstrou diferenças entre os grupos tratados e o controle.

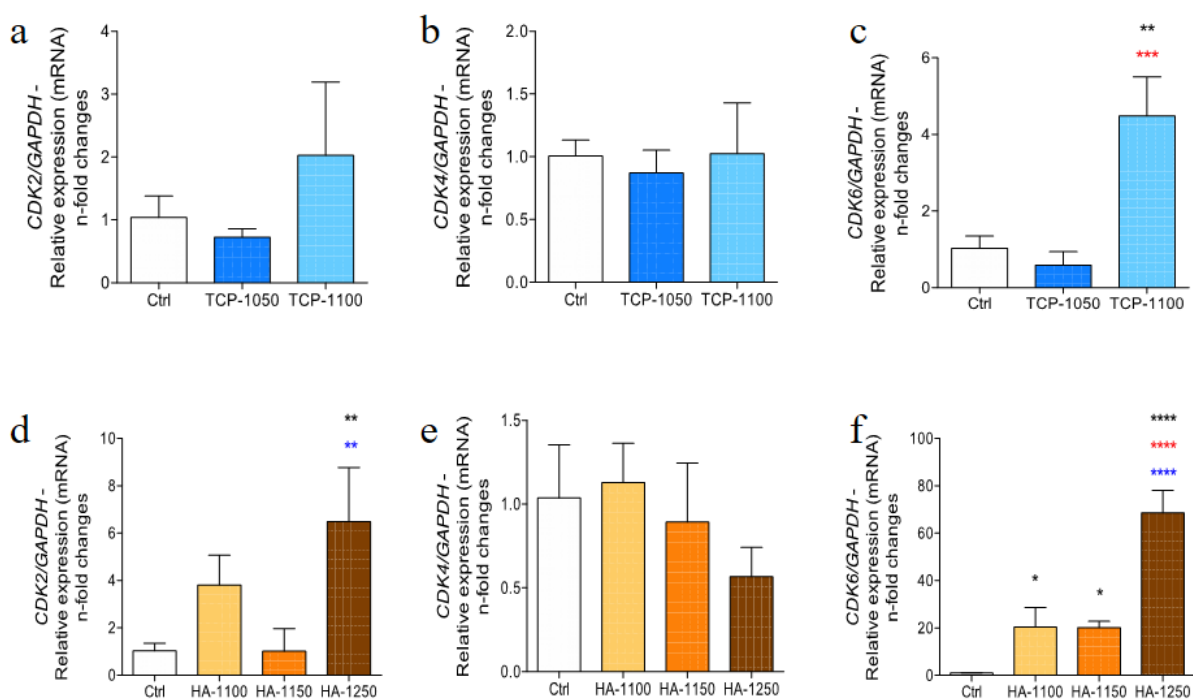


Figura 27: Efeito de biomateriais na expressão de genes relacionados com proliferação e ciclo celular. Após 24 horas de tratamento as células foram coletadas e o RNA extraído para estudo da expressão gênica por qPCR dos genes CDK2 (**a, d**), CDK4 (**b, e**) e CDK6 (**c, f**) normalizados pelo GAPDH em triplicata.

Diferenças significativas estatisticamente foram consideradas quando * $p < 0.05$, ** $p < 0.0017$, **** $p < 0.0001$ quando comparado ao controle. *** $p < 0.0002$ quando comparado com TCP-1050. **** $p < 0.0001$ quando comparado com HA-1100. ** $p < 0.0017$, **** $p < 0.0001$ quando comparado com grupo HA-1150.

A análise por qPCR não demonstrou diferenças significativas no perfil de transcritos dos genes CDC-25 e P21, enquanto que o gene P15 revelou um aumento em sua expressão nos grupos TCP-1100 e HA-1250 de aproximadamente 10 e 15 vezes, respectivamente, quando comparado com o grupo controle (**Figura 28b,e**).

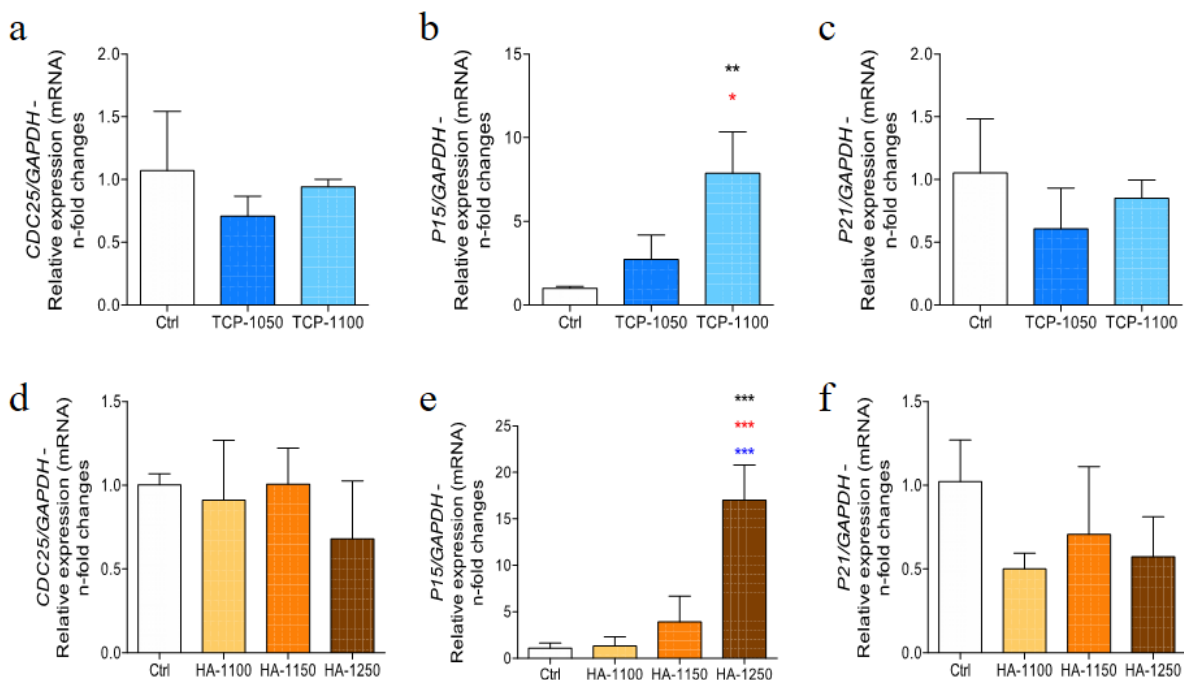


Figura 28: Meio enriquecido com biomateriais parece modular o perfil de expressão de genes envolvidos com ciclo celular. Expressão gênica de CDC25 (a, d), p15 (b, e) e p21 (c, f) foi avaliada por qPCR nas células MG63 tratadas indiretamente com diferentes biomateriais e um efeito maior no gene de um 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. Diferenças significativas foram consideradas quando $**p < 0.0017$, $***p < 0.0002$ quando comparado ao controle. $*p < 0.05$ quando comparado com TCP-1050. $***p < 0.0002$ quando comparado com HA-1100. $***p < 0.0002$ quando comparado com grupo Ha-1150.

Constituintes moleculares envolvidos com o fenótipo osteoblástico foram avaliados quanto a sua expressão gênica por PCR tempo real. Nossos resultados mostram que o gene Runx2 não mudou sua expressão de modo significativo dentre os grupos tratados em comparação com o controle (Figura 29a,d), enquanto o gene Osterix, teve sua expressão diminuída no grupo TCP (Figura 29b), enquanto que o mesmo gene demonstrou um aumento significativo estatisticamente nos grupos HA-1100 e HA-1250 (Figura 29e), algo que pode ser considerado um resultado interessante pois o estado normal da célula foi alterado pela presença dos materiais no meio, estimulando via de diferenciação osteoblástica. A expressão do gene da Osteocalcina também revelou uma modulação significativa em resposta aos tratamentos nos grupos HA-1150 e HA-1250, elevando seu perfil por volta de 20 e 40 vezes, respectivamente para os materiais listados (Figura 29c, f).

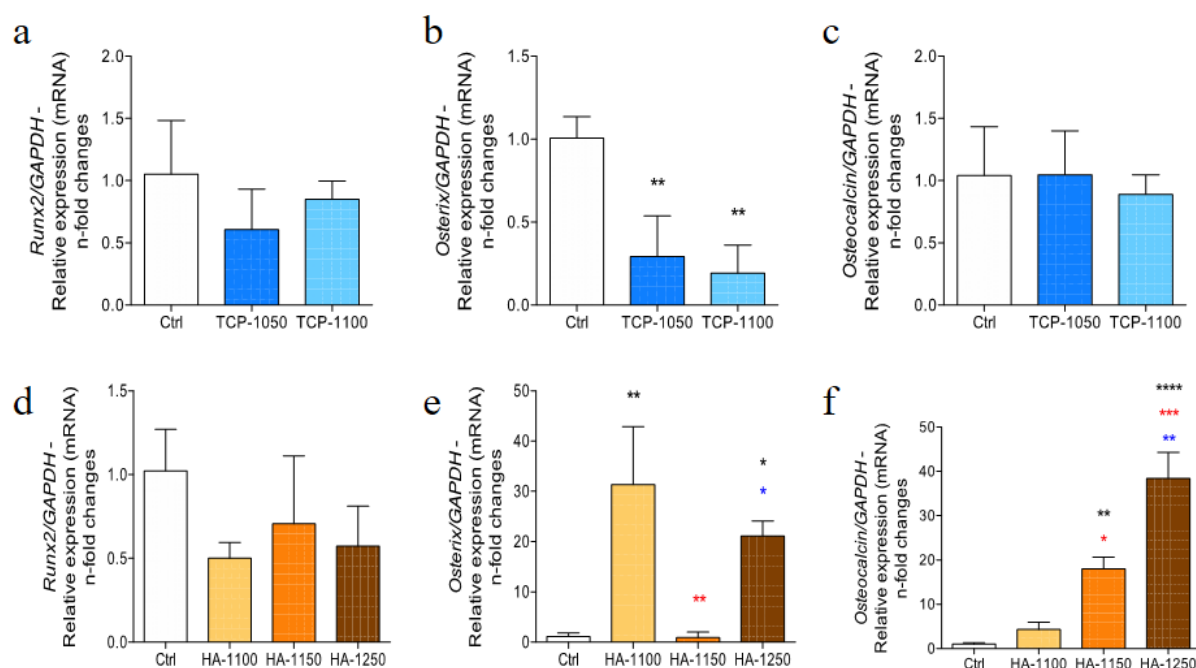


Figura 29: Modulação da expressão gênica de constituintes relacionados com o fenótipo osteoblástico. Para avaliar o perfil do fenótipo da célula osteoblástica em resposta ao tratamento com os diferentes biomateriais, foi investigada a expressão de genes envolvidos nesse cenário como RUNX2 (a,d) que não 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).

Os valores foram normalizados pelo GAPDH e diferenças foram consideradas significantes quando * $p < 0.05$, ** $p < 0.0017$, **** $p < 0.0001$ quando comparado ao controle. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0017$, *** $p < 0.0002$ comparado HA-1100. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0002$ quando comparado com grupo Ha-1150.

Genes envolvidos com o processo de osteoclastogênese como OPG e RANKL foram analisados e o parâmetro de qPCR revelou que o perfil de transcritos de OPG não apresentou diferenças no grupo TCP (**Figura 28a**), porém no grupo HA observa-se uma significativa redução em comparação ao controle (**Figura 28c**). Algo diferente foi observado no ensaio de expressão gênica do constituinte relacionado com a reabsorção óssea, o RANKL, em que nos grupos TCP houve diferença significativa com uma expressiva redução (**Figura 30b**), enquanto que nos grupos HA observa-se um gradativo aumento significativo em sua expressão, quando a rampa de temperatura de síntese foi considerada (**Figura 30d**).

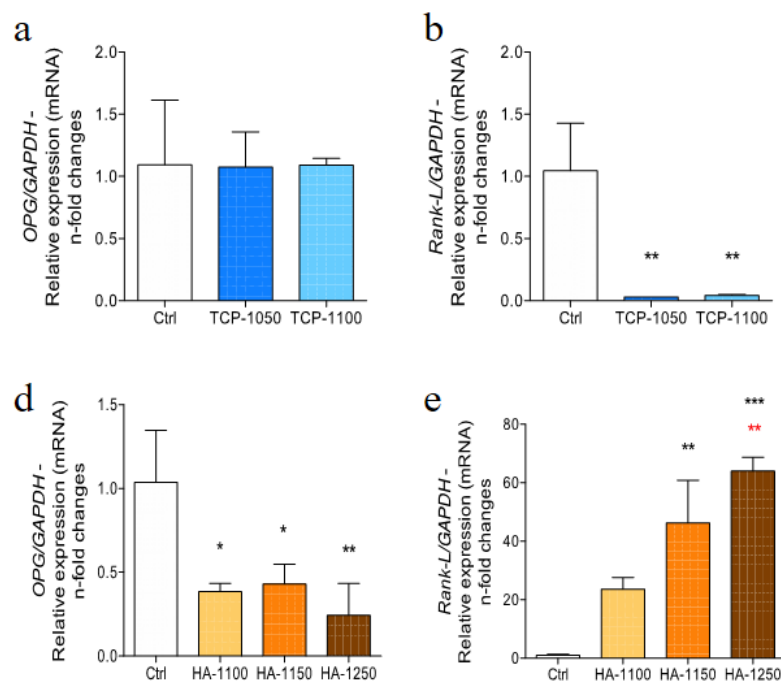


Figura 30: Análise de expressão gênica de genes envolvidos com Osteoclastogênese e reabsorção óssea. Genes relacionados com a diferenciação de Osteoclastos, OPG e RankL (a-d), foram avaliados por PCR em tempo real comparados pelo grupo controle e normalizados pelo gene de referência GAPDH (*housekeeping*). 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.

Por fim, as MAP-Kinases foram consideradas neste estudo, uma vez que estão envolvidas em importantes processos como adesão, diferenciação, morte e sobrevivência celulares. Resultados mostram que houve apenas uma redução na expressão de uma delas, a JNK, em resposta ao grupo TCP-1050 (Figura 31a), enquanto que os demais grupos do modelo e genes dessa classe não demonstraram diferenças significativas quanto à expressão gênica por qPCR ao comparar os grupos que receberam tratamentos com os diferentes tipos de biomateriais com o grupo controle (Figura 31a-f).

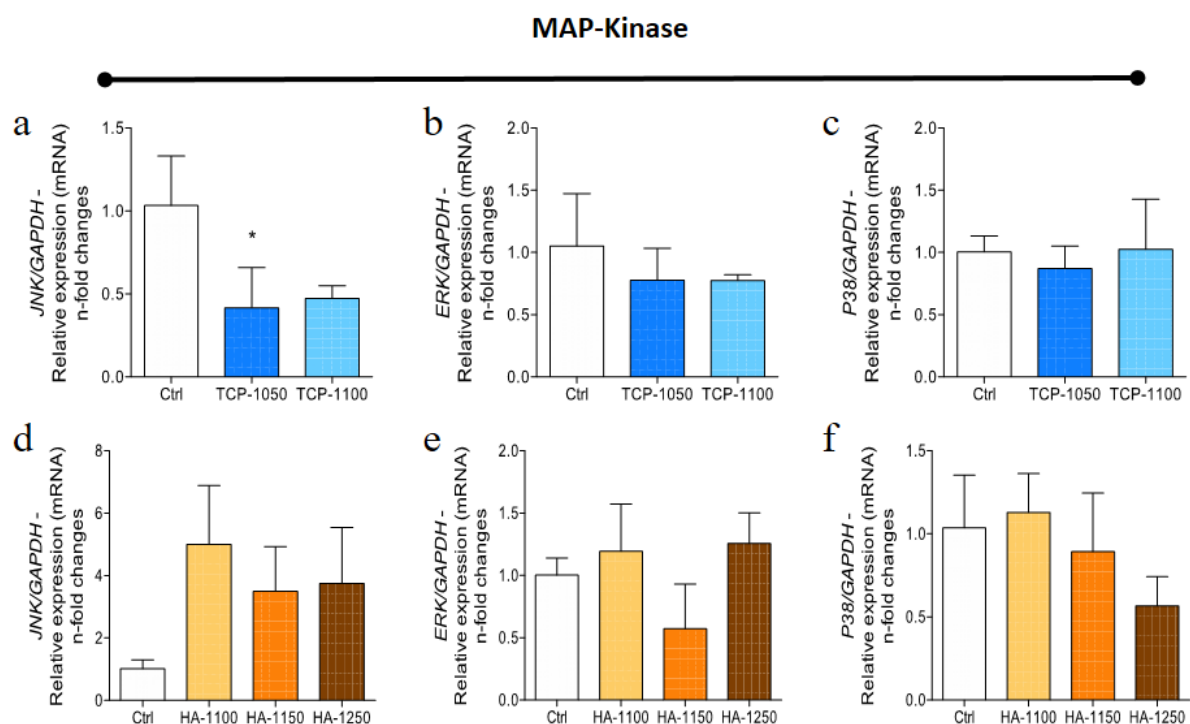


Figura 31: Genes MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) foram avaliados por qPCR em resposta aos biomateriais. Perfis de transcritos de MAPKs revelaram apenas uma redução no grupo TCP-1050 na expressão do gene JNK (a), nos demais grupos e nos outros genes ERK (b,e) e P38 (c,f) não se observa diferença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

* $p < 0.05$: Diferença estatística quando comparado ao controle.

5 DISCUSSÃO

O objetivo principal desse trabalho foi aplicar metodologias *in silico* para melhor interpretação de dados globais de transcriptoma de células osteogênicas desafiadas por diferentes materiais (GROEN et al., 2015), sobretudo estabelecendo potencialidades de comparação com o poliestireno, um material padrão-ouro para respostas celulares. Embora as células utilizadas nesse ensaio por Goen et al (2015) tenham sido retiradas de osteosarcoma, esta vem sendo utilizada em diversos estudos com caráter osteogênico, principalmente àqueles envolvidos com respostas a biomateriais (CZEKANSKA et al., 2012, 2014).

As análises de bioinformática trouxeram diferentes assinaturas para os materiais, comparando com o poliestireno e, assim, a hipótese escolhida foi que, quanto menor a variação do transcriptoma em relação ao poliestireno, melhor será este material. Entre os materiais utilizados no trabalho de Groen et al (2015) e a partir da análise realizada foram obtidos o perfil de resposta da hidroxiapatita e do fosfato tricálcio sinterizados a diferentes temperaturas. Entre os grupos analisados o grupo TCP 1050 apresentou uma maior expressão da quantidade de genes diferencialmente expressos mesmo quando comparado ao grupo TCP 1100.

Com as análises de assinaturas moleculares provenientes do MSigDB e utilizando os scores do GSVA, foi possível observar comparando os grupos TCP 1050 e 1100 uma variação no transcriptoma das células testadas (LIBERZON et al., 2015) e destacando por esses dados a relevância de se escolher a temperatura que o material será sinterizado. O grupo TCP 1050 apresentou a menor similaridade quando comparado ao poliestireno, este material como apresentado anteriormente, expressou a maior quantidade de genes diferencialmente expressos. Contrastando com esta informação a Hidroxiapatita sinterizada à 1250°C foi o grupo que mais se assemelhou ao poliestireno, em todos os *heatmaps* das assinaturas. Sendo possível correlacionar o resultado com as diferenças físicas dos materiais, por a análise de bioinformática e a literatura destacarem a HA 1250.

A hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada como biomaterial devido à proporção de cálcio para fósforo ser semelhante àquela encontrada na porção mineral do tecido ósseo. Como a temperatura de calcinação afeta as propriedades da hidroxiapatita, em termos de fases, dureza e densidade presentes, essas propriedades podem ter um impacto diferente no perfil de transcrição celulares, o que mostraria um perfil mais próximo do poliestireno. De acordo com Ramesh e colaboradores (2000) conforme a temperatura é elevada o tamanho do grão se altera, chegando a 2 µm em 1250°C, que ainda segundo os autores, é a temperatura ideal para obtenção das melhores propriedades do material, tornando-se instável e tamanho aumentado em temperaturas superiores (MURALITHRAN; RAMESH, 2000).

Para a avaliação do material, a técnica de FTIR retornou reflexões correspondentes à fase de HA e TCP. A presença de vibrações devido a fase α do TCP não foi detectada, a técnica de termogravimetria nos orientou em quais temperaturas ocorrem alterações no material, assim nos permitindo escolher uma temperatura ideal para iniciar as calcinações, visto que não teríamos perda de massa. A análise de DRX nos retornou os picos correspondentes da hidroxiapatita e do fosfato tricálcio- β , algumas alterações são encontradas quando comparadas com a literatura, porém são validadas devido a técnica utilizada, armazenamento e síntese do material, variações do equipamento na tensão e filtros utilizados (DALLABRIDA et al., 2018; LUKIĆ et al., 2011; RUJITANAPANICH; KUMPAPAN; WANJANOI, 2014; TANAKA et al., 1999). Uma vez caracterizados, utilizamos os materiais sintetizados para os testes biológicos.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que a presença dos materiais no meio não o torna tóxico para as células, possibilitando assim a continuação das análises. Estes ensaios preliminares são previstos para o desenvolvimento de novos materiais, como reportado pela ISO 10993. Após a análise da viabilidade celular, o cristal violeta traz informações importantes da adesão celular. Os dados mostram que células respondendo aos diferentes materiais sofrem interferência nas taxas de adesão, principalmente no grupo das hidroxiapatitas, mostrando um efeito positivo em resposta a estes materiais. De imediato, podemos fazer uma correlação entre esses dados adesão (colorimétrico) em resposta à HA com os dados do transcriptoma, os quais reportam que os transcritos em resposta a este grupo apresenta uma distância menor com àqueles do poliestireno.

Por serem utilizados como biomateriais, espera-se que HA e o TCP promovam mecanismos relacionados com adesão, proliferação e diferenciação pré-osteoblastos. Assim, avaliamos a influência do meio enriquecido com HA (1100, 1150 e 1250°C) e TCP (1050 e 1110°C) na mesma linhagem osteogênica proposta por Groen et al (2015) e avaliamos seu fenótipo através da expressão gênica de marcadores envolvidos com sobrevivência, proliferação e diferenciação. Para tal, foram realizados ensaios em RTqPCR para análise de transcritos que codificam proteínas relacionadas ao comportamento de osteoblastos.

Para fenótipo osteogênico, os resultados mostraram que a expressão do gene Runx2 não foi afetada ao desafio com os materiais, mostrando esse gene não ser um bom biomarcador para respostas diferenciais a biomateriais cerâmicos. Uma observação importante é que esse gene tem sido reportado como um fator que aumenta o número de osteoblastos em seus estágios iniciais de diferenciação, que é fortemente expresso por pré-osteoblastos e osteoblastos imaturos, estando diminuído em osteoblastos maduros (BALOUL, 2016; SADOWSKA et al., 2019). Adicionalmente, destaca-se que esse gene é um dos primeiros reguladores transcricionais necessário para a formação óssea e também é um mediador essencial da diferenciação dos osteoblastos (CHEN et al., 2018; LI et al., 2018). Por outro lado, os materiais foram diferenciais

na expressão do gene Osterix, outro fator de transcrição osteogênico (CAO et al., 2005), que tem sido relatado para o fenótipo de osteoblastos, inclusive substituindo a função do Runx2. A expressão aumentada de Osterix nessas células pode, inclusive, estar atrelada ao fenótipo dessas células MG63.

Dentre suas funções, sabe-se que o Runx2 regula a expressão de genes de proteínas da matriz óssea - incluindo osteocalcina (OCN) - durante a diferenciação de osteoblastos. A OCN é considerada um marcador tardio estabelecido para a diferenciação dos osteoblastos que aparece concomitantemente com a fase de mineralização da matriz e formação óssea (CHEN et al., 2018). A expressão aumentada de OCN pode ser indicativo de um número aumentado de osteoblastos maduros, que ainda não haviam se tornado osteócitos incorporados (CHEN et al., 2018; ENGBLOM et al., 2017; LI et al., 2018), quando considerado o tecido mineralizado como um todo.

Em seguida, com atenção aos genes envolvidos com fenótipo proliferativo, mostrou-se que o gene p21 não foi afetado diferencialmente pela condição experimental, enquanto o gene p15 apresentou perfil de modulação diferente no TCP 1100 e na HA 1250, no primeiro entre o controle e o outro TCP e na HA entre o controle e os outros tratamentos, respectivamente. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado a importância do controle do ciclo celular durante respostas à biomateriais (DA COSTA FERNANDES et al., 2018b). Por definição, genes envolvidos com a codificação das proteínas p15 e p21 estão envolvidos com o controle negativo do ciclo, funcionando como “freios” aos eventos biológicos de progressão do ciclo celular. Por outro lado, analisou-se também as CDKs, que apresentou um perfil distinto para resposta aos materiais. Dentre eles, destaca-se o caráter biológico de resposta às HAs, sobretudo com efeito àquela sinterizada à 1250. Para entendimento dessa resposta, fica claro o envolvimento da p15 nas respostas à HA 1250, diminuindo o ciclo celular e aumentando a expressão de genes envolvidos com a diferenciação e funcionamento de osteoblastos maduros, como é o caso da superexpressão de osteocalcina pelas células respondendo a esse material.

Em particular, a osteocalcina é o componente não colágeno mais abundante na matriz mineralizada do osso e está envolvida em diversos processos biológicos, como metabolismo energético, regulação do acoplamento reabsorção e formação óssea e sua expressão elevada pode estar indicando um aumento no metabolismo celular (BERGER et al., 2019; JIANG et al., 2013; MILLAR et al., 2017). Pela ação sistêmica da osteocalcina, o osso tem sido lançado como um importante tecido endócrino, podendo modular a expressão de insulina, sobretudo devido ao aumento da sobrevivência de células beta do pâncreas em resposta a esta, e controle das concentrações sistêmicas de glicose.

Os biomarcadores de *turnover* ósseo, RANK-L e OPG, também foram avaliados em resposta aos materiais. Enquanto RANKL foi pouco expresso em resposta aos grupos TCP, OPG manteve-se igualmente expressa; considerando os grupos onde as células foram tratadas com meio condicionado pelas HAs, mostrou-se que, enquanto o gene OPG foi diminuído quanto sua expressão, RANKL foi super-expresso significativamente. Estudos anteriores demonstraram a relação RANKL/OPG em células ósseas, destacando essa razão como decisiva e fundamental para obtenção de osteoclastos a partir de monócitos, podendo ainda ser controlada em resposta a diferentes materiais (JIANG et al., 2013; KANG et al., 2018; SISAY; MENGISTU; EDESSA, 2017). Este equilíbrio entre RANKL e OPG determina a quantidade da taxa de reabsorção óssea e a cinética da remodelação, em homeostase aos osteoblastos, que sintetizam a matriz mineralizada. Assim, os osteoblastos desafiados pelo meio enriquecido com HA parecem desempenhar papel importante em osteoclastogênese, fator esse que pode estar associado a mecanismos inflamatórios de reabsorção do próprio biomaterial, dada a semelhança estrutural das HAs com a fase mineral do osso, biologicamente desenhada. Assim, além de promover diferenciação de osteoblastos, pelos níveis aumentados de Osterix e osteocalcina, parece que HA 1250 estimula a osteoclastogênese como um gatilho de absorção do biomaterial pelos osteoclastos. Discussão acerca desse assunto tem sido feita na literatura comparando diferentes biomateriais (BALOUL, 2016; DOUGALL et al., 1999; JIANG et al., 2013; KANG et al., 2018; LYNCH et al., 2005). De um modo geral até aqui, cada tipo de material exibiu diferentes perfis de expressão de genes envolvidos com a osteogênese, considerando os múltiplos genes associados à osteogênese ou diferenciação dos osteoblastos (JIANG et al., 2013).

Avaliamos também as MAPKs, enzimas que regulam positiva ou negativamente a adesão, migração, e sobrevivência celulares, além de estar envolvida com processos de osteoclastogênese. Numerosos estudos explorando os papéis das MAPKs no metabolismo ósseo sugerem que ERK, JNK e p38 são atores-chave na diferenciação e ativação de osteoblastos e mecanismos de osteoclastogênese, envolvendo-se sobremaneira com o *turnover* do osso (DA COSTA FERNANDES et al., 2017, 2018a; KANG et al., 2018; LEE et al., 2018; SHOKOUHI et al., 2010). Embora controverso na literatura, as MAPKs têm sido amplamente discutidas na biologia óssea, sendo relatada em mecanismos de sobrevivência, proliferação, apoptose, formação, polaridade e diferenciação celulares, podendo ainda colaborar na expressão e atividade da metaloproteinase da matriz 9 (MMP-9, também denominada gelatinase B / collagenase tipo IV), que está implicada na biologia de osteoblastos (ZAMBUZZI et al., 2009a).

Com o avanço na análise experimental de validação da resposta biológica aos diferentes materiais analisados neste estudo, destacamos que análises *in silico*, através de ferramentas de bioinformática, colabora na compreensão de diferenças biológicas disparadas por materiais

biomédicos, apresentando-se como estratégia importante no planejamento de experimentos. As assinaturas MSigBD mostraram-se úteis na avaliação dos materiais, visto que bancos de dados para diferentes processos biológicos estão reunidos. Com a plataforma R foi possível correlacionar os dados brutos disponibilizados por Groen e colaboradores (2015) e assim a partir dos experimentos realizados por estes autores, analisarmos os materiais de acordo com os bancos de dados. A partir destas informações, os grupos de dados foram confrontados com testes *in vitro*, onde as células MG63 foram novamente desafiadas pelos materiais, destacando respostas biológicas importantes à HA que, embora sintética, traz repertório estrutural e químico da biomotivação da fase inorgânica de estruturas ósseas. Assim a análise de bioinformática mostrou-se efetiva na predição de biomateriais.

6 CONSTATAÇÕES

1. A metodologia utilizada demonstrou ser importante na predição de biomateriais funcionais;
2. O pacote R desenvolvido mostrou-se efetivo nas análises dos materiais e este será disponibilizado no banco de dados Bioconductor e poderá ser utilizado por outros pesquisadores;
3. Os biomateriais utilizados demonstraram diferenças em suas características e potencialmente podem ser utilizados em estudos *in vivo* e aplicações;
4. O comportamento celular *in vitro* em resposta a um biomaterial pode fornecer informações úteis sobre suas respostas *in vivo* observadas;
5. Correlacionar perfis de expressão gênica a uma observação *in vivo* conhecida pode levar a novas vias para melhorar o biomaterial;
6. HA 1250 mostrou ser o melhor material no quesito resposta celular.

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.

9 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

Disciplinas

- . Dinâmica Molecular de Tecidos Mineralizados
- . Farmacologia e Sociedade
- . Isótopos Estáveis Ambientais – Aplicação Biotecnológica
- . Metodologias avançadas e aplicadas em tecidos mineralizados
- . O cientista e o professor universitário
- . Prática Pedagógica no Ensino Superior (II): Recursos de Ensino-Aprendizagem
- . Química Metabólica da Célula: Carboidratos
- . Sinalização Celular
- . Tópicos em Biossegurança e Organismos Geneticamente Modificados (OGMs e AnGMs)
- . Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada
- . Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: 3D-printing: medical applications
- . Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Programação Fetal: Do Ambiente Uterino ao Envelhecimento da Prole
- . Tópicos Especiais em Farmacologia e Biotecnologia: “Imagens Biomédicas: do Experimental ao Clínico”

Estágio Docência

Estágio docência realizado sobre a supervisão do Professor Vladimir Eliodoro Costa na disciplina “Aplicações com Isótopos Estáveis nas Ciências da Saúde”, no curso de Biomedicina do Instituto de Biociências de Botucatu.

Cursos

1. Curso de Extensão em Boas Práticas de Laboratório e Biossegurança (Instituto de Biociências de Botucatu)
2. Curso de Difusão do Conhecimento "Toxicologia aplicada na área da saúde" (Instituto de Biociências de Botucatu)
3. Curso “Análise Proteômica como estratégia na Medicina Translacional” (CEVAP).
4. Curso “Docência no ensino superior: fundamentos e práticas pedagógicas” (Instituto de Educação e Pesquisa em Práticas Pedagógicas - Unesp).

Eventos

1. IV Simpósio Internacional de Imuno-oncologia
2. 1º Workshop "Cromossomos B, cromossomos sexuais e seus enigmas
3. XI Congresso de Oncologia de Botucatu
4. 21º Encontro Nacional de Biomedicina (Comissão Científica)
5. 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

6. I Simpósio de Pesquisa e Inovação em Materiais Funcionais
7. VIII Simpósio Internacional de Câncer de Mama
8. IV AFM Workshop (CNPEM)
9. V Workshop de Biotecnologia – WorkBiotech

Palestra Ministrada

Palestra “Física na Medicina Nuclear”, na disciplina Seminários de Física Médica do Curso de Física Médica do Instituto de Biociências de Botucatu.

Minicurso Ministrado

Aplicação da Bioinformática na contextualização da Biologia Celular durante o Simpósio Anual da Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada no Instituto de Biociências de Botucatu.

Resumos em eventos

1. Estudo do perfil transcriptômico de osteoblastos envolvidos na adaptação a biomateriais. Almeida, G.S; Ferreira, M.R.; Biagi-Junior, C.A.O.; Silva-Junior, W.A.; Zambuzzi, W.F.
2. Osteoblast-t: assinaturas moleculares do transcriptoma na comparação de biomateriais. Ferreira, M.R.; Almeida, G.S; Biagi-Junior, C.A.O.; Silva-Junior, W.A.; Zambuzzi, W.F.
3. Adaptive response of endotelial cells in Titanium enriched medium. Almeida, G.S, Martins, B.R, Pinto, T.S, Zambuzzi, W.F
4. Modulatory effect of tio2-enriched medium on endothelial cells. Almeida, G.S, Martins, B.R, Pinto, T.S, Zambuzzi, W.F
5. Global study of the transcriptional profile on the adaptive responses to biomaterials. Almeida, G.S; Ferreira, M.R.; Biagi-Junior, C.A.O.; Silva-Junior, W.A.; Zambuzzi, W.F

Artigos em Submissão

1. GSVA score reveals molecular signatures from transcriptome for biomaterials comparison. Ferreira MR¹; Almeida GS¹; Biagi CA²; Silva WA jr²; Zambuzzi WF¹
2. Cellular response of MG-63 cells in Hydroxyapatite / TCP enriched medium with different heat treatments. ¹Almeida. G.S; ¹Ferreira. M.R; ²Biagi. C.A.O; ¹Fernandes. C.J.C; ¹Rocha. G.C.; ²Silva WA Jr, ¹W.F.; Zambuzzi

Artigos em Revisão

Célio Junior da Costa Fernandes, Thais Silva Pinto, Gerson Almeida, Fábio J Bezerra, Willian Zambuzzi. Coupling of shear-stressed endothelial cell and osteoblasts in responding to Co-Cr-enriched medium.

Artigos publicados

Almeida, G. S.; Almeida, I. D. Study of epilepsy through neuroimaging methods. Neurociências (Rio De Janeiro), V. 14, P. 53-63, 2018.

Membro de Órgão Colegiado

Membro discente titular do Conselho do Departamento de Química e Bioquímica