



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**COMPLEXO QUINÔMICO ENVOLVIDO COM
ADAPTAÇÃO DE OSTEOLASTO EM *SCAFFOLD*
ORGÂNICO SOB CONDIÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO
CELULAR**

ARIANE MARUMOTO

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

Profº Drº Willian F. Zambuzzi

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

COMPLEXO QUINÔMICO ENVOLVIDO COM
ADAPTAÇÃO DE OSTEOLASTO EM *SCAFFOLD*
ORGÂNICO SOB CONDIÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO
CELULAR

ARIANE MARUMOTO
Prof. Dr. WILLIAN F. ZAMBUZZI

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

BOTUCATU – SP
2016



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Marumoto, Ariane.

Complexo Quinômico envolvido com adaptação de osteoblasto em *scaffold* orgânico sob condição de diferenciação celular/ Ariane Marumoto – 2016

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2016

Orientador: Prof^o Dr^o Willian F. Zambuzzi

Assunto CAPES: 20303009

1. Bioquímica

CDD 581.1

Palavras-chave: Osteoblasto, Adesão, Fenótipo, Quinases, Biomateriais, Bioengenharia

RESUMO

Modelos *in vitro* têm facilitado a análise da fisiologia celular sob condições experimentais diversas; trata-se de modelo alternativo ao uso de animais de experimentação, que vem sendo difundido e aceito amplamente em pesquisa científica. Além disso, estes modelos têm levado à avanços significativos na compreensão das interações mútuas e adaptativas entre células e substratos. Neste trabalho, nosso objetivo foi analisar eventos moleculares responsáveis pela adaptação de pre-osteoblastos em substrato orgânico composto por componentes da Matriz Extracelular (MEC), sob condição de diferenciação celular. Metodologicamente, pré-osteoblastos (MC3T3-E1 50×10^3 células/ml) foram semeados sobre uma fina camada de Matrigel® gelificada e mantidos por 10 dias (37°C , 5% de CO_2 em ambiente úmido) sob condição de diferenciação (meio de cultivo contendo $50 \mu\text{g}$ de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerofosfato), com renovação do meio de cultivo a cada 3 dias. Alterações morfológicas foram monitoradas em microscópio invertido e mecanismos moleculares acompanhados pela análise global da atividade de quinases, através de arranjo de peptídeos (Pepchip). Curiosamente, nossos resultados mostraram mudanças morfológicas significantes durante adaptação celular as quais foram acompanhadas pela atuação de vias de sinalização celular distintas, responsáveis pela sobrevivência (Eixo PI3K-Akt) e proliferação (Eixo Retinoblastoma-ciclinas) celulares, além de proteínas envolvidas com metabolismo energético e comunicação inter-celulares. Em geral, nossos resultados revelam mapa metabólico específico para adaptação de osteoblastos em *scaffolds* orgânicos, revelando características fenotípicas.

Palavras chave: Osteoblasto, Matriz Extracelular (MEC), Adesão, Fenótipo, Quinases, Biomateriais.

ABSTRACT

In vitro models have been proposed to analyze cellular physiology under various experimental conditions. It is an alternative model instead using experimental animals that have been widespread and widely accepted in scientific research. Moreover, it has led to significant advances in the understanding of mutual and adaptive interactions between cells and substrates. In this work, our aim was to analyze adaptive events of osteoblasts cultured on an organic substrate composed by components of the extracellular matrix (ECM) in the first 10 days of cultivation on differentiation condition. Methodologically, pre-osteoblasts (MC3T3-E1 pre-osteoblasts, 50×10^3 cells / ml) were seeded on a thin gelified Matrigel® layer and maintained for 10 days under standard cell culture conditions (37°C , 5% CO_2 in a humid environment) under differentiation conditions (culture media containing 50 μg of ascorbic acid and 10 mM beta-glycerophosphate). The culture medium was changed every 3 days. Morphological changes were monitored using an inverted microscope and molecular mechanisms followed by comprehensive analysis of kinase activity by peptides arrangement (Pepchip). Interestingly, our results showed significant morphological changes during cell adaptation which were accompanied by distinct signaling pathways involving proteins responsible for survival (PI3K-Akt axis) and cell proliferation (Retinoblastoma-cyclins axis), in addition of proteins involved in energy metabolism and cellular communication. Overall, our results reveal specific metabolic map to osteoblasts adaptation in organic substrates and affects the phenotypic characteristics.

Keywords: Osteoblast, Extracellular Matrix (ECM), Adhesion, Phenotype, Kinases, Biomaterials.

SUMÁRIO

1	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	7
2	LISTA DE FIGURAS	9
3	LISTA DE ANEXOS.....	10
4	INTRODUÇÃO	11
4.1	Considerações iniciais.....	11
4.2	Princípios Gerais da Regeneração Óssea.....	12
4.3	Adesão de Osteoblastos Sobre Biomateriais: Primeiro Passo para Regeneração 15	
4.4	Metabolismo Celular.....	16
4.5	Quinases e Fosfatases: Ativação transiente de vias depende do balanço de fosforilação	17
4.6	Conceito Quinoma	19
5	HIPÓTESE	21
6	OBJETIVOS.....	22
7	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
7.1	Reagentes.....	23
7.2	Cultura de células e protocolo de aquisição de mudança morfológica de osteoblastos.....	24
7.3	Ensaio de viabilidade celular.....	24
7.4	Determinação da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP).....	25
7.5	Western blot.....	25
7.6	Fosfoproteoma (Pepchip ou arranjo de peptídeos).....	26
7.7	Análise estatística.....	26
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
8.1	Um eficaz modelo tridimensional in vitro para a aquisição de osteoblastos com alterações morfológicas.....	27
8.2	Geração de perfis quinômicos de osteoblasto cultivados sobre Matrigel®.....	32
8.3	Alteração morfológica de osteoblastos está associado à redução de mecanismos de transdução de sinal celular.....	33
8.4	Fosfoproteoma diferencial durante a alteração morfológica dos osteoblastos.....	35
9	CONSTATAÇÕES.....	45
10	CONCLUSÃO	46
11	BIBLIOGRAFIA.....	47
12	ANEXOS	54

1 LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α -MEN	Meio de cultura (Minimum Essential Medium)
^{33}P - β -ATP	Beta ATP radioativo
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinase B
ALP	Fosfatase Alcalina
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína morfogênica do osso
c-Myb	Fator de transcrição
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
ECL	Eletroquimioluminescência
EGTA	Ácido tetracético de etileno-glicol
FAK	Quinase de adesão focal
FC	<i>Fold Change</i>
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MAPKp38	Proteína de ligação específica de citocinas
MC3T3-E1	Linhagem celular de osteoblastos de rato
MEC	Membrana Extracelular
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Meio Osteogênico
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Reagente brometo de [3(4,5-demetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium]
NaCl	Cloreto de Sódio

NaF	Fluoreto de Sódio
nM	Nanomolar
P	Substrato Fosforilado
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (phosphate buffered saline)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase (phosphatidylinositide 3-kinases)
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenil-fosfato
PP2A	Proteína Fosfatase 2A
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Rb	Retinoblastoma
RPM	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHP2	Proteína tirosina fosfatase
Src	Proteína quinase (Proto-oncogene tyrosine)
TBS	Caldo de soja triptona (tryptic soy broth)
TGF- β fator beta)	Fator transformador de crescimento-Beta (transforming growth fator beta)
ZnCl ₂	Cloreto de Zinco

2 LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular.....</i>	<i>18</i>
Figura 2. <i>Esquematização do procedimento experimental e linha do tempo experimental.....</i>	<i>23</i>
Figura 3. <i>Efícaz modelo tridimensional in vitro para a obtenção de osteoblastos com alterações morfológicas.....</i>	<i>28</i>
Figura 4: <i>Gráfico do teste de viabilidade celular.....</i>	<i>30</i>
Figura 5: <i>Gráfico de Fosfatase Alcalina (ALP).....</i>	<i>31</i>
Figura 6. <i>Geração de perfis quinômicos responsáveis pelas alterações morfológicas dos osteoblastos.....</i>	<i>32</i>
Figura 7: <i>Distribuição de quinases envolvidas nos grupos avaliados.....</i>	<i>34</i>
Figura 8: <i>Perfis quinômicos foram gerados através da incubação de lisados celulares de diferentes grupos experimentais exibindo 976 diferentes substratos de quinase com 33P-g-ATP.....</i>	<i>35</i>
Figura 9. <i>Rede de interação de proteínas.....</i>	<i>37</i>
Figura 10. <i>Rede de interação de proteínas.....</i>	<i>39</i>
Figura 11. <i>Rede de interação de proteínas.....</i>	<i>41</i>
Figura 12. <i>Rede de interação de proteínas.....</i>	<i>42</i>
Figura 13. <i>Rede de interação de proteína.....</i>	<i>44</i>



3 LISTA DE ANEXOS

Figura S1: *Dados de fosforilação de substrato Pepchip*.....53

Figura S2: *Mudanças de dobra logarítmicas*.....54

Tabela 1: *Peptídeos consensus fosforilados com diferença significativa*.....55

4 INTRODUÇÃO

4.1 Considerações iniciais

A matriz extracelular (MEC) é um componente importante no estabelecimento do nicho celular, proporcionando suporte físico para as células e integridade dos tecidos (Paiva *et al.*, 2009; Paiva & Granjeiro, 2014), devido principalmente ao fato de que células específicas (tais como condrócitos, osteócitos e fibroblastos) estarem completamente cercadas pelos seus componentes (Rhee 2009; Zambuzzi *et al.*, 2009; van der Eerden, Teti & Zambuzzi, 2014) e mantidas por uma grande variedade de sítios de ligação de interação célula-matriz, controlando a plasticidade e remodelação de tecidos específicos (Rhee 2009; Kural & Billiar 2013). Nesse sentido o estudo da MEC evoluiu de um elemento meramente de sustentação e preenchimento de espaço tecidual para uma interface envolvida no controle ativo das atividades celulares e função dos tecidos, envolvida com seu metabolismo e adaptação.

Sua composição de proteínas e a dinâmica celular é de importância crucial para o funcionamento saudável e manutenção da homeostase celular (Paiva *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Devido a estas características marcantes, os diferentes componentes da MEC têm sido amplamente exploradas como modelos fisiológicos ideais para a análise de interações célula-matriz em detrimento a cultura de tecido tradicional em polímero (Kural & Billiar, 2013). Neste cenário, modelos biocompatíveis para engenharia de tecidos requer uma compreensão profunda das interações entre células e matriz extracelular do tecido de interesse (McAllister & Haghghat 2007; Zambuzzi *et al.*, 2011; Zambuzzi *et al.*, 2012; van der Eerden, Teti & Zambuzzi, 2014).

Sinalização disparada pela interação célula-célula é a principal estratégia do desenvolvimento de embriões de vertebrados, os quais coordenam proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular.

Em especial à fisiologia óssea, os mecanismos moleculares que controlam o equilíbrio entre os vários tipos de células no osso (van der Eerden, Teti & Zambuzzi, 2014), bem como a sua atividade em relação à deposição e reabsorção de elementos da matriz permanecem apenas parcialmente entendidas, já que há uma falta de informação sobre os mecanismos moleculares de condução e adaptação dos osteoblastos em substratos à base de componentes da MEC.

Por sua vez, defeitos ósseos constituem um dos problemas mais relevantes na área médico-odontológica. Reconstruir o tecido perdido é um dos grandes desafios de cirurgões na área médico-odontológica, necessitando, muitas vezes, da utilização de um biomaterial cuja propriedade físico-química e biológica envolva mecanismos necessários à regeneração tecidual. Nesta área, os materiais osteo-substitutos constituem uma das mais comuns e antigas formas de terapia regenerativa (McAllister & Haghghat, 2007; Kao & Scott, 2007; Ye *et al.*, 2012).

Até o presente, porém, não há material sintético que reúna as propriedades ofertadas pelo material autógeno, conhecidamente como material ideal e, diante desta problemática, pilares da medicina regenerativa e bioengenharia de tecidos, torna-se evidente a necessidade de explorar mecanismos biológicos responsáveis pela interação de osteoblastos sobre diferentes biomateriais, a fim de se conhecer a biologia destes eventos (Zambuzzi *et al.*, 2011; Pattanaik *et al.*, 2012).

4.2 Princípios Gerais da Regeneração Óssea

A cicatrização dos tecidos constitui uma resposta comum a vários tipos de agressões teciduais, visando o restabelecimento da estrutura e função. Trata-se de um mecanismo multifatorial e que pode ocorrer por dois processos: regeneração e reparação. (Blumenthal *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2011; Aspenberg, 2013).

O termo regeneração refere-se à reconstituição *ad integrum* dos tecidos danificados com base na proliferação e completa diferenciação, estabelecendo as propriedades teciduais originais.

Deste modo, o novo tecido terá características morfológicas e propriedades funcionais que não se distinguem do tecido primitivo (Polimeni *et al.*, 2009; Stavropoulos e Wikesjö, 2012; Dickinson *et al.*, 2013). Por outro lado, o processo de reparação consiste numa reconstrução incompleta, substituindo os tecidos perdidos pela formação de um tecido conjuntivo fibroso que resulta geralmente numa cicatriz (Wikesjo *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 2005; Evans, 2013), não trazendo de volta suas propriedades funcionais. Considera-se hoje prioritário regenerar e não reparar, reconstruindo a forma e restaurando sua função.

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aplicação em engenharia de tecidos estabelece uma tríade constituída por elementos básicos sinérgicos, a saber:

1. **Células:** componentes figurados capazes de uma resposta eficaz (Paschos *et al.*, 2014; Mine *et al.*, 2014);
2. **Moléculas de sinalização (Fatores tróficos):** capacidade de estimular células de modo guiado (Eom *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2014; Carreira *et al.*, 2015);
3. **Scaffolds:** Matrizes de suporte (biomateriais) capazes de guiar e apoiar a formação do tecido neoformado (Salgado *et al.*, 2004; Mikos *et al.*, 2006; Shih *et al.*, 2014; Zambuzzi *et al.*, 2014).

Atualmente, a Medicina Regenerativa tem ganhado merecido destaque por oferecer alternativas terapêuticas sofisticadas e multifatoriais, visando regenerar o tecido lesado ou totalmente perdido (Robinton & Daley, 2012, Ravindran & George, 2014; Rezza *et al.*, 2014). É de comum entendimento que enxertos ósseos são requeridos para o tratamento de perdas ósseas de origem traumática ou patológica (Santos *et al.*, 2013). Hoje o padrão de tratamento é o osso autógeno, obtido de áreas intra-orais e da crista ilíaca, o que reflete em uma significativa morbidade e custo para o paciente, além de afetar diretamente sistema de saúde público. Torna-se, assim, imprescindível o desenvolvimento e avaliação de protocolos clínicos inteligentes capazes de estimular as células osteoprogenitoras que permitam mimetizar aquelas características osteogênicas do enxerto autógeno.

Por fim, sabe-se que as características da superfície do biomaterial influenciam enormemente a atividade celular (Zang *et al.*, 2012; Zambuzzi *et al.*, 2014) e a integração célula-material (p. ex, formação de componentes de adesão focal e organização do citoesqueleto com efeitos no comportamento de osteoblastos). Desta forma, conhecer os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação de osteoblastos em substratos diversos faz-se necessário, visto que parâmetros biológicos adicionais agregam novas características durante o desenvolvimento de novos materiais, aumentando o desempenho do material, diminuição do tempo de reabilitação do paciente, etc (Gemini-Piperni *et al.*, 2014). Este tema tem sido explorado pelo nosso grupo nos últimos anos, buscando conhecer a identidade molecular dos biomateriais.

Biomateriais são materiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir parte da matéria viva cuja função foi perdida. Inclui qualquer substância sintética ou natural que possa ser usada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido, órgão ou organismo (Huebsch & Mooney, 2009). Dentre as características essenciais desses materiais estão a biocompatibilidade com o tecido e baixa toxicidade. Os mais requisitados no mercado atual são os polímeros, os cerâmicos e os metálicos, pois podem tanto substituir o tecido vivo sem função, como também estimular o crescimento de um novo tecido apostado a este.

Para que um material exerça sua função em processos regenerativos é imperativo que se conheça seu reflexo biológico em células durante mecanismos plásticos de adaptação. Estes mecanismos envolvem etapas fenotípicas importantes, tais como adesão, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular.

4.3 Adesão de Osteoblastos Sobre Biomateriais: Primeiro Passo para Regeneração Tecidual

Atualmente, a adesão celular é alvo de intensa pesquisa em diferentes processos biológicos, desde mecanismos responsáveis pela migração celular e estabelecimento de metástase de células tumorais, até a interação de células com biomateriais. Recentes estudos têm demonstrado que a adesão celular participa de maneira ativa na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose (Gemini-Piperni *et al.*, 2014).

Durante o reparo de lesões ósseas usando biomateriais, sabe-se que a perfeita interação de osteoblastos na superfície destes garante sua rápida osteointegração, principalmente pelos processos sequenciais de proliferação e diferenciação. Estes mecanismos celulares são rigorosamente controlados por mecanismos de transdução de sinais, os quais respondem a estímulos diversos, como as propriedades químicas e físicas das superfícies de materiais (Bertazzo *et al.*, 2009; Bertazzo *et al.*, 2010, Zang *et al.*, 2012).

Neste sentido, temos centrado esforços em conhecer os mecanismos de transdução de sinais que regem a adesão de osteoblastos sobre superfícies físico-quimicamente conhecidas, para que possam servir de parâmetros de análises para outros testes, onde não se conhece a capacidade adesiva de determinados materiais. Em estudo recente, nosso grupo mostrou que nas primeiras 2 horas pós-plaqueamento o metabolismo dos osteoblastos culmina em diferentes vias de sinalização responsáveis pelo rearranjo do citoesqueleto, com sinais oriundos da ativação de proteínas como MAPKp38 e FAK (Zambuzzi *et al.*, 2009), ativadas através da cascata de sinalização celular proveniente da ativação de integrinas (**Fig. 1**). Embora algum progresso tenha sido alcançado neste sentido, muito ainda precisa ser descoberto sobre estes mecanismos em outras condições, para que haja uma transferência direcionada de conhecimento ao setor de desenvolvimento de materiais.

4.4 Metabolismo Celular

Metabolismo celular refere-se ao conjunto de reações bioquímicas necessário para adaptação celular. A regulação do metabolismo é fundamental para que um organismo possa responder de modo rápido e eficiente a variações das condições ambientais, nutricionais ou ainda a condições adversas como traumas e patologias. A regulação metabólica é feita pela modulação de enzimas regulatórias em processos metabólicos-chaves, de tal modo que se possa ativar ou inibir reações químicas específicas para cada situação resultando em respostas biológicas adequadas. Para garantir a eficiência necessária, o organismo lança mão de vários tipos de regulação enzimática que podem ocorrer simultaneamente.

A regulação da função de proteínas ocorre por vários mecanismos tais como controle da expressão gênica, compartimentalização, moduladores alostéricos, interação proteína-proteína e/ou modulação covalente, como é o caso da fosforilação em resíduos de aminoácidos específicos. Em relação à fosforilação/desfosforilação de proteínas, catalisada por proteínas quinases e fosfatases respectivamente, refere-se ao principal mecanismo de regulação transiente de proteínas sinalizadoras. Portanto, estas duas famílias de enzimas desempenham papel de destaque no metabolismo celular através do controle de vias de transdução de sinais. Na biologia, transdução de sinal pode ser definida como um processo finamente regulado que permite que todo tipo celular seja capaz de responder a agentes específicos presentes no seu microambiente, culminando em diferentes respostas, como diferenciação, proliferação, migração, adesão, sobrevivência ou morte. Em outras palavras, os mecanismos de transdução de sinais se referem ao movimento de sinais de fora para dentro da célula, levando uma resposta direta através de cascatas de fosforilação (inibição e/ou ativação de proteínas).

Assim, mecanismos de transdução de sinais desempenham papéis cruciais para o bom funcionamento do organismo, uma vez que são essenciais para a comunicação célula-célula, resposta celular ao ambiente, homeostase intracelular, etc. De um modo geral, a transdução de sinal em organismos multicelulares é crucial para regular suas respostas fisiológicas frente a eventos externos determinados.

Este mecanismo pode ser simples, como a resposta a acetilcolina, onde seus receptores constituem canais que, mediante interação com o ligante, permite o movimento de íons e altera o potencial elétrico destas células; ou mais complexos, quando há ativação/inibição de proteínas por modificações covalentes. Estas modificações são, em maioria, frutos de fosforilações sítio-específicas de proteínas, acoplando as interações receptor-ligante a outros muitos eventos intracelulares em forma de cascatas de ativação/inibição.

4.5 Quinases e Fosfatases: Ativação transiente de vias depende do balanço de fosforilação

As células eucarióticas respondem aos diversos estímulos do microambiente através da modulação de vias de transdução de sinais, a qual é dependente da modificação pós-tradução de proteínas. Dentre as diferentes modificações pós-tradução, a fosforilação/desfosforilação é a principal forma de modulação covalente rápida e reversível de proteínas (Manning *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004). A fosforilação de uma proteína pode criar um novo sítio de reconhecimento para interações proteína-proteína, controlar a estabilidade proteica e, mais importante, pode regular a atividade enzimática.

Mecanismo de ativação transiente de proteínas perfaz uma estratégia natural capaz de modificar covalentemente proteínas-alvo, alterando sua estrutura tridimensional de acordo com suas demandas. Estes mecanismos promovem a atividade/inibição de enzimas regendo o tempo e direção de determinadas cascatas de sinais. Neste cenário, quinases são as proteínas responsáveis pela incorporação do grupamento fosfato em seus substratos fisiológicos, modulando sua atividade. É condição *sine qua non* o gasto de ATP, molécula responsável pela “doação” do grupamento fosfato. Em outras palavras, podemos assumir que as quinases, de uma forma geral, são transferases responsáveis pela transferência de fosfato (grupamento fosforil) da molécula de ATP para resíduos específicos de seus substratos: tirosina e serina/treonina.

Desta forma, a fosforilação de resíduos de tirosina, serina e/ou treonina mediada pelo balanço entre a ação de proteínas quinases e proteínas fosfatases (**Figura 1**), é reconhecidamente crucial na geração e regulação de sinais necessários para a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morte celulares. Nesse contexto, mudanças anormais na atividade dessas enzimas podem proporcionar consequências graves, que incluem neoplasias, diabetes, obesidade, inflamação, doenças imunológicas, neurodegenerativas e doenças parasitárias (Ferreira *et al.*, 2006).

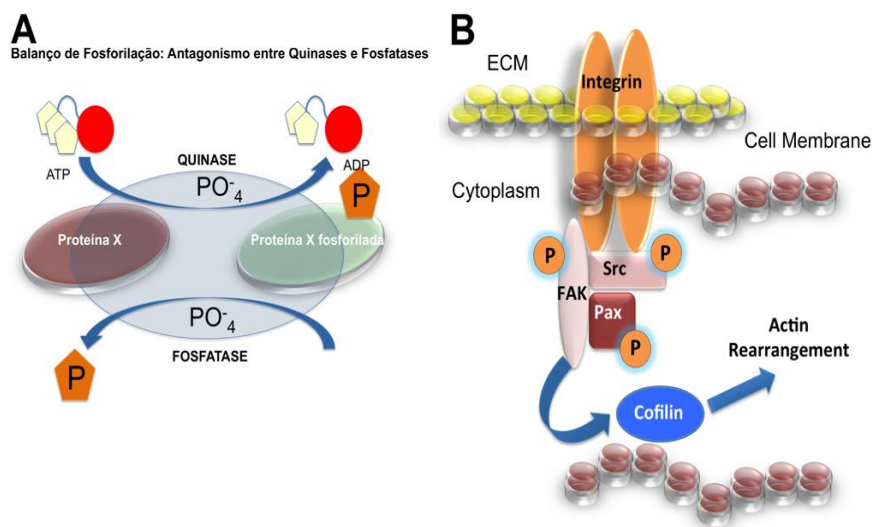


Figura 1: Mecanismos intracelulares decorrentes da adesão celular. **A)** Note os papéis antagônicos de quinases e fosfatases: Enquanto as quinases transferem um grupamento fosfato do ATP para seu substrato fisiológico, gerando um produto fosforilado e ADP, as fosfatases fazem justamente o papel inverso, desfosforilando moléculas fosforiladas. Este mecanismo é finamente regulado e utilizado pelos mecanismos de transdução de sinais intracelulares. Em outras palavras, as células utilizam estas modificações covalentes pós-traducionais para regular as cascatas de sinalização, bem como definir seu tempo de ação. **B)** Note-se que as integrinas ligam o ambiente extracelular com o citoesqueleto, ancorando as células. Após a ativação das integrinas, moléculas de sinalização são recrutadas para estruturas de adesão focal que promovem a fosforilação de FAK, Src, paxilina e, ao final desta cascata, a cofilina. Em resposta a estímulos, cofilina promove a regeneração dos filamentos de actina, rearranjando-os. Estas alterações do citoesqueleto são responsáveis por adaptações celulares a superfícies diferentes. **Fonte:** adaptado de Zambuzzi *et al.*, 2011.

4.6 Conceito Quinoma

O quinoma corresponde ao complemento funcional do proteoma, através de enzimas capazes de fosforilar, as quinases (Gomase & Tagore, 2008). Manning *et al.* identificaram 518 genes no genoma humano que codificam proteínas contendo domínios catalíticos quinásicos. Esses genes foram classificados em duas famílias principais: ePK e aPK. A primeira agrupa todas as enzimas que possuem o domínio catalítico das quinases de eucariotos, correspondendo a 478 genes.

A segunda família contém todas as quinases que não possuem esse domínio, mas que apresentam atividade quinásica, sendo, portanto, chamadas de atípicas e totalizando 40 genes. Como cada uma das 518 proteínas quinases catalisa a fosforilação de um conjunto distinto de substratos, é possível construir redes complexas interligando a atividade de uma quinase a toda uma cascata de reações e a uma resposta celular.

Classicamente, as reações de fosforilação são estudadas por métodos bioquímicos bastante laboriosos, como mapeamento de peptídeos, análise de fosfoaminoácidos e purificação de quinases. Apesar de essas técnicas terem permitido a obtenção de informações previamente indisponíveis e ainda hoje apresentarem utilidade, o desafio que se apresenta no mapeamento das redes de sinalização protagonizadas pelas enzimas integrantes do quinoma possui uma escala que demanda o uso combinado de diferentes técnicas (Johnson & Hunter, 2005; Milani *et al.*, 2010).

Uma delas, o *screening* via arranjo de proteínas, é capaz de responder não só qual é o substrato que uma determinada quinase é capaz de fosforilar, mas quais são as quinases expressas e ativas numa determinada condição celular, o que permite associar as vias de sinalização ativas numa célula com os processos biológicos apresentados por ela. Essa abordagem busca integrar vários eventos celulares envolvendo quinases

considerando que o conjunto deles é responsável pelo fenótipo celular, culminando numa abordagem sistêmica da sinalização celular (Milani *et al.*, 2010).

Assim, nós exploramos um modelo tridimensional *in vitro* usando Matrigel® a 37°C. Em primeiro lugar, os nossos resultados mostraram que este modelo *in vitro* provocou alterações morfológicas drásticas nos osteoblastos. Depois disso, cultivando os pré-osteoblastos neste modelo por 10 dias, decidimos estudar as vias moleculares globais envolvidas, explorando o conceito quinoma dessas células utilizando agregados peptídicos que exibem mais de 1000 substratos de quinase diferentes e criando, assim, as descrições completas das redes quinômicas envolvidas com a plasticidade celular durante adaptação em substratos orgânicos. Do nosso ponto de vista, estes resultados abrem novos caminhos para entender as alterações morfológicas em osteoblastos.

Uma via molecular e pode ser explorado para compreender os requisitos morfológicos necessários durante a adaptação dos osteoblastos em substratos tridimensionais. Além disso, estes resultados podem apoiar o desenvolvimento de novos biomateriais servindo como um modelo versátil para desconstruir a complexidade das interações célula-MEC naturais no osso.

5 HIPÓTESE

H0: Mecanismos intracelulares distintos não estão envolvidos com a plasticidade celular em diferentes substratos.

H1: Mecanismos intracelulares distintos estão envolvidos com a plasticidade celular em diferentes substratos.

6 OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi investigar as vias de transdução de sinais envolvidas com a adaptação de pre-osteoblastos em *scaffold* orgânico (Matrigel®). Especificamente analisamos:

- I. Estabelecer um modelo biológico capaz de promover alterações metabólicas de osteoblastos;
- II. Investigar alteração morfológica através de microscopia convencional;
- III. Investigar a atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) em mecanismos de adaptação celular neste modelo biológico;
- IV. Investigar viabilidade celular através do ensaio de MTT;
- V. Investigar vias de metabolismo celular através do Pepchip.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

Nós exploramos um sistema de modelo tridimensional *in vitro* para avaliar alterações morfológicas de osteoblastos a fim de contrastar com perfis quinoma com o intuito de obter uma visão sobre as mudanças quinásicas associadas a este evento. Neste sentido, para melhor compreensão, a **Fig. 2** mostra esquematicamente a configuração e cronograma dos experimentos desenvolvidos.

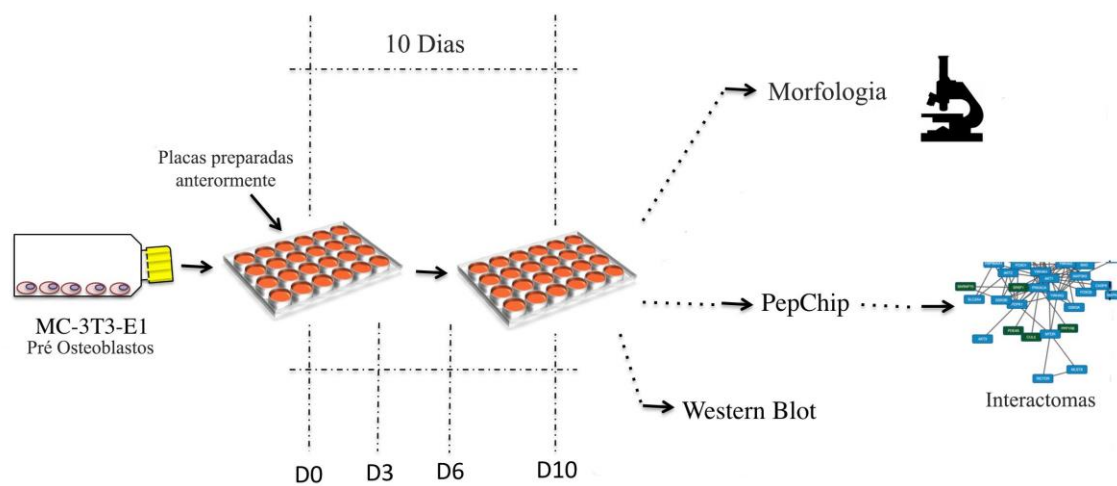


Figura 2. Esquematização do procedimento experimental e linha do tempo experimental. A fim de avaliar a rede de proteínas de sinalização responsáveis pelas alterações morfológicas dos osteoblastos cultivados em modelo tridimensional *in vitro*, decidimos semear as células no Matrigel® e avaliar depois de 10 dias a adaptação dos osteoblastos. Com troca de meio a cada 3 dias (D3 e D6).

7.1 Reagentes.

β -Glicerofosfato, ascorbato, p-nitrofenil-fosfato (pNPP), Hematoxilina e Eosina, DMSO foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EUA); meio α -Minimum Essential Medium foi de Nutricel (Campinas, São Paulo, SP, Brasil); Matrigel® foi obtido a partir da R&D (R&D Systems Inc., Minneapolis). MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazólio] foi de Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA, EUA). Os componentes gerais de cultura de células foram adquiridos da Boio-me (Greiner Bio-One Alemanha). Os reagentes de imunoblotting foram adquiridos da Millipore (Millipore Corporate Headquarters,

Billerica, MA, EUA). Anticorpos foram adquiridos a partir de Cell Signaling Technology (Boston, MA, EUA).

7.2 Cultura de células e protocolo de aquisição de mudança morfológica de osteoblastos.

MC3T3-E1, uma linhagem celular de pré-osteoblastos, subclone 4, foi obtida a partir da ATCC (Manassas, EUA) foram cultivadas a 37°C em meio α -MEM suplementado com 10% de fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, e 100 μ g/mL de estreptomicina sob uma atmosfera de 5% de CO₂ umidificada. As células foram expostas a condições osteogênicas [β -glicerofosfato (10mM) + ascorbato (50 μ g/mL)]. Antes do experimento, um gel foi preparado na razão Matrigel®: α -MEM (2:1) e utilizado para revestir as placas de Petri (100mm de diâmetro) ou placas de 6 poços. Estas placas de petri foram mantidas a 37°C durante 3h antes de cada experimento, a fim de permitir a gelificação do Matrigel®. Em seguida, as células foram semeadas (5x10⁴ células/mL) e cultivadas durante 10 dias. O meio foi substituído a cada 3 dias. Avaliamos 3 condições experimentais:

1. Os pre-osteoblastos cultivados sobre poliestireno tratado (cultura celular convencional);
2. Células cultivadas em Matrigel® como um modelo in vitro tridimensional;
3. Pré-osteoblastos cultivados sobre Matrigel®, mas incubados com a condição de diferenciação de osteoblastos [Meio Osteogênico (MO): tratamento clássico com 50 μ g/ml de ascorbato + 10 mM de β -glicerofosfato].

7.3 Ensaio de viabilidade celular.

A fim de verificar a viabilidade das células, as células MC3T3-E1 (5x10⁴ células/mL) foram semeadas em placas de 24 poços respeitando os grupos experimentais listados durante 10 dias. Em seguida, o meio foi removido e foi adicionado 1 mL (1 mg/mL) de MTT a cada poço. Após incubação durante 4h à 37°C, o meio foi removido e o foi solubilizado em 1 mL de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA). Então, a placa foi agitada durante 10 min em um agitador de placas (Biotek, Winooski, VT, EUA) e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas

(Biotek, Winooski, VT, EUA).

7.4 Determinação da atividade de Fosfatase Alcalina (ALP).

As células MC3T3-E1 (5×10^4 células/mL) foram semeadas em placas de 06 poços e cultivadas durante 10 dias, respeitando as particularidades dos grupos experimentais. Em seguida, as células foram lavadas 1xPBS morno e o conteúdo celular incubado durante 30 min à temperatura ambiente com tampão de ensaio de fosfatase alcalina (1,5M de Tris-HCl [pH 9,0], 1 mM de $ZnCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$ e) contendo 1% (vol/vol) Triton X-100. Os extratos celulares foram recolhidos, centrifugados e utilizados para o ensaio da atividade enzimática. A atividade de ALP foi determinada utilizando 5 mM de p-nitrofenil-fosfato (pNPP) como substrato. Este resultado foi expresso em nanomoles de produtos formados por minuto por miligrama de proteína. A quantidade de proteína foi determinada pelo método Lowry's como modificado por Hartree (Hartree, 1972).

7.5 Western blot.

Respeitando os períodos e grupos experimentais, osteoblastos foram lisados utilizando um cocktail-lise [Tris 50 mM [tris (hidroximetil) aminometano]-HCl [pH 7,4], 1% (vol/vol) de Tween 20, 0,25% de desoxicolato de sódio, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA (ácido tetracético de etileno-glicol), 1 mM de O-vanadato, NaF 1 mM, + inibidores de protease [1 μ g/mL de aprotinina, 10 μ g/mL de leupeptina, e 1 mM de 4-(2-amino-etil)-benzolsulfonil-fluoreto-cloridrato], durante 2h mantido em gelo, como descrito anteriormente (de Souza Queiroz et al., 2007, Bispo de Jesus et al., 2008). Depois de centrifugado ($1,5 \times 10^4$ rpm), a quantidade de proteína foi determinada usando o método de Lowry modificado por Hartree (Hartree, 1972). Em seguida, um volume igual de Loading Buffer (Laemili Buffer) foi adicionado às amostras e aquecidas durante 5 min. As proteínas foram resolvidas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). A partir de agora, estas membranas foram bloqueadas com 1% de leite em pó ou albumina de soro bovino (2,5%) em solução salina tamponada com

Tris 1X isento de gordura (TBS), Tween 20 (0,05%, v/v) e incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário adequado em diluições de 1:1000.

Após lavagem em 3X TBS-Tween 20 (0,05%, v/v), as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase durante 1h. Após lavagem 3X em TBS, a detecção foi realizada usando quimioluminescência aumentada (ECL).

7.6 Fosfoproteoma (Pepchip ou arranjo de peptídeos).

A análise do Fosfoproteoma foi realizada como descrito por Milani et al. (2010). Resumidamente, osteoblastos foram lavados em PBS e lisados fazendo uso de tampão de lise completo não desnaturante. As matrizes de peptídeos (Pepscan, Lelystad, Holanda), contendo até 1024 diferentes substratos de quinase (em triplicata), foram incubadas com lisado celular durante 2h numa estufa umidificada a 37°C contendo ³³P-β-ATP. Posteriormente, as matrizes foram lavadas em 2M NaCl, 1% de Triton-X-100, PBS, Tween a 0,1% e H₂O, onde depois as matrizes foram expostas a um fosfo-scanner durante 72h e digitalizado em uma fosfo-Image (Fuji tempestade 860, de Stanford, GE, EUA) para análise da intensidade dos pontos. Para a análise, utilizando o coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para cada combinação de conjuntos e de agrupamento utilizando regime de agrupamento hierárquico Johnston. Para cada peptídeo, a média e o desvio padrão de fosforilação foi determinada e representada graficamente em uma forma hierárquica baseada em amplitude. Se apenas a fosforilação de fundo estava presente, esta distribuição com base na amplitude pode ser descrita por um único expoente. Os peptídeos em que a fosforilação média foi de menos 1,96 vezes o desvio padrão foi maior que o valor esperado descrevendo a distribuição de fundo, sendo considerado como verdadeiros eventos de fosforilação. Também foram realizados Testes-t heteroscedástico em cada conjunto de valores para determinar a significância (P <0,05).

7.7 Análise estatística.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados

apresentados nos gráficos representam as médias e os desvios padrão. Dados de viabilidade celular (avaliado por MTT) foram expressos como a média \pm DP de 3 experiências independentes realizadas em triplicata. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Western blots representam 3 experiências independentes.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Um eficaz modelo tridimensional in vitro para a aquisição de osteoblastos com alterações morfológicas.

Neste modelo, percebemos que os pré-osteoblastos cultivados sobre poliestireno exibiram características morfológicas típicas de osteoblastos (**Fig. 3A**), mas quando cultivadas no Matrigel® essas células apresentaram grandes mudanças morfológicas (**Fig. 3B**), especialmente quando expostas a um meio osteogênico (**Fig. 3C**), onde as células apresentaram longos prolongamentos citoplasmáticos.

Normalmente, prolongamentos são lançados como estratégia de adaptação celular; trata-se de uma manobra biológica para identificar células vizinhas, o que impacta sobremaneira em eventos de adesão e diferenciação celular (Masuda *et al.*, 1998).

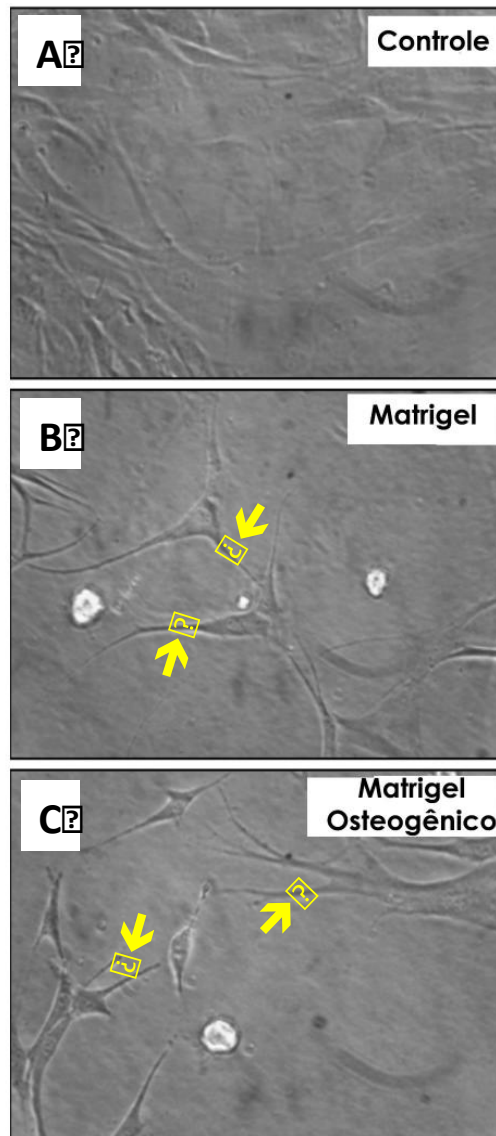


Figura 3. Modelo tridimensional *in vitro* para a obtenção de osteoblastos com alterações morfológicas. Antes da experimentação, um gel foi preparado por mistura de Matrigel®: α - MEM (2:1), e foi utilizado para revestir as placas de Petri (100 mm de diâmetro) ou 6 placas de poços. Essas placas foram mantidas a 37°C durante 3h. Em seguida, as células foram semeadas (5×10^4 células/ml) e cultivadas durante 10 dias. (A) Morfologia apresentada por MC3T3-E1 células pré-osteoblastos cultivados em poliestireno, Matrigel® ou Matrigel®/Meio osteogênico (OM).

Ao verificar as alterações morfológicas diferencial aos diferentes grupos analisados, decidimos investigar a viabilidade destas células pela metodologia de MTT. Nossos resultados mostraram que houve alteração no perfil de atividade mitocondrial, partindo de 100% no grupo controle para aproximadamente 80% para as células mantidas sobre o Matrigel® e aproximadamente 60% em osteoblastos cultivados sobre Matrigel® e sob condições de diferenciação (**Fig. 4**). Este perfil apontado no gráfico pode ser encarado de 2 maneiras:

1. O modelo experimental está afetando o metabolismo normal destas células e promovendo morte celular;
2. O modelo experimental analisado está afetando a uma diminuição na taxa de proliferação celular, o que pôde ter acarretado a uma significativa redução na atividade mitocondrial.

Normalmente, em eventos onde a resposta metabólica ao habitat celular é a plasticidade que leva a diferenciação com redução na taxa de proliferação celular. Em outras palavras, a proliferação e diferenciação celular são eventos biológicos consequentes e opostos. Durante a diferenciação de osteoblastos, a dosagem da atividade de Fosfatase Alcalina tem sido considerada biomarcador clássico deste mecanismo. Assim, para validar nossa hipótese da 2ª. maneira (acima), decidimos dosar a atividade de ALP nos modelos experimentais.

Nossos resultados comprovaram nossa hipótese. A **Fig. 5** mostra que, embora houvesse uma redução na atividade mitocondrial no grupo onde as células foram cultivadas sob condições de diferenciação, identificamos um aumento expressivo na atividade de ALP (> 3,5 vezes comprado ao controle). Concluindo este ponto de discussão, salientamos que os mecanismos ambientais analisados neste trabalho afetam a proliferação celular transitando para metabolismo de diferenciação.

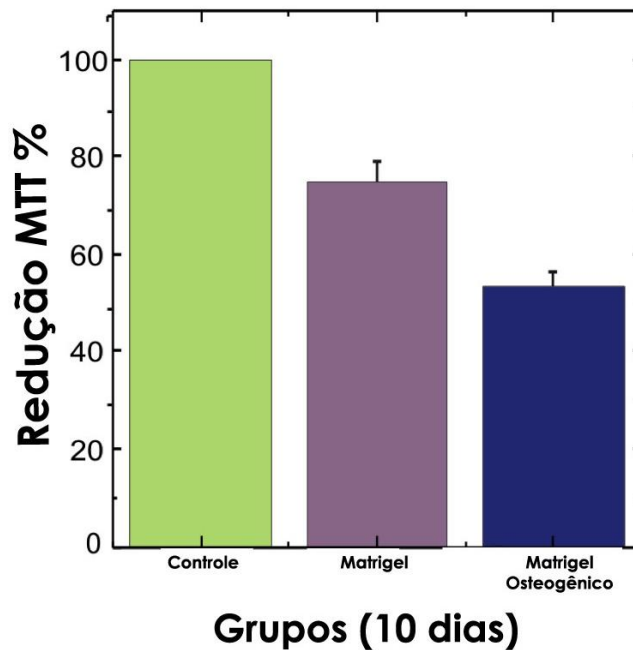


Figura 4: Gráfico do teste de viabilidade celular. Após verificarmos mudanças morfológicas envolvidas com a adaptação de osteoblastos sobre substrato orgânico, decidimos avaliar a viabilidade destas células através do ensaio MTT. Células foram cultivadas por 10 dias, respeitando os grupos experimentais e, após este período, foram incubadas com o corante vital, que avalia atividade de desidrogenases na mitocôndria. Com a atividade de desidrogenases, o sal é reduzido a formazano, um corante precipitado que pode ser eluído por álcool absoluto, como descrito em detalhes em Materiais e Métodos. O gráfico mostra que houve diferença na atividade mitocondrial, sendo que osteoblastos sob condição de diferenciação apresentaram uma menor atividade. Esse evento pode estar envolvido com a diminuição da taxa de proliferação celular, pré-requisito para a diferenciação.

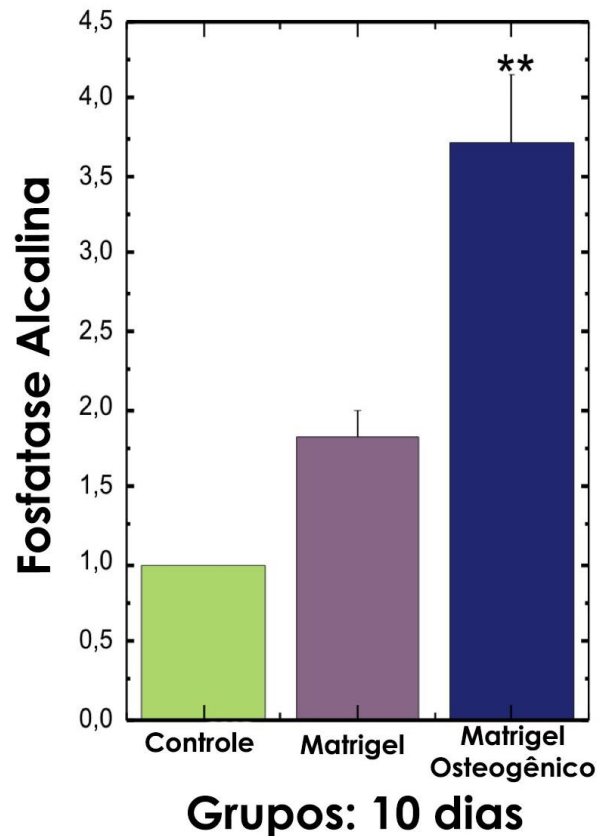


Figura 5: Gráfico de Fosfatase alcalina (ALP). No tocante a diferenciação de osteoblastos, sabe-se que a fosfatase alcalina desempenha função de destaque e pode ser analisada como biomarcador deste evento. Como descrito em Materiais e Métodos em maiores detalhes, as células foram cultivadas respeitando os períodos e grupos experimentais e, após, as células foram lisadas com tampão apropriado para ensaio enzimático, o qual fora incubado com pNPP (substrato sintético de fosfatases) e cloreto de magnésio, cofator enzimático da reação. Ensaio de atividade de ALP foi realizada utilizando pNPP como substrato, em pH alcalino. Nossos resultados de atividade de ALP mostra que houve diferenças significantes entre os grupos avaliados. Este resultado corrobora com o resultado do ensaio de viabilidade celular, apresentado na Fig. 4.

8.2 Geração de perfis quinômicos de osteoblasto cultivados sobre Matrigel®.

Tendo estabelecido um modelo *in vitro* que permitisse aos osteoblastos alterações morfológicas significantes, propomo-nos caracterizar em detalhe as alterações bioquímicas que acompanham este evento e determinar cascatas de transdução de sinal. As células foram semeadas conforme grupos experimentais por 10 dias e os perfis quinoma foram gerados por incubação dos lisados celulares em conjuntos experimentais de substratos (sequência consenso) de quinase com ^{33}P -ATP- β . Estas matrizes incorporaram quantidades substanciais de radioatividade (**Figura 6**) que está envolvida com a incorporação covalente da porção fosfato terminal do ATP em substratos peptídicos específicos. A qualidade técnica dos perfis foi adequada, aqui avaliada pela correlação de Pearson, onde a correlação do produto foi $>0,85$ entre as réplicas em todos os grupos experimentais (**ANEXO, Figura S1**). Assim, os perfis obtidos são considerados válidos.

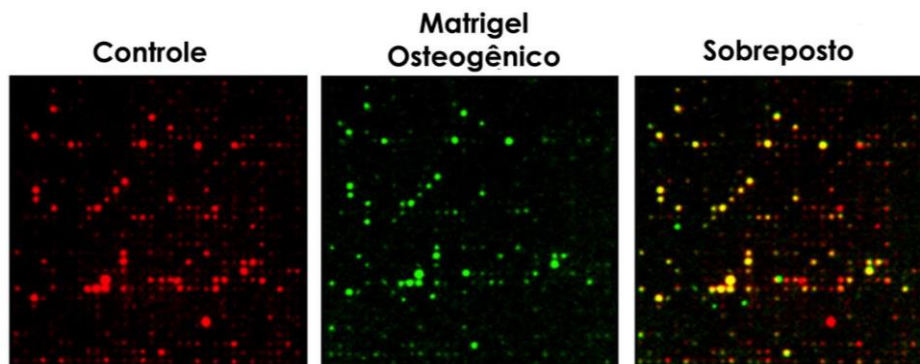


Figura 6. Geração de perfis quinômicos responsáveis pelas alterações morfológicas dos osteoblastos. A figura mostra que as matrizes incorporaram quantidades substanciais de fosfato radioativo. Após o período de incubação com meio de reação, como descrito em Materiais e Métodos, as lâminas foram scaneadas e fosfo-imagens foram registradas. Os spots representam atividade quinásica correspondente a base de dados estabelecidos em grid anteriormente definido. No controle, os spots estão mostrados em vermelho e no grupo onde os osteoblastos foram tratados com MO, estão representados em verde. Na figura à direita, encontra-se as 2 matrizes anteriormente citadas sobrepostas, onde, spots vermelhos denotam quinases envolvidas apenas no grupo controle, spots verdes quinases envolvidas apenas no grupo tratado com MO e spots amarelos representam quinases comumente ativadas em ambos os grupos.

8.3 Alteração morfológica de osteoblastos está associado à redução de mecanismos de transdução de sinal celular.

Para analisar as mudanças no fosfoproteoma associado com as alterações morfológicas de osteoblastos, primeiro determinamos o número de substratos fosforilados significativamente para cada condição experimental. Isso foi analisado para cada peptídeo, em cada condição experimental (a lista completa dos resultados em ANEXO - Tabela S1).

Observa-se que alterações morfológicas de osteoblastos são acompanhadas por uma regulação substancialmente negativa de sinalização celular. Considerando que as células do grupo controle exibiram fosforilação de 302 substratos peptídicos, os lisados das células cultivadas em Matrigel® sustentaram a fosforilação de 242 substratos. Foi ainda mais reduzida em osteoblastos nas culturas em Matrigel® e também incubadas com meio osteogênico, ao mesmo tempo, resultando em um perfil de fosforilação em apenas 173 substratos (**Fig. 7A**), os quais estavam envolvidos com comunicação celular, síntese e processamento de ácidos nucleicos, metabolismo energéticos, processamento de síntese de proteínas, armazenamento e transporte (**Fig. 7B**).

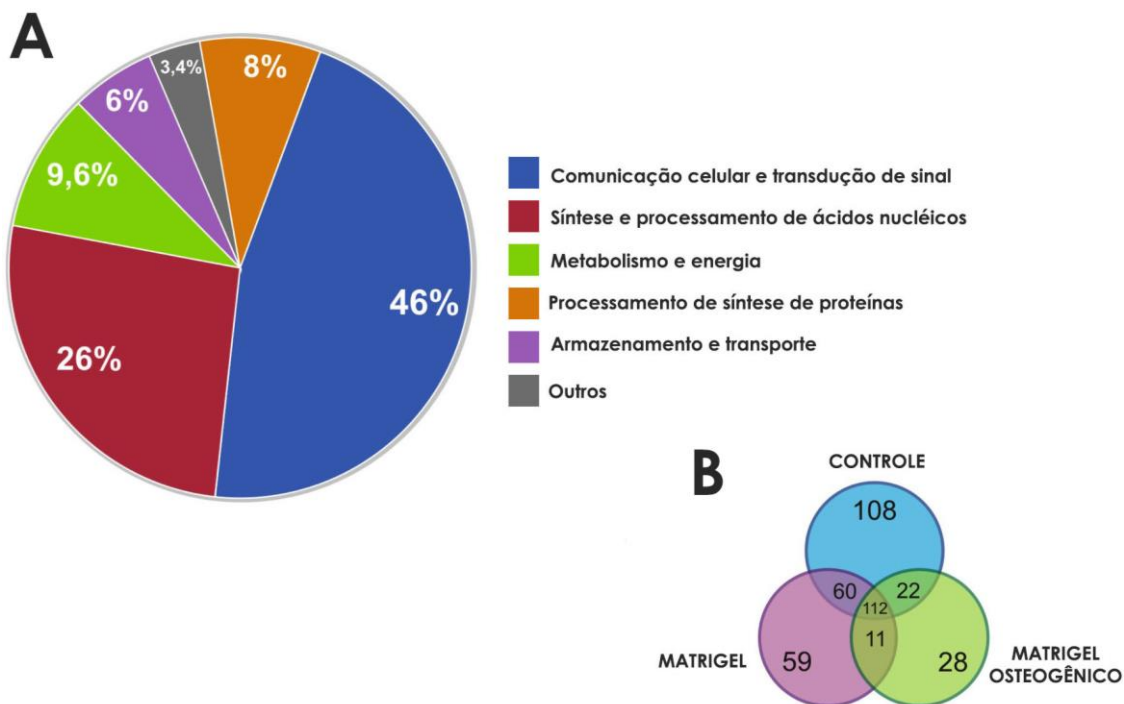


Figura 7: Distribuição de quinases envolvidas nos grupos avaliados. Perfis quinômicos foram gerados através da incubação de lisados celulares de diferentes grupos experimentais exibindo 976 diferentes substratos de quinase com ^{33}P - β -ATP. **A)** utilizando a ontologia do gene, estes substratos foram agrupados dependente a sua função na fisiologia celular; **B)** Diagrama de Venn de spots fosforilados.

8.4 Fosfoproteoma diferencial durante a alteração morfológica dos osteoblastos.

Perfis das quinases foram realizados e os pontos identificados como uma quinase responsável pelo evento de fosforilação específico, seguindo-se pelo substrato fosforilado. FC indica a mudança individual para cada spot colorido (**Fig. 8**). Nossos resultados apontaram para 84 substratos os quais mostram uma atividade significativamente diferencial durante alterações morfológicas dos osteoblastos ($p < 0,05$). Usando a ontologia gênica fornecida pelo banco de dados de referência de proteína, estes substratos foram agrupados em função celular. Além disso, os substratos foram agrupados em cascatas de fosforilação específica, apontando as atividades de quinase reguladas positiva ou negativamente durante a mudança morfológica dos osteoblastos.

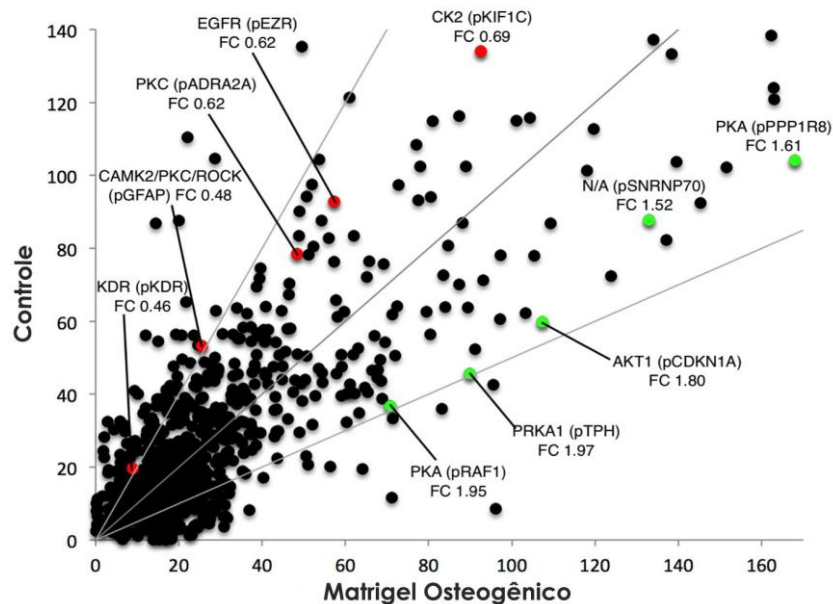


Figura 8: Perfis quinoma foram gerados através da incubação de lisados celulares de diferentes grupos experimentais exibindo 976 diferentes substratos de quinase com 33P-g-ATP. A intensidade média para todas as fosforilações das 1024 PepChip de quinases e substratos. Pontos coloridos identificam os pontos que apresentaram repetições consistentes em experimentos PepChip ($p < 0,05$). Vermelho significa menos fosforilada ($FC < 0,5$) e verde significa mais fosforilada ($FC > 1,5$) do que a amostra de controle. Linhas cinzas representam Fold Change = 0,5; 1; 2, de cima para baixo. Pontos são identificados pela quinase responsável pelo evento de fosforilação, seguindo-se o substrato fosforilado (indicado por "P"). FC indica a mudança de dobragem individual para cada mancha colorida.

Depois disso, decidimos fazer interactomas com o intuito de construir vias inteiras de sinalização celular e identificamos vias específicas importantes, a saber:

1. Via envolvendo a proteína tirosina fosfatase SHP2. (Fig. 9) O envolvimento de PTPs nestes eventos nos define mecanismos moleculares altamente controlados, visto que PTPs exercem função antagonica as vias de fosforilação clássica, são as PTPs as hidrolases responsáveis pela desfosforilação de sítios específicos em resíduos de tirosina (Ferreira *et al.*, 2006; Zambuzzi, Milani & Teti, 2010). O balanço da fosforilação de resíduos de tirosina é de extrema importância para internalização de sinais envolvidos com interação célula/célula, bem como em resposta a ligantes responsáveis pelos sinais envolvidos com proliferação celular e sobrevivência (Ferreira *et al.*, 2006; Zambuzzi, Milani & Teti, 2010). Estes dados estão em consonância aos resultados já mostrados anteriormente neste trabalho onde mostramos que 46% das vias envolvidas durante mecanismos de adaptação de osteoblastos em substratos orgânicos estão relacionadas a comunicação célula/célula.

2. Via envolvendo a proteína Retinoblastoma (Rb). (**Fig. 10A**) A proteína Rb é um supressor de tumor, que desempenha um papel crucial no controle negativo do ciclo celular. Tem sido demonstrado que a proteína Rb é responsável por um importante ponto de controle em G1, bloqueando a entrada na fase S e o crescimento celular (Hutcheson, Witkiewicz & Knudsen, 2015). Neste sentido, a proteína Rb tem sido apontada como proteína-chave em vários processos de diferenciação celular, incluindo neurônios, epiderme, melanócitos, células ciliadas, músculo e fígado. A evidência mais convincente da importância de Rb na diferenciação celular vem de estudos de camundongos *knockout* para Rb, em que as interrupções do gene causam a morte por Rb no 14º. dia de gestação, associadas a defeitos no desenvolvimento do sistema hematopoiético e no sistema nervoso central (Lee et al., 1992). Além da diminuição de Rb, nossos resultados mostram que durante a mudança morfológica dos osteoblastos temos uma regulação negativa de quinases relacionadas com o ciclo celular, como mostrado na **Fig. 10B**.

Este é um ponto importante uma vez que mostramos em nosso modelo, o aumento da atividade de ALP, um marcador da diferenciação de osteoblastos. Assim, podemos associar o resultado de diferenciação destas células com o aumento da via de sinalização celular envolvendo Rb.

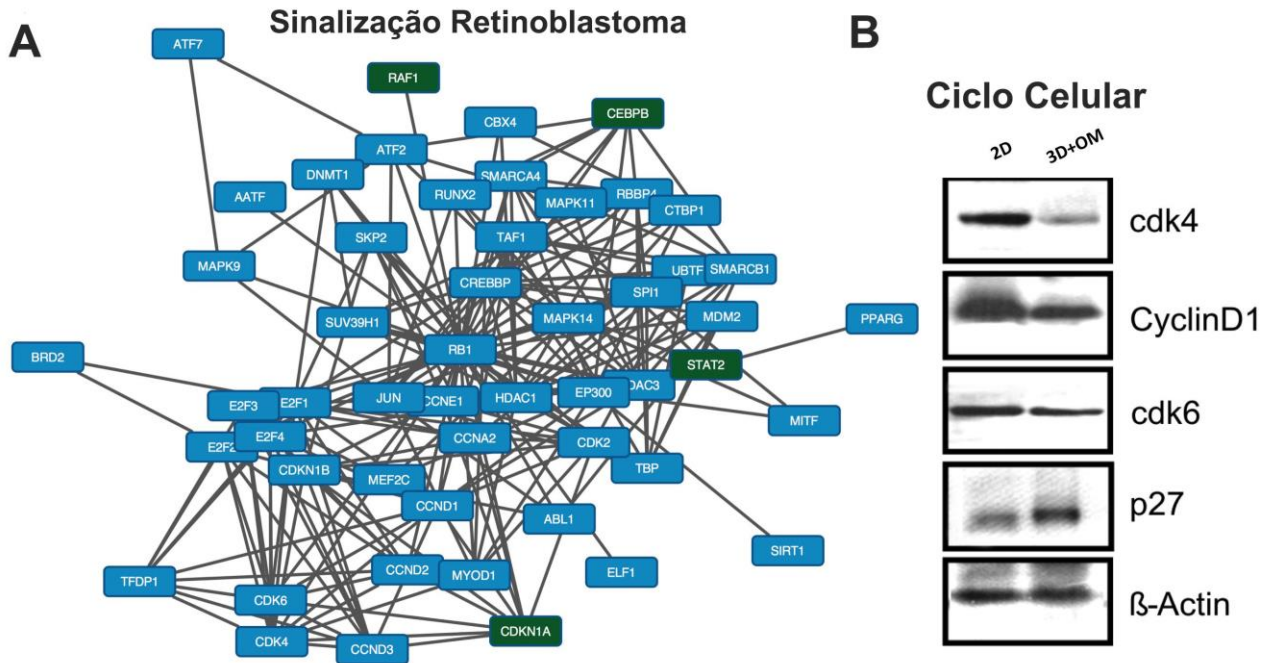


Figura 10. Rede de interação de proteínas. Representando as proteínas na via de "Regulação da proteína do retinoblastoma", extraída do banco de dados NCI-Pathway (Schaefer *et al.*, 2009) como relevantes para a lista de proteínas com perfis de fosforilação alterados ($p < 0,05$); **(A)** destacadas em verde são proteínas a partir da lista. As proteínas são representadas por nomes de genes. A rede foi gerada por Cytoscape 3.1.1 (Su *et al.*, 2014) com o *plugin* Jepetto (Winterhalter *et al.*, 2014); **(B)** os resultados da matriz peptídeo foi confirmada utilizando a tecnologia convencional.

3. Via envolvendo sinalização SMAD2/3 (Fig. 11). A sinalização envolvendo o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β)/proteína morfogênica do osso (BMP) está envolvida na maioria de processos celulares e vem sendo demonstrado ser fundamentalmente importante ao longo da vida (Derynck R & Zhang, 2003). TGF- β /BMPs são reconhecidos em biologia óssea por desempenhar papéis na diferenciação de osteoblastos durante o desenvolvimento de mamíferos e exibem funções de regulação versáteis (Carreira *et al.*, 2014; Carreira *et al.*, 2015). Sinalização de transdução por TGF- β / BMPs é especificamente dependente de vias canônicas envolvendo SMAD ou vias de sinalização não-canônicas, conhecido como SMAD - independente (por exemplo p38, via MAPK) (Carreira *et al.*, 2014; Carreira *et al.*, 2015). Mais uma vez, como mostrado anteriormente, mostramos que a adaptação celular no modelo investigado leva a vias de sinalização envolvendo a diferenciação celular.

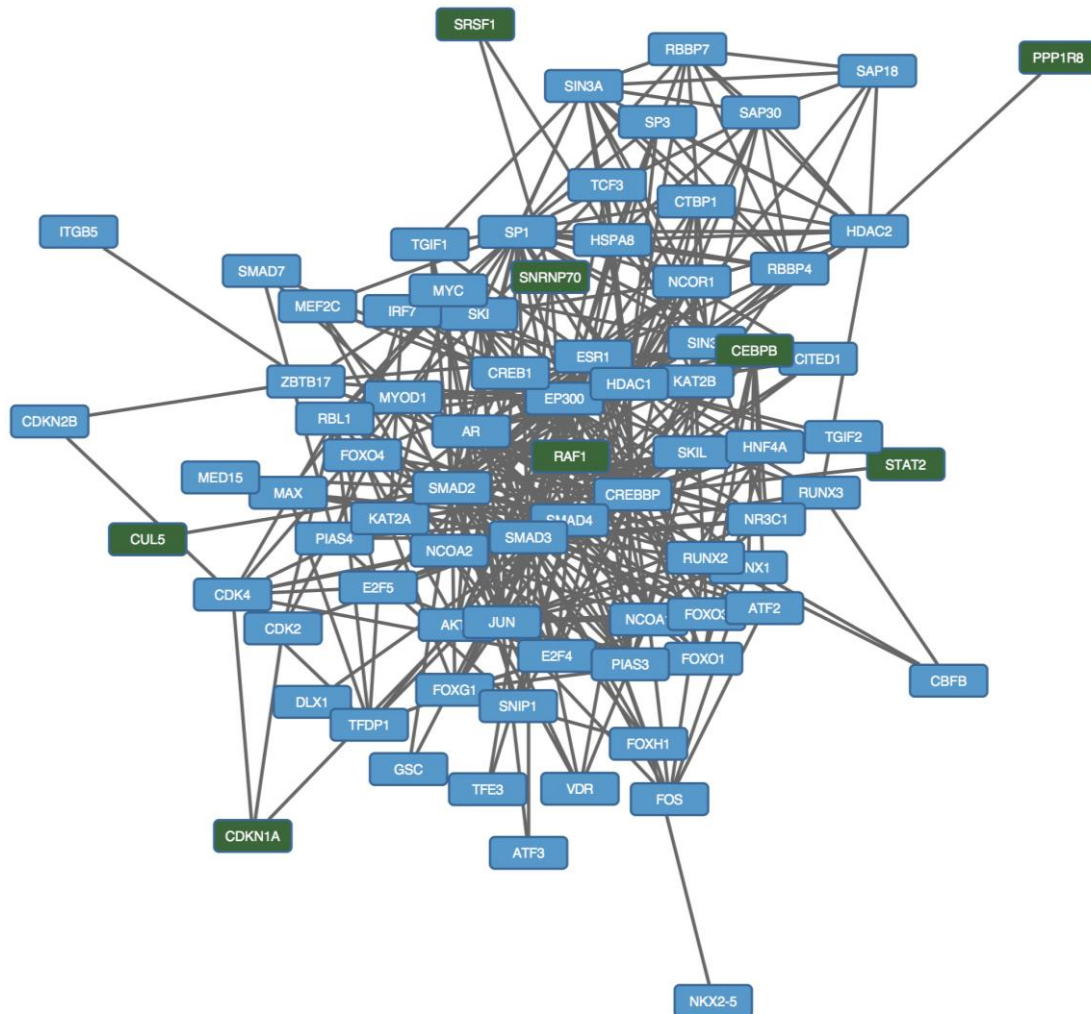


Figure 11. Rede de interação de proteínas. Representando as proteínas da via de “Regulação de sinalização do Smad2/3 nuclear”, extraídos do banco de dados NCI-Pathway (Schaefer *et al.*, 2009) como relevantes para a lista de proteínas com perfis de fosforilação alterados ($p < 0,05$). Destacadas em verde são proteínas a partir da lista. As proteínas são representadas por nomes dos genes. A rede foi gerada por Cytoscape 3.1.1 (Su *et al.*, 2014) com o plug-in Jepetto (Winterhalter *et al.*, 2014).

5. Via envolvendo PI3K-Akt (Fig. 13A). Identificação da via PI3K/Akt começou no início de 1980 através de tentativas para caracterizar a sinalização do receptor de insulina (Alessi 2001; Brasil e Hemmings 2001). Com a descoberta da contribuição de PI3K e Akt na tumorigênese, intensa investigação sobre a regulação desta via conduziu à descoberta de reguladores negativos, como é o caso da proteína fosfatase 2A (PP2A), PTEN, dentre outras. Atualmente, sabemos que esta via está correlacionada com vias de sobrevivência celular, envolvida, sobretudo com mecanismos que levam a ativação de mTOR em eventos de síntese proteica (Wang & Proud, 2006). Nossos resultados, obtidos pela análise global das quinases, bem como sua validação através de *western blotting* (Fig. 13B), mostram que nos mecanismos de adaptação celular e diferenciação no modelo investigado houve uma queda nesta via de sinalização, apontando para uma diminuição em vias de sobrevivência, o que, em muitos casos pode levar a mecanismos de morte celular, como apoptose. Uma justificativa neste caso seria que as células alcançaram sua maturidade extrema e que agora poderiam estar em um *checkpoint* importante: ou seguiria diferenciada, expressando proteínas relacionadas ao tecido, ou entraria em eventos de morte. Para uma conclusão acerca destes mecanismos, novos estudos precisam ser conduzidos fazendo uso de um *timeline* mais extenso.

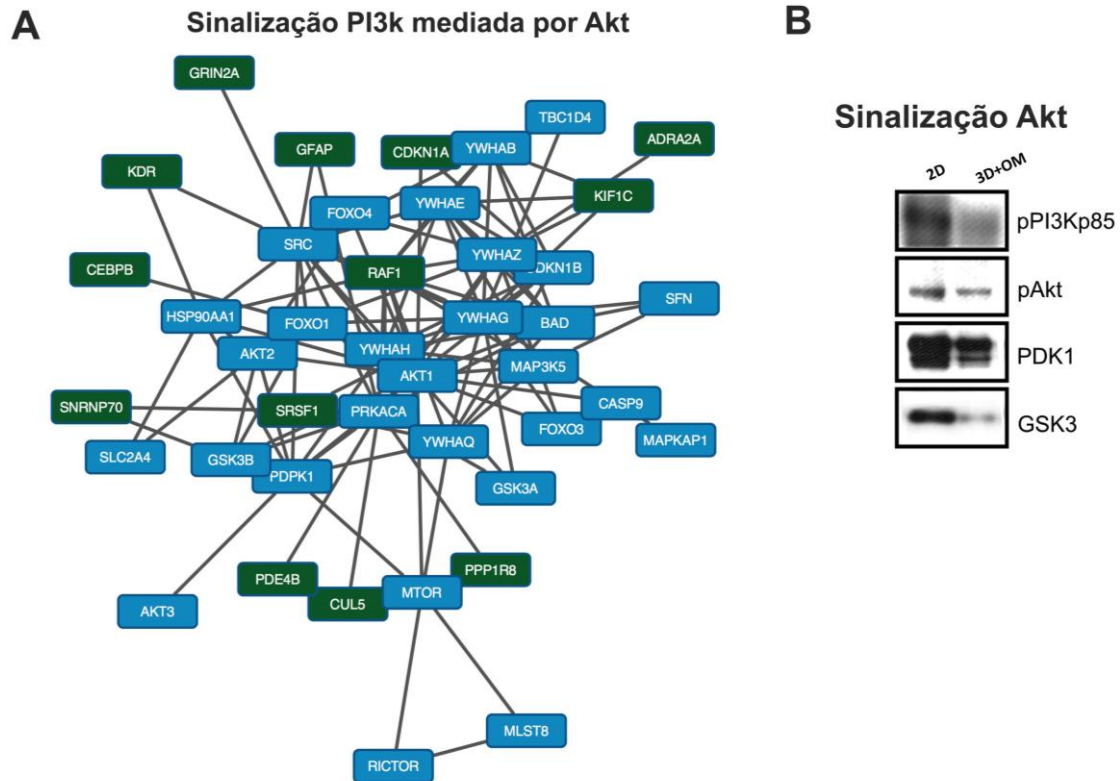


Figura 13. Rede de interação de proteína. Representando as proteínas na via de "sinalização Classe I PI3K em eventos mediados por Akt", extraída do banco de dados NCI-Pathway (Schaefer *et al.*, 2009) como relevantes para a lista de proteínas com perfis de fosforilação alterados ($p < 0,05$); **(A)** Destacadas em verde são proteínas a partir da lista. As proteínas são representadas por nomes dos genes. A rede foi gerada por Cytoscape 3.1.1 (Su *et al.*, 2014) com o *plugin* Jepetto (Winterhalter *et al.*, 2014); **(B)** os resultados da matriz peptídeo foi confirmada utilizando a tecnologia convencional.

9 CONSTATAÇÕES

Diante dos resultados obtidos, nossas constatações foram:

- I. Pré-osteoblastos cultivados sobre *scaffolds* sofrem profundas alterações morfológicas;
- II. Pré-osteoblastos cultivados sobre *scaffolds* permanecem viáveis, embora com via PI3K-Akt diminuída;
- III. Pré-osteoblastos cultivados sobre *scaffolds* tornam-se diferenciados em 10 dias;
- IV. Os mecanismos intracelulares desencadeados durante o fenótipo encontrado neste modelo são finamente modulados por quinases específicas, destacando vias de sinalização acerca de comunicação celular, metabolismo energético, entre outras.

10 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados levam-nos a concluir que os eventos celulares de adaptação ao substrato colagênico (*scaffold*) é determinado por um conjunto específico de proteínas intracelulares, estabelecendo um mapa metabólico distinto.

11 BIBLIOGRAFIA

ALESSI DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans.* v.29(Pt 2); p.1-14; 2001.

ALONSO A, SASIN J, BOTTINI N, FRIEDBERG I, FRIEDBERG I, OSTERMAN A, GODZIK A, HUNTER T, DIXON J, MUSTELIN T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.* v.117(6); p.699-711; 2004.

ASPENBERG P. Special Review: Accelerating fracture repair in humans: a reading of old experiments and recent clinical trials. *Bonekey Rep.* v.2; p.244; 2013.

BERTAZZO S, ZAMBUZZI WF, CAMPOS DD, FERREIRA CV, BERTRAN CA. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clin Oral Implants Res.* v.21(12); p.1411-3; 2010.

BERTAZZO S, ZAMBUZZI WF, DA SILVA HA, FERREIRA CV, BERTRAN CA. Bioactivation of alumina by surface modification: a possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. *Clin Oral Implants Res.* v.3; 288-93; 2009.

BISPO DE JESUS M, ZAMBUZZI WF, SOUSA RRR, ARECHE C, SOUZA ACS, AOYAMA H. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells. *Biochimie.* v.90; p.843-854; 2008.

BLUMENTHAL NM, ALVES ME, AL-HUWAIS S, HOFBAUER AM, KOPERSKI RD. Defect-determined regenerative options for treating periodontal intrabony defects in baboons. *J Periodontol.* v.74(1); p.10-24; 2003.

BRAZIL DP, HEMMINGS BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* v.26(11); p.657-64; 2001.

CAO L, WERKMEISTER JA, WANG J, GLATTAUER V, MCLEAN KM, LIU C. Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles. *Biomaterials.* v.35(9); p.2730-42; 2014.

CARREIRA AC, ZAMBUZZI WF, ROSSI MC, ASTORINO FILHO R, SOGAYAR MC, GRANJEIRO JM. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone

Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitam Horm.* v.99; p.293-322; 2015.

DE OLIVEIRA DEMARCHI AC, ZAMBUZZI WF, PAIVA KB, DA SILVA-VALENZUELA MD, NUNES FD, DE CÁSSIA SÁVIO FIGUEIRA R. Development of secondary palate requires strict regulation of ECM remodelling: sequential distribution of RECK, MMP-2, MMP-3, and MMP-9. *Cell Tissue Res.* v.340; p.61-9; 2010.

DE SOUZA QUEIROZ KC, ZAMBUZZI WF, SANTOS DE SOUZA AC, DA SILVA RA, MACHADO D, JUSTO GZ. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett.* v.258; p.126-134; 2007.

DERYNCK R, ZHANG YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* v.425(6958); p.577-84; 2003.

DICKINSON DP, COLEMAN BG, BATRICE N, LEE J, KOLI K, PENNINGTON C, SUSIN C, WIKESJÖ UM. Events of wound healing/regeneration in the canine supraalveolar periodontal defect model. *J Clin Periodontol.* v.40(5); p.527-41; 2013.

EOM YW, OH JE, LEE JI, BAIK SK, RHEE KJ, SHIN HC, KIM YM, AHN CM, KONG JH, KIM HS, SHIM KY. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* v.28; p.16-22; 2014.

EVANS CH. Advances in regenerative orthopedics. *Mayo Clin Proc.* v.88(11); p.1323-39; 2013

FERREIRA CV, JUSTO GZ, SOUZA AC, QUEIROZ KC, ZAMBUZZI WF, AOYAMA H, PEPPELENBOSCH MP. Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives. *Biochimie.* v.88(12); p.1859-73; 2006.

GEMINI-PIPERNI S, TAKAMORI ER, SARTORETTO SC, PAIVA KB, GRANJEIRO JM, DE OLIVEIRA RC. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Arch. Biochem. Biophys.* v.561; p.88-98; 2014.

GOMASE VS, TAGORE S. Kinomics. *Curr Drug Metab.* v.9(3); p.255-8; 2008.

HARTREE, E.F. Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a

linear photometric response. *Anal. Biochem.* v.48; p.422-427; 1972.

HUEBSCH N, MOONEY DJ. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature.* v.462(7272); p.426-432; 2009.

HUTCHESON J, WITKIEWICZ AK, KNUDSEN ES. The RB tumor suppressor at the intersection of proliferation and immunity: relevance to disease immune evasion and immunotherapy. *Cell Cycle.* v.14(24); p.3812-9; 2015.

JOHNSON SA, HUNTER T. Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods.* v.2(1); p.17-25; 2005.

KAO ST, SCOTT DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* v.19(4); p.513-21; 2007

KOO KT, POLIMENI G, QAHASH M, KIM CK, WIKESJÖ UM. Periodontal repair in dogs: guided tissue regeneration enhances bone formation in sites implanted with a coral-derived calcium carbonate biomaterial. *J Clin Periodontol.* v.32(1); p.104-10; 2005.

KURAL MH, BILLIAR KL. Regulating tension in three-dimensional culture environments. *Exp Cell Res.* v.319; p.2447-59; 2013.

LEE EY, CHANG CY, HU N, WANG YC, LAI CC, HERRUP K, LEE WH, BRADLEY A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature.* v.359(6393); p.288-94; 1992.

MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T, SUDARSANAM S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* v.298(5600); p.1912-34; 2002.

MASUDA T, YLIHEIKKILA PK, FELTON DA, COOPER LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants.* v.18; p.17-29; 1998.

MCALLISTER BS, HAGHIGHAT K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol.* v.78(3); p.377-96; 2007.

MIKOS AG, HERRING SW, OCHAREON P, ELISSEEFF J, LU HH, KANDEL R, SCHOEN FJ, TONER M, MOONEY D, ATALA A, VAN DYKE ME, KAPLAN D,

VUNJAK-NOVAKOVIC G. Engineering complex tissues. *Tissue Eng.* v.12(12); p.3307-39; 2006.

MILANI R, FERREIRA CV, GRANJEIRO JM, PAREDES-GAMERO EJ, SILVA RA, JUSTO GZ, NADER HB, GALEMBECK E, PEPPELENBOSCH MP, AOYAMA H, ZAMBUZZI WF. Phosphoproteome reveals an atlas of protein signaling networks during osteoblast adhesion. *J CELL BIOCHEM.* v.109(5); p.957-66; 2010.

MIN CK, WIKESJÖ UM, PARK JC, CHAE GJ, PIPPIG SD, BASTONE P, KIM CS, KIM CK. Wound healing/regeneration using recombinant human growth/differentiation factor-5 in an injectable poly-lactide-co-glycolide-acid composite carrier and a one-wall intra-bony defect model in dogs. *J Clin Periodontol.* v.38(3); p.261-8; 2011.

MINE Y, MAKIHIRA S, YAMAGUCHI Y, TANAKA H, NIKAWA H. Involvement of ERK and p38 MAPK pathways on Interleukin-33-induced RANKL expression in osteoblastic cells. *Cell Biol Int.* v.38(5); p.655-62; 2014.

NAKATA Y, SHETZLINE S, SAKASHITA C, KALOTA A, RALLAPALLI R, RUDNICK SI, ZHANG Y, EMERSON SG, GEWIRTZ AM. c-Myb contributes to G2/M cell cycle transition in human hematopoietic cells by direct regulation of cyclin B1 expression. *Mol Cell Biol.* v.27(6); p.2048-58; 2007.

PAIVA KB, GRANJEIRO JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* v.561; p.74-87, 2014.

PAIVA KB, ZAMBUZZI WF, ACCORSI-MENDONÇA T, TAGA R, NUNES FD, SOGAYAR MC. Rat forming incisor requires a rigorous ECM remodelling modulated by MMP/RECK balance. *J Mol Histol.* v.40; p.201-7; 2009.

PASCHOS NK, BROWN WE, ESWARAMOORTHY R, HU JC, ATHANASIOU KA. Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *J Tissue Eng Regen Med.* v.9(5); p.488-503; 2015.

PATTANAIK B, PAWAR S, PATTANAIK S. Biocompatible implant surface treatments. *Indian J Dent Res.* v.23(3); p.398-406; 2012.

POLIMENI G, SUSIN C, WIKESJÖ UM. Regenerative potential and healing dynamics of the periodontium: a critical-size supra-alveolar periodontal defect study. *J Clin Periodontol.* v.36(3); p.258-64; 2009.

RAVINDRAN S, GEORGE A. Multifunctional ECM proteins in bone and teeth. *Exp Cell Res.* v.325(2); p.148-54; 2014.

REZZA A, SENNETT R, RENDL M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol.* v.107; p.333-72; 2014.

RHEE S. Fibroblasts in three-dimensional matrices: cell migration and matrix remodelling. *Exp Mol Med.* v.41; p.858-65; 2009.

ROBINTON DA, DALEY GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* v.481(7381); p.295-305; 2012.

ROETHER JA, GOUGH JE, BOCCACCINI AR, HENCH LL, MAQUET V, JÉRÔME R. Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* v.13; p.1207-14; 2002.

SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* v.4(8); p.743-65; 2004.

SANTOS PL, GULINELLI JL, TELLES CDA S, BETONI JÚNIOR W, OKAMOTO R, CHIACCHIO BUCHIGNANI V, QUEIROZ TP. Bone substitutes for peri-implant defects of postextraction implants. *Int J Biomater.* 2013.

SCHAEFER CF, ANTHONY K, KRUPA S, BUCHOFF J, DAY M, HANNAY T. PID: The Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res.* v.37; p.674-679; 2009.

SHIH YR, HWANG Y, PHADKE A, KANG H, HWANG NS, CARO EJ, NGUYEN S, SIU M, THEODORAKIS EA, GIANNESCHI NC, VECCHIO KS, CHIEN S, LEE OK, VARGHESE S. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proc Natl Acad Sci.* v.111(3); p.990-5; 2014.

STAVROPOULOS A, WIKESJÖ UM. Growth and differentiation factors for periodontal regeneration: a review on factors with clinical testing. *J Periodontal Res.* v.47(5); p.545-53; 2012.

SU G, MORRIS JH, DEMCHAK B, BADER GD. Biological network exploration with cytoscape 3. *Curr Protoc Bioinforma.* v.47; 2014.

VAN DER EERDEN BC, TETI A, ZAMBUZZI WF. Bone, a dynamic and integrating tissue. *Arch Biochem Biophys.* v.561; p.1-2; 2014.

VATS A, TOLLEY NS, POLAK JM, GOUGH JE. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clin Otolaryngol.* v.28; p.165-72; 2003.

WANG X, PROUD CG. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda).* p.362-9; 2006.

WIKESJÖ UM, NILVÉUS RE, SELVIG KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol.* v.63(3); p.158-65; 1992.

WINTERHALTER C, WIDERA P, KRASNOGOR N. JEPETTO: A Cytoscape plugin for gene set enrichment and topological analysis based on interaction networks. *Bioinformatics Oxford England.* v.30; p.1029–30; 2014.

YE LT, LI WX, WU SG, WANG GT. Supplementary studies on *Henneguya doneci* Schulman, 1962 (Myxozoa: Myxosporidia) infecting the gill filaments of *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China: histologic, ultrastructural, and molecular data. *Parasitol Res.* v.110(4); p.1509-16; 2012.

ZAMBUZZI WF, BONFANTE EA, JIMBO R, HAYASHI M, ANDERSSON M, ALVES G, TAKAMORI ER, BELTRÃO PJ, COELHO PG, GRANJEIRO JM. Nanometer scale titanium surface texturing are detected by signaling pathways involving transient FAK and Src activations. *PLoS One.* 2014.

ZAMBUZZI WF, COELHO PG, ALVES GG, GRANJEIRO JM. Intracellular signal transduction as a factor in the development of "smart" biomaterials for bone tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.* v.108; p.1246-50; 2011.

ZAMBUZZI WF, FERNANDES GV, IANO FG, FERNANDES MDA S, GRANJEIRO JM, OLIVEIRA RC. Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. *Braz Dent J.* v.23(4); p.315-21; 2012.

ZAMBUZZI WF, MILANI R, TETI A. Expanding the role of Src and protein-tyrosine phosphatases balance in modulating osteoblast metabolism: lessons from mice. *Biochimie.* v.92(4); p.327-32; 2010.

ZAMBUZZI WF, YANO CL, CAVAGIS AD, PEPPELENBOSCH MP, GRANJEIRO JM, FERREIRA CV. Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2. *Mol Cell Biochem.* v.322; p.143-50; 2009.



ZHANG W, LI Z, LIU Y, YE D, LI J, XU L, WEI B, ZHANG X, LIU X, JIANG X.
Biofunctionalization of a titanium surface with a nano-sawtooth structure regulates the
behavior of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine*. v.7; p.4459-
72; 2012.

12 ANEXOS

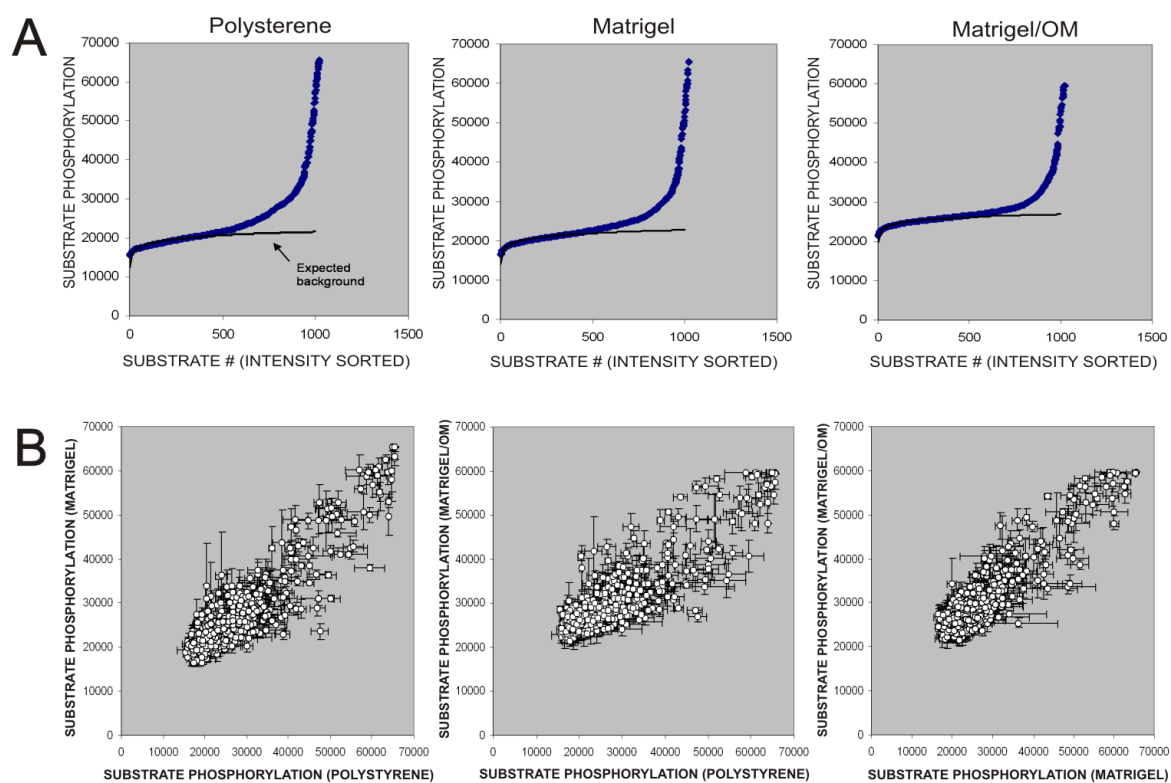


Figura S1: Dados de fosforilação de substrato Pepchip. (A) Representação gráfica de valores obtidos de uma forma hierárquica baseada em amplitude. (B) Comparação de fosforilação do substrato entre as condições de crescimento de células diferentes

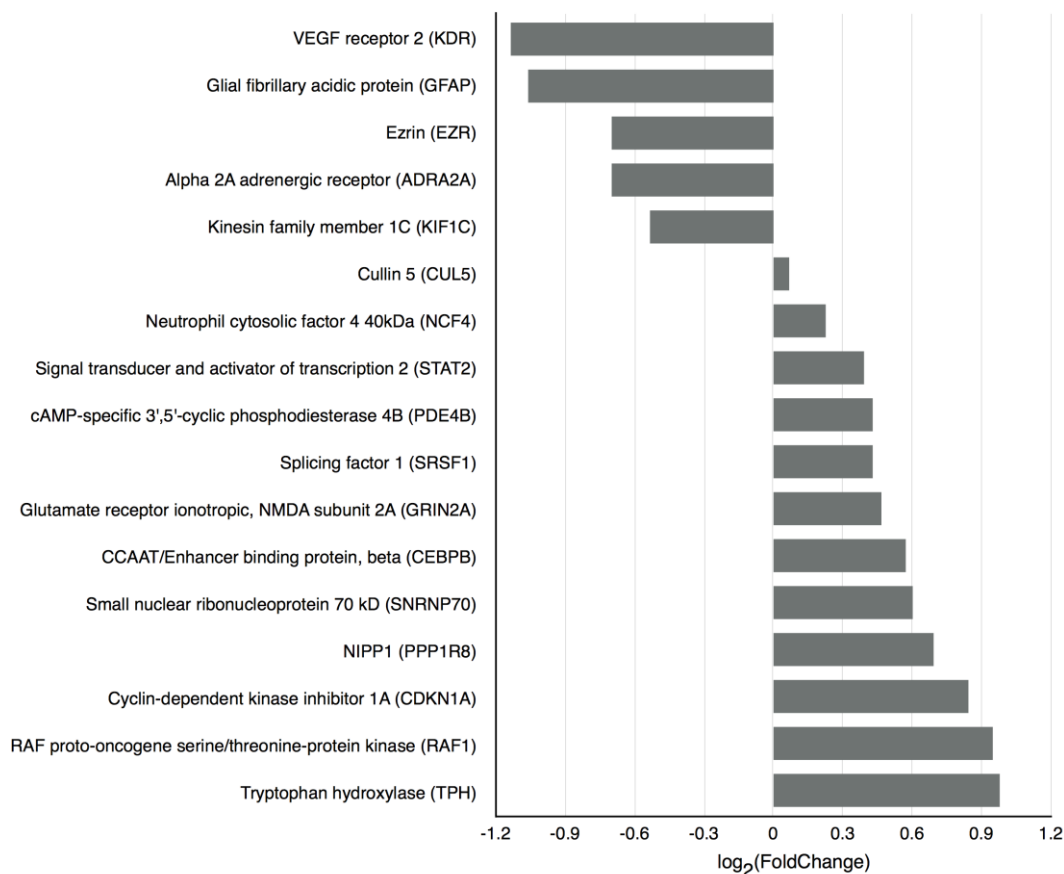


Figura S2. Mudanças de dobra logarítmicas. Representando as proteínas encontradas com perfis de fosforilação alterados em células cultivadas em Matrigel® - meio osteogênico. As proteínas são representadas por nomes dos genes.

Tabela 1: Peptídeos *consensus* fosforilados com diferença significativa

Spot	Protein Name	ID Protein	Sequence	Put. Kinase	t-Test	Fold
600	3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1	NP_002604	TTSQLYDAVPI	c-Src	0,028	0,2
685	Acetyl-CoA carboxylase alpha	NP_942131	IRSSMSGLHLV	AMPK	0,035	1,3
668	Aralkylamine N-acetyltransferase	NP_001079	AQRHHTLPASE	PKA	0,012	0,3
128	ATP citrate lyase	NP_001087	STPAPSRATSF	Gsk3	0,016	0,1
211	Beta glucuronidase	NP_000172	VVANGTGTQGG	Beta-G1	0,036	-2,4
505	Beta-adrenergic receptor kinase 1	NP_001610	PLVQRGSANGL	PKA	0,049	-3,0
749	Beta-catenin	NP_001895	HWQQQSYLDSG	CK2-beta	0,021	1,3
595	B-Myb	NP_002457	DNTPHTPTPFK	Cdk2	0,013	-1,6
133	BRCA1	NP_009225	ASGLSSQSDIL	ATM	0,047	4,3
352	Calmodulin 1	NP_008819	KDNGYISAAE	CKII	0,034	-2,6
637	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B	NP_002591	SQRRESFLYRS	Protein kinase A	0,022	-2,3
621	Caspase 9	NP_001220	RRRFSSLLFMV	ERK1 ERK2 MEK1 MAP2K2	0,014	1,2
657	Caspase 9	NP_001220	VLRPETPRPVD	AKT1	0,020	-0,1
701	CD45	NP_002829	SSDDSDSEEP	CK2, alpha 1 CK 2, alpha 2	0,007	-2,9
652	CD5	NP_055022	SRLSAYPALEG	Lck Fyn	0,035	-0,1
810	CDC 25A	NP_001780	LLFAASPPAS	CDC2	0,007	-2,0
554	CDC 25A	NP_001780	LKRSHSDSLDH	CDC2 PIM1	0,047	-2,3
167	Centromeric protein a	NP_001800	GPRRRSRKPEA	Aurora kinase B	0,041	15,2
145	c-Fos	NP_005243	PVVTATPSATA	MAP kinase	0,009	26,8
757	CK2, alpha 1	NP_001886	SVPTTSPGLPL	CK2, alpha 1	0,028	-2,2
441	Coagulation Factor III	NP_001984	SWKENSPLNVS	Protein Kinase C	0,023	-2,8
612	Cofilin 2	NP_068733	MASGVTVNDE	LIMK1	0,006	14,1
396	Colony stimulating factor 1 receptor	NP_005202	QGVDTYVEMRP	Colony stimulating factor 1 receptor	0,006	1,4
28	CRIP2	NP_001303	EERKASGPPKG	cGMP kinase I	0,043	-1,5
752	Crystallin, alpha B	NP_001876	FFPFHSPSRLF	nb	0,020	-4,5
323	c-Src	NP_005408	STEPQYQGEN	Csk Fgr PTPase	0,040	2,3
104	Cullin 5	NP_003469	MRKKSNAQLQ	Protein kinase A	0,023	2,8
403	Cyclin dependent kinase 2	NP_001789	PVRTYTHEVVT	nb	0,044	0,2
137	Cyclin dependent kinase 5	NP_004926	IGEGTYGTVFK	ABL	0,008	2,1
677	Cyclin dependent kinase inhibitor 2D	NP_001791	LKQGASPNVQD	nb	0,006	1,8
758	DNA topoisomerase II alpha	NP_001058	AELVPSRPGQR	Proline directed kinase	0,045	-2,2
272	Docking protein 1	NP_001372	KEDPIYDEPEG	Insulin receptor	0,018	1,9
1020	Down syndrome critical region protein 1	NP_004405	ISPPASPPVGW	GSK-3	0,012	-1,7
550	E2F transcription factor 1	NP_005216	RLLDSSQIVII	ATM ATR	0,020	2,7
Spot	Protein Name	ID Protein	Sequence	Put. Kinase	t-Test	Fold
468	EGF receptor	NP_005219	LPVPEYINGSV	EGF receptor	0,029	-2,0
926	EP4 receptor	NP_000949	ARIGGSRRRRS	PKC	0,032	-1,8
817	Estrogen receptor, alpha	NP_000116	PPPQLSPFLQP	ERK2	0,046	4,4
258	FMS-related tyrosine kinase 3	NP_004110	DNEYFYVDFRE	FMS-related tyrosine kinase 3	0,011	2,9
841	GAB1	NP_002030	DKOVYLDLDD	Insulin receptor EGF receptor	0,046	3,3
778	GAB1	NP_002030	HVSISYDIPPT	EGF receptor	0,028	-6,0
949	GAB2	NP_536739	RERKSSAPSHS	AKT1	0,006	-3,5
545	Glucocorticoid receptor	NP_000167	KETNESPPWRSD	nb	0,044	2,2
959	Glycogen synthase 1	NP_002094	ASVPPSPSLSR	Glycogen synthase kinase 3 beta	0,033	-1,5
995	Growth hormone 1	NP_000506	KFDTNSHNDDA	nb	0,034	1,5
957	Guanine nucleotide binding protein, alpha Z polypeptide	NP_002064	HLRSESQRQRR	Protein kinase C	0,014	-3,2
539	Histone deacetylase 1	NP_004955	AEEEFSDSEEE	ck2	0,003	-4,9
227	HLA-B	NP_005505	SAQQSDVSLTA	nb	0,014	2,2
493	HOX B6	NP_061825	SASQLSAEEEE	Casein kinase II, be	0,014	9,0
484	Kinetochore associated 2	NP_006092	YPFALSKSSMY	Never in mitosis gene A-related kinase 2	0,012	-3,5
427	Lamin A/C	CAA27173	SSTSLSPTRIT	cdc2-kinase	0,046	1,5
970	Lck	AAH13200	IEDNEYTAREG	nb	0,001	2,0
59	Lck	AAH13200	IRESESTAGSF	PKC	0,016	-2,6
1024	LIG1	NP_000225	ARVLGSEGESE	CK2, alpha 1	0,027	-2,2
971	MAPK12	NP_002960	SEMTGYVWTRW	MAP2K3	0,013	2,5
643	Metal regulatory transcription factor 1	NP_005946	KEVKRYQATFE	Tyrosine kinase	0,009	5,5
881	Nucleolar phosphoprotein p130	AAH01883	GEKRASSPFRR	Protein kinase A	0,000	-1,6
730	ORC1	NP_004144	FSEITSPSKRS	Cyclin dependent kinase 2	0,012	-2,1
209	p73	NP_005418	SASPYTPEHAA	CDC2 Cyclin dependent kinase 2 Cyclin E	0,040	-1,9
859	Phosphatidylinositol 3 kinase, catalytic subunit, delta	AAB53966	LAHNVSKDNRQ	PI3K, catalytic subunit, delta	0,042	-13,6
1007	Phospholipase C, beta 3	NP_000923	RKRHNSISEAK	PKG	0,043	-1,5
878	PPAR	NP_005027	AGDLESPLSEE	MAPK	0,043	5,1
1018	PPP1R9B	NP_115984	LPRASSLLENV	PKA	0,033	2,7
624	Protein kinase C, mu	NP_002733	IIEKSFRRSV	Protein kinase C, mu	0,048	1,3
604	Protein phosphatase inhibitor 2	NP_006232	QEQESSGEEDS	Casein kinase 2	0,009	-1,7
466	Protein tyrosine phosphatase nonreceptor 7	NP_542155	IASVNTPREVT	Erk ERK2 MAPK14	0,002	4,6
819	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, alpha	NP_002827	GSHSNFRLSN	PKC delta	0,001	-2,3
934	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	NP_002601	ALSTDSIERLP	Pyruvate dehydrogenase kinase 1	0,013	-2,0
230	RAP1 GTPase activating protein 1	NP_002876	GSRSSAIGIE	c-AMP dependent kinase	0,006	2,0
705	Regulator of G protein signaling 16	NP_002919	LKSPAYRDAAA	EGFR kinase	0,022	1,3
Spot	Protein Name	ID Protein	Sequence	Put. Kinase	t-Test	Fold
475	Ribosomal phosphoprotein large P1	NP_000994	AKKEESEESDD	nb	0,016	-1,9
219	Ribosomal phosphoprotein large P2	NP_000995	EKKEESEESDD	nb	0,008	-3,3
678	Ribosomal protein S6 kinase alpha 3	NP_004577	KTPKDSGPIPP	EphB2	0,025	4,2
732	Ribosomal S6 kinase 1	NP_002944	EFTSRTPKDSPP	ERK2	0,025	-1,4
382	Ryanodine receptor 2	NP_001026	RTRRISQTSQV	PKA	0,023	4,1
162	SMC1	NP_006297	QEEGSSQGEDS	ATM	0,030	1,6
482	Spermidine/spermine N	NP_002961	KRRGASDLSE	CK2	0,010	2,8
232	SP1B transcription factor	Q01892	PPVPATPYEAF	ERK1	0,019	-2,1
834	STAT5B	NP_036580	PKDEVYSKYTY	c-Src	0,040	3,4
780	STAT6	AAA57193	KDGRGVVPATI	Interleukin 4	0,006	2,2
25	T-Cell acute lymphoblastic leukemia 2	NP_005412	NYQVSPGPPSH	nb	0,043	2,6
163	Telethonin	NP_003664	LRRLSRSMSQ	Titin	0,020	4,5
151	TNF alpha	NP_000585	MSTESMIRD	Caesin Kinase	0,030	-1,7
740	Vesicle associated membrane protein 4	NP_003753	LLEDSDSEED	CK2, alpha 1	0,030	7,7
832	Vesicular monoamine transporter 2	NP_003045	PIGEDEESESD	Casein kinase I Casein kinase II	0,046	1,8