

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/01/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Plasma-rico em plaquetas liofilizado associado à
nanohidroxiapatita na performance celular e regeneração óssea

MARCEL RODRIGUES FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Orientador: *Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi*

BOTUCATU – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Plasma-rico em plaquetas liofilizado associado à
nanohidroxiapatita na performance celular e regeneração óssea

MARCEL RODRIGUES FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia.

Orientador: *Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi*

BOTUCATU – SP

2023

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

Ferreira, Marcel Rodrigues.

Plasma-rico em plaquetas liofilizado associado à nanohidroxiapatita na performance celular e regeneração óssea / Marcel Rodrigues Ferreira. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Capes: 90400003

1. Ossos. 2. Plasma rico em plaquetas. 3. Materiais biomédicos. 4. Bioinformática.

Palavras-chave: Bioinformática; Biomateriais; Plasma-rico em plaquetas; Tecido ósseo.

Dedicatória

A todas as vítimas da COVID-19

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, David e Denise, por partilharem deste sonho e me guiarem durante toda a jornada.

A minha irmã Marina por todo carinho e amor mesmo de longe.

Aos Rodrigues e Ferreiras, em especial meus padrinhos tio Marco, vó Cida e vô David. Porque certas coisas não se aprendem em livros ou artigos. E a dona Bene que do céu segue intercedendo por mim.

A Sarah Mattioli por dividir tantos momentos maravilhosos comigo. Sempre me incentivar e acreditar em mim. Não há palavras para descrever sua importância.

A todos meus queridos amigos de Itapetininga, desde a turma do lego ao pessoal da chácara black marvin, pelas risadas, jogos de futebol, churrascos, *Expoagros* e tantos outros momentos.

A todos os moradores da república Põe na Mão de Deus que tive o privilégio de compartilhar esse laço de irmandade, veteranos e bixos. Foram e sempre serão a minha família de Botucatu.

A Rafaela F. Manoel e Luiz Marcos Frediane, Rala e Corote, meus grandes amigos/irmãos que possuem cada um as melhores risadas que já ouvi, pelo apoio, festas, jantares, broncas e mais festas. Tornaram especial cada momento que passamos juntos.

Aos meus colegas de futsal da atlética geral de Botucatu pelas vitórias e derrotas. Sempre na união e resenha. Bonde da Stella formou e marcou.

Aos amigos do grupo Futeboteco pelas resenhas e risadas. Vou um prazer dividir o fanatismo pelo futebol com vocês.

A todos os servidores do departamento de Ciências Químicas e Biológicas, em especial ao setor de Química e Bioquímica, pelo apoio, pelo café e pelas risadas.

Aos professores dr Gustavo Rocha de Castro e dra Margarida Juri Saeki por abrirem as portas de seus laboratórios para diversas etapas deste projeto.

Ao professor dr Paulo Noronha Lisboa Filho da Faculdade de Ciências de Bauru pelo auxílio com os experimentos de difração de raios X.

Ao dr. Rodrigo Augusto da Silva por toda a orientação e atenção em todas as dúvidas. Sem isso não seria possível.

Ao dr José Cavalcante Souza Vieira pelo auxílio nas liofilizações e preparo de amostras para proteômica.

Ao professor dr Paulo Coelho que me abriu as portas para estagiar na Universidade de Nova Iorque (NYU) e ao professor dr Lukasz Witek que me supervisionou durante o período. Uma experiência única na minha vida.

A todos os colegas que fiz na NYU e que me ajudaram nas situações mais desafiadoras.

Aos membros e ex-membros do laboratório de bioensaios e dinâmica celular (LaBIO) pela convivência e auxílio durante todo este período. Vou levar o carinho de vocês por toda minha vida.

Ao meu orientador, professor dr Willian Zambuzzi, por todo apoio, carinho, bronca e ensinamento ao longo de todos estes anos. Pilar fundamental para a concretização deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro dado a este projeto através dos processos 2018/05731-7, 2021/14271-2 e 2014/22689-3, fundamental para a minha manutenção neste período.

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

Epígrafe

“Desde que a minha vida saiu dos trilhos sinto que posso ir a qualquer lugar.”

Zack Magiezi

Resumo

Lesões ósseas constituem um dos problemas mais prementes na área médico-odontológica. Embora o tecido ósseo seja um tecido altamente dinâmico com boa capacidade de se regenerar, em caso de lesões extensas faz-se necessário o uso de biomateriais que permitam uma boa regeneração tecidual. Até o presente, não foi desenvolvido nenhum material sintético que reúna as propriedades e capacidades ofertadas pelo material autógeno, conhecidamente como material ideal. Dentre as diversas terapias propostas, a associação de biomateriais em escala nanométrica, como hidroxiapatita e/ou fosfato tricálcio, vem apresentando resultados positivos no processo de regeneração do tecido ósseo. Outra vertente amplamente utilizada é o uso de plasma rico em plaqueta (PRP), obtido do próprio paciente, no tratamento destas lesões. Baseando-nos neste prévio conhecimento sobre o potencial de ambas as terapias, o objetivo desta tese é a associação de hidroxiapatita em escala nanométrica (nanoHAp) e/ou fosfato tricálcio (β TCP) ao PRP liofilizado para a obtenção de um produto capaz de melhorar a regeneração óssea e por conseguinte a qualidade de vida do paciente. A experiência prévia do nosso grupo foi utilizada para uma caracterização do impacto deste compósito nas vias de sinalização clássicas relacionadas a processos de diferenciação de osteoblastos e regeneração do tecido ósseo através de ensaio *in vitro*. Embora o tema desta tese tenha sido amplamente explorado na literatura nossa motivação é justamente conhecer os aspectos celulares e moleculares que regem sua atuação durante os mecanismos de regeneração, além de propor protocolos prévios de, como resultado da proposição de novos métodos metodológicos alternativas na prática clínica, facilitando sua aplicação em lesões do tecido ósseo, amparado por um repertório molecular que justifica sua escolha e sua atuação, parâmetros altamente necessários para interagir com o setor produtivo. Foi utilizado o conhecimento em bioinformática para iniciar a compreensão do efeito de miRNAs presentes em micropartículas de plaquetas (PMPs) na osteogênese, adicionando uma nova faceta ao panorama do tratamento autólogos de PRP no tecido ósseo. Na sequência foi iniciada a padronização da obtenção PRP e sua liofilização, realizando a caracterização físico-química utilizando espectroscopia de infravermelho e molecular com ELISA. A performance celular foi avaliada em pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e mesenquimais (MS) com ensaios de citotoxicidade e utilizando expressão gênica relativa em modelo de tratamento por 24 h e 7 dias, avaliando períodos iniciais da diferenciação osteoblástica. A síntese e caracterização físico-química de HAp e TCP foi realizada. Utilizando alginato realizamos a obtenção de hidrogéis associando PRP e HAp ou TCP e avaliamos a performance de células MC3T3-E1 e Raw 264.7 submetidas a meio condicionado por 24 h pelos hidrogéis. No geral, nossos resultados sinalizam que o PRP liofilizado afeta o desempenho dos osteoblastos de maneira semelhante ao PRP líquido quando avaliado em vias clássicas. Também foi possível concluir que a associação do PRP com os fosfatos de cálcio avaliados foi possível através da fabricação de hidrogéis de alginato de sódio.

Abstract

Bone injuries are one of the most pressing problems in the medical-dental field. Although bone tissue is a highly dynamic tissue with an excellent ability to regenerate, biomaterials are necessary to allow good tissue regeneration in more severe injuries. No synthetic material has been developed that brings together the properties and capabilities offered by the autogenous material, known as the ideal material. Among the various proposed therapies, the association of biomaterials on a nanometric scale, such as hydroxyapatite and/or tricalcium phosphate, has shown positive results in the bone tissue regeneration process. Another widely used aspect is the use of platelet-rich plasma (PRP), obtained from the patient, to treat these lesions. Based on this prior knowledge about the potential of both therapies, the objective of this thesis is the association of hydroxyapatite on a nanometric scale (nanoHAp) and/or tricalcium phosphate (TCP) to lyophilized PRP to obtain a product capable of impacting the bone regeneration and therefore the patient's quality of life. We used our group's previous experience to characterize the impact of this composite on classical signaling pathways related to osteoblast differentiation processes and bone tissue regeneration through an *in vitro* assay. Although the theme of this thesis was widely explored in the literature, our motivation is precisely to know cellular and molecular aspects that govern its performance during regeneration mechanisms, in addition to proposing previous synthesis/combination protocols, as an outcome to propose new methodological alternatives to clinical practice, facilitating its application in bone tissue injuries, supported by a molecular repertoire that justifies its choice and performance, essential parameters for interface with the productive sector. At first, we used knowledge in bioinformatics to understand the effect of miRNAs present in platelet microparticles (PMPs) on osteogenesis, adding a new facet to the panorama of autologous PRP treatment in bone tissue. Next, we started the standardization of PRP obtaining and its lyophilization, performing the physical-chemical characterization using infrared and molecular spectroscopy with ELISA. Cellular performance was evaluated in MC3T3-E1 and mesenchymal (MS) cells with cytotoxicity assays and using relative gene expression in a 24-h and 7-day treatment model, evaluating early periods of osteoblastic differentiation. We started the synthesis and characterization of HAp and TCP. Using alginate, we carried out the construction of hydrogels associating PRP and HAp or TCP, and we evaluated the performance of MC3T3-E1, and Raw 264.7 cells submitted to medium conditioned for 24 h by the hydrogels. Our results demonstrate no cytotoxicity of our materials, supporting the following tests *in vitro* 3D and *in vivo* models.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Resumo	v
Abstract.....	vi
Sumário.....	vii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xvii
Lista de anexos.....	xviii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xix
Capítulo 1.....	1
1.1 Tecido ósseo: defeitos e necessidades.....	2
1.2 A sincronia das células ósseas.....	3
1.3 Regeneração óssea.....	4
1.4 Biomateriais	6
1.5 Fatores de crescimento para a construção do tecido.....	10
1.6 Sinalização celular baseada em fatores de crescimento como estratégia na bioengenharia de tecidos.....	11
1.7 Plaquetas: Biologia e fonte de autóloga de moléculas ativas.....	12
1.8 Plasma-rico em Plaquetas (PRP): processo de obtenção, resultados preliminares e aplicações clínicas.....	14
1.9 Justificativa.....	17
1.10 Objetivo.....	18
1.10.1 Objetivos específicos.....	18
Capítulo 2.....	19
Capítulo 3.....	30
3.1 Resumo do capítulo.....	31
3.2 Materiais e métodos.....	31

3.2.1	Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado.....	31
3.2.2	Cultura de células.....	32
3.2.3	Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado	32
3.2.4	Viabilidade celular: MTT	32
3.2.5	Liberação de proteínas pelo liofilizado.....	32
3.2.6	Análise imunoenzimático do tipo ELISA.....	33
3.2.7	Expressão gênica relativa: RT-qPCR	33
3.2.8	Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)	34
3.2.9	Espectroscopia na região do ultravioleta.....	34
3.2.10	Análise dos dados.....	35
3.2.11	Desenho experimental	35
3.3	Resultados	36
3.3.1	Coleta e liofilização de PRP	36
3.3.2	Espectroscopias nas regiões do infravermelho médio e ultravioleta	40
3.3.3	Liberação de proteínas no meio de cultura	43
3.3.4	Viabilidade celular	46
3.3.5	Expressão gênica relativa	47
3.4	Discussão.....	51
3.5	Constatações	55
	Capítulo 4.....	56
4.1	Resumo do capítulo.....	57
4.2	Materiais e métodos	58
4.2.1	Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado.....	58
4.2.2	Cultura de células.....	58
4.2.3	Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado	59
4.2.4	Viabilidade celular: MTT	59
4.2.5	Expressão gênica relativa: RT-qPCR.....	59

4.2.6	Análise de bioinformática.....	62
4.2.7	Análise dos dados	62
4.3	Resultados	62
4.3.1	Viabilidade celular	62
4.3.2	Expressão gênica relativa de células tronco mesenquimais (MS) submetidas a tratamento com PRP ou seu liofilizado	64
4.3.3	Análise de componentes principais	79
4.3.4	Análises de redes de correlação	85
4.4	Discussão	95
4.5	Constatações.....	99
	Capítulo 5.....	100
5.1	Resumo do capítulo	101
5.2	Materiais e métodos.....	101
5.2.1	Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado.....	101
5.2.2	Síntese de fosfato tricálcio.....	101
5.2.3	Síntese de hidroxiapatita.....	102
5.2.4	Construção de hidrogéis	102
5.2.5	Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).	102
5.2.6	Difratometria de raios-x	102
5.2.7	Cultura celular	103
5.2.8	Ensaio de citotoxicidade.....	103
5.2.9	Expressão gênica relativa	103
5.2.10	Análise dos dados.....	104
5.3	Resultados	105
5.3.1	Caracterização de HAp e TCP.....	105
5.3.2	Construção de hidrogéis com HAp e TCP.....	110
5.3.3	Incorporação de PRP em géis de alginato	114
5.3.4	Citotoxicidade de hidrogéis em células MC3T3 e RAW 264.7.....	118

5.3.5 Expressão genica relativa de células MC3T3 e RAW 264.7 submetida a meio condicionado pelos materiais.....	118
5.4 Discussão	125
5.5 Constatações.....	126
Capítulo 6.....	127
6.1 Conclusão	128
Referências.....	129
Anexo I - Artigos publicados durante o período do doutorado	145
Anexo II – Plano de gestão de dados.....	147

Lista de figuras

Figura 1 - Estruturas do tecido ósseo. Elementos gráficos foram obtidos em https://smart.servier.com/	3
Figura 2 – Comunicação celular entre osteoblastos e osteoclastos. Figura adaptada gentilmente por Paula Bertin de Moraes de https://www.orthobullets.com/basic-science/9010/bone-signaling-and-rankl acessada em 25/06/2021.....	4
Figura 3 – Diferentes etapas da regeneração óssea. Figura publicada por DE WITTE et al., 2018.....	6
Figura 4 - Estrutura química de alginato. A) Monômero de ácido α -L-gulurônico, b) monômero de ácido β -D-manurônico, c) polímero de alginato com átomo de sódio, d) esquema do modelo de caixa-de-ovos para a reticulação com átomos de cálcio (Adaptado de Lee et al. 2019).....	9
Figura 5 - Esquema da cascata de coagulação (Figura obtida em https://nurseyourownway.com/2016/04/05/the-clotting-cascade-made-easy/ . Acesso em 28/06/2021).....	14
Figura 6 – Esquema do processo de obtenção do plasma-rico em plaquetas. Figura obtida em https://jcadonline.com/platelet-rich-plasma-review/	16
Figura 7 - Desenho experimental do capítulo 3.....	35
Figura 8 - Alíquotas de PRP do doador 1. A cor das alíquotas é dependente da precisão separação na primeira centrifugação.....	36
Figura 9 - Alíquotas liofilizadas de liofilizado de PRP.....	37
Figura 10 - Liberação de proteínas pelo liofilizado diluído em água.....	38
Figura 11 - Liberação de proteínas pelo liofilizado diluído em água, colorido pelos distintos doadores das amostras.....	39
Figura 12 - Espectro ultravioleta dos PRP liofilizados diluídos em água.....	40
Figura 13 - Espectro infravermelho dos liofilizados dos diferentes doadores. Dados apresentados em absorvância normalizada entre 0 e 1.....	41
Figura 14 - Modelo de bandas deconvoluídas em para o espectro normalizado do PRP. Bandas deconvoluídas foram representados em vermelho, pontos azuis representam os dados experimentais, a linha preta contém o modelo da soma das 13 bandas encontradas. Os resíduos calculados para cada número de onda foram representados na figura inferior. Linhas tracejadas representam variações de $\pm 0,025$ (relativo a um erro de 5%).....	42
Figura 15- Gel formado em meio de cultura (Alfa-MEM) com PRP. Perceba que o gel formado acabou por fechar o falcon de modo que ser invertido o liquido não desce.....	43
Figura 16 - Géis formados em meio de cultura condicionado por (a) PRP e (b) Liofilizado.....	44

Figura 17- Liberação de proteínas em meios de cultura com 10% PRP ao longo de 35 dias. Note que houve um aumento na concentração de proteínas liberadas no início, a qual se manteve constante nos períodos subsequentes.	44
Figura 18 - Ensaio de ELISA para as citocinas $IL1\beta$ e $Tnf\alpha$	46
Figura 19- Ensaio de MTT para células MC3T3-E1 submetidas a diferentes concentrações de PRP e Liofilizado.....	46
Figura 20 - Expressão gênica relâtiva para biomarcadores de viabilidade celular.	48
Figura 21 - Expressão gênica relativa para biomarcadores osteogênicos.	49
Figura 22 - Expressão gênica relativa para biomarcadores da inflamação.	51
Figura 23 – Mapa dos genes avaliados neste capítulo. Elementos gráficos foram obtidos no site https://smart.servier.com/	58
Figura 24 -MTT de células MS submetidas a PRP e Liofilizado.	63
Figura 25 - Expressão gênica relativa de marcadores da osteogênese em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados ALPL (a), BGLAP (b), RUNX2 (c) e SP7 (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.....	65
Figura 26 - Expressão gênica relativa de marcadores da viabilidade celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados AKT1 (a), BCL2 (b), MAPK3 (c) e PI3K (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.....	67
Figura 27 - Expressão gênica relativa de marcadores de proliferação celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados CDK2 (a), CDK4 (b), CDK6 (c), MTK67 (d), P15 (e) e P21 (f). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa	

diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.....69

Figura 28 - Expressão gênica relativa de marcadores da adesão celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados ITGB1 (a), PTK2 (b), SRC (c), CFL1 (d), PXN (e), RAC1 (f), RHOA (g), RHOC (h), ROCK1 (i) e CDC42 (j). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.....72

Figura 29 - Expressão gênica relativa de receptores do tipo tirosina quinase em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados BMPR1 (a), BMPR2 (b), c-MET (c), IGFR1 (d), IL1R1 (e), IL18R1 (f), PDGFRB (g), TGFBR1 (h), VEGFR1 (i) e VEGFR2 (j). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.74

Figura 30 - Expressão gênica relativa de receptores de FGF em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados FGFR1 (a), FGFR2 (b), FGFR3 (c) e FGFR4 (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05.....76

Figura 31 - Expressão gênica relativa de marcadores da via de ERBB em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados EGFR1 (a), ERBB2 (b), ERBB3 (c), ERBB4 (d), GRB2 (e), SHC1 (f) e SOS1 (g). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05..... 78

Figura 32 - Expressão gênica relativa de miRNAs de interesse em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados hsa-miR-7 (a), hsa-miR-128 (b) e hsa-miR-361 (c). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplacomparação de Tukey. Significâncias estatísticas das comparações múltiplas foram representadas da seguinte forma: * representa diferença significativa para o grupo controle, # representa diferença significativa para o grupo MO e & representa diferença significativa entre os grupos PRP e Liof. Segmentos de reta horizontais representam diferença significativa entre os períodos avaliados, sendo representados apenas comparações entre os mesmos tratamentos. O valor de P considerado para diferenças significativas foi menor que 0,05. 79

Figura 33 - Scree plot da PCA para a expressão gênica relativa de células MS. 81

Figura 34 - PCA - Gráfico da representação dos grupos individuais..... 82

Figura 35 - Biplot da PCA grupos individuais representados como pontos e variáveis representadas como setas. 83

Figura 36 - Gráfico de contribuição das variáveis para a PC1. 84

Figura 37 - Gráfico de contribuição das variáveis para a PC2. 85

Figura 38 - Esquema para a construção da rede de correlação baseada na expressão gênica. 86

Figura 39- Heatmap da correlação de Pearson dos genes avaliados..... 87

Figura 40 - Gráfico de densidades para as centralidades analisadas..... 89

Figura 41 - Rede de correlação obtida. Genes relativos ao cluster 1 foram coloridos em vermelho, do cluster 2 em amarelo, genes da rede que não fizeram parte de clusters foram coloridos em branco e gene sem interações foram coloridos em azul. 90

Figura 42 - Histograma dos caminhos médios obtidos pelo processo de randomização. 90

Figura 43 - Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos dos genes encontrados no Cluster 1. 91

Figura 44 - Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares dos genes encontrados no Cluster 1.....	92
Figura 45- Análise de enriquecimento funcional de vias de sinalização para os genes encontrados no Cluster 1.....	93
Figura 46 - Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos dos genes encontrados no Cluster 2.....	93
Figura 47 - Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares dos genes encontrados no Cluster 2.....	94
Figura 48 - Análise de enriquecimento funcional de vias de sinalização para os genes encontrados no Cluster 2.....	95
Figura 49 - Difratoograma de hidroxiapatita. Após a análise da síntese (A) investigamos a variação no difratograma para os tempos 2, 3 e 4 horas nas temperaturas de 900 °C, 1000 °C e 1100 °C (B). Linhas horizontais contém os principais picos para os materiais de referência: linha sólida monetita (PDF: 75-1520), tracejada beta fosfato de cálcio e cobre (PDF: 9-80), pontilhada beta fosfato tricálcio (PDF: 81-2257) e com traços longos hidrogenofosfato de cálcio hidratado (PDF: 74-1301).....	106
Figura 50 – Difratoograma de hidroxiapatita tratada termicamente por 2 horas a 1000 °C.....	107
Figura 51 - FTIR hidroxiapatita sintetizada (HA) e após tratamento a 1000 °C por 2 horas (HA1000).	108
Figura 52 - Difratoograma de fosfato tricálcio.....	109
Figura 53 – Espectro infravermelho de TCP.....	110
Figura 54 - Gel de alginato com HAp e TCP. Vídeo da manufatura do gel https://www.youtube.com/watch?v=1648xstSc4I	111
Figura 55 - Espectro de FTIR do gel de alginato com HAp.....	112
Figura 56 - Espectro de FTIR do gel de alginato com TCP.....	113
Figura 57 - Hidrogel de alginato com PRP liofilizado. Zero se refere a amostra com somente alginato, A se refere a proporção de 1:1, B se refere a 3:2, C se refere a 4:1, D a 3:1 e E a proporção de 9:1(Alginato:Liofilizado).....	114
Figura 58 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP.	115
Figura 59 – Hidrogéis com de alginato com PRP e TCP (A) e PRP e HAp (B).	116
Figura 60 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP e hidroxiapatita.....	117
Figura 61 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP e fosfato tricálcio.....	117
Figura 62 - MTT de células MC3T3 e Raw 264.7 submetidas a meio condicionado por 24 horas com hidrogéis de Alginato+PRP+HAp e Alginato+PRP+TCP.....	118

Figura 63 – Expressão gênica relativa de marcadores de ciclo celular em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) CDK2, (B) CDK4, (C) CDK6, (D) P15 e (E) P21. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	120
Figura 64 - Expressão gênica relativa de interleucinas em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) IL1B, (B) IL6, (C)IL10, (D) IL13, (E) IL18 e (F) IL33. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	120
Figura 65 - Expressão gênica relativa de marcadores do inflamassoma em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) ASC1, (B) NRLP3, (C) NFkB e (D) TNFa. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	121
Figura 66 - Expressão gênica relativa de marcadores de angiogênese/óxido nítrico em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) eNOS, (B) iNOS, (C) nNOS e (D)VEGF-R2. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	122
Figura 67 - Expressão gênica relativa de marcadores de ciclo celular em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) CDK2, (B) CDK4 e (C) P15. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	123
Figura 68 - Expressão gênica relativa de interleucinas e oxido nítrico sintase em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) IL6, (B) IL33 e (C) eNOS. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	124
Figura 69 - Expressão gênica relativa de marcadores do complexo inflamassômico em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) ASC, (B) MYD88, (C) NFkB, (D) NRLP3 e (E) TNF. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.	124
Figura 70 - Modelo de arquivo de metadados gerado pela aplicação criada.	148

Lista de tabelas

Tabela 1 - Polímeros utilizados em regeneração óssea. Adaptado de CHOI et al., 2021.	8
Tabela 2 - Relação de fatores de crescimento e sua ação no tecido ósseo.	10
Tabela 3 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste trabalho.....	34
Tabela 4 - Massa de liofilizado para 1 mL de PRP. Alíquotas obtidas dos doares 1, 2, 3 e 4.	37
Tabela 5 - Parâmetros da regressão linear considerando cada doador individualmente ou o total.	39
Tabela 6– Bandas encontradas utilizando deconvolução.....	41
Tabela 7 - Concentração de proteínas liberadas no meio de cultura condicionado por PRP.	45
Tabela 8 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste capítulos.	59
Tabela 9 - Valores de centralidades para cada gene.	87
Tabela 10 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste capítulo.....	104
Tabela 11 - Resultados de Search match para a comparação com fichas cristalográficas em bases de dados.....	106
Tabela 12 – Valores de P referentes ao resultado de ANOVA para células MC3T3. ..	119
Tabela 13 - Valores de P referentes ao resultado de ANOVA para células Raw 264.7.	122

Lista de anexos

Anexo I - Artigos publicados durante o período do doutorado 145

Anexo II – Plano de gestão de dados..... 147

Lista de abreviaturas e siglas

μL	Microlitro
3D	Três dimensões
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase B
ALP	Fosfatase alcalina
ANOVA	Análise de variância
BCL2	Regulador de apoptose BCL2
BGLAP	Osteocalcina
BMP2	Proteína morfogenética óssea 2
BMPR1	Receptor da proteína morfogênica óssea do tipo 1
BMPR2	Receptor da proteína morfogênica óssea do tipo 2
BMPs	Proteína morfogenética óssea
BP	Processos biológicos
C	Carbono
C₀	Concentração inicial
C3	Componente 3 do complemento
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CaCO₃	Carbonato de cálcio
CaHPO₄	Fosfato de cálcio dibásico
CaSO₄	Sulfato de cálcio
CDC42	Proteína efetora pequena CDC 42
Cdk2	Quinase dependente de ciclina 2
Cdk4	Quinase dependente de ciclina 4
Cdk6	Quinase dependente de ciclina 6
CFL1	Cofilina 1
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de carbono
CO₃	Carbonato
CSTK	Catepsina K
CTHRC1	Repetição de hélice tripla de colágeno contendo 1
DAVID	Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada
Dim	Dimensão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difratometria de raios x
EGF	Fator de crescimento epidérmico

EGFR1	Receptor do fator de crescimento epidermal
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
ERBB2	Receptor tirosina quinase erbb2 tipo 2
ERBB3	Receptor tirosina quinase erbb2 tipo 3
ERBB4	Receptor tirosina quinase erbb2 tipo 4
FAK	Proteína tirosina quinase de adesão focal
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico básico
FGFR	Receptores de fator de crescimento de fibroblasto
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
g	Gramma
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GeIMA	Gelatina metacrilada
GF	Fator de crescimento
GO	<i>Gene ontology</i>
GRB2	Proteínas adaptadoras proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2
h	Horas
H	Hidrogênio
H₂O	Água
HAp	Hidroxiapatita
HGFR	Receptor tirosina quinase proto-oncogene MET
hsa	Homo sapiens
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFR1	Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL1	Interleucina 1
IL18	Interleucina 18
IL18R1	Receptor de interleucina 18 do tipo 1
Il1r1	Receptor de interleucina-1 tipo 1
Il1R1	Receptor de interleucina 1 do tipo 1
IL1β	Interleucina 1 beta
IL33	Interleucina 33
IL6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISO	Organização Internacional de Normalização
ITGB1	Integrina subunidade beta 1
JAK	Janus quinase
KBr	Brometo de potássio

KEGG	Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto
kV	Quilovolts
L	Litro
Liof	Liofilizado de PRP
L-PRP	PRP rico em leucócitos
mA	Miliampères
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MAPK3	Proteína mitogênica-ativada 3
MC3T3	Pré-osteoblastos
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MEM	Meio de cultura essencial mínimo
MF	Funções moleculares
mg	Miligrama
min	Minutos
miRNAs	Micro RNA
MKI67	Marcador de proliferação KI-67
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Meio osteoindutor
MS	Células tronco mesenquimal obtida de polpa de dente decíduo
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
MYD88	Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide
N	Nitrogênio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NCPs	Proteínas não colágeno
NFκB	Factor nuclear kappa B
NLRP3	Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD
nm	Nanometro
nNOS	Óxido nítrico síntase
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade ótica
OH	Hidroxila
OPG	Osteoprotegerina
OTC	Osteonectina
OTX	Osterix/Fator de transcrição Sp7

P15	Inibidor de quinase dependente de cíclica 2B
P21	Inibidor da cinase dependente de ciclina 1
P₂O₇	Pirofosfato
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Componente principal
PCA	Análises de componentes principais
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRB	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo beta
pg	Picograma
pH	Potencial (ou potência) hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinases
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLLA	Ácido polilático
PMP	Micropartículas de plaquetas
PO₄	Fosfato
PRP	Plasma-rico em plaquetas
PXN	Paxilina
R²	Coefficiente de determinação
RAC1	Rac gtpase
RANKL	Ativador de receptor do fator nuclear κ B
Raw 264.7	Macrófagos
RHOA	Proteína transformadora rhoa
RHOC	Proteína de ligação a GTP relacionada a Rho
RNA	Ácido ribonucleico
ROCK1	Proteína quinase 1 associada a Rho
RPM	rotações por minuto
RTKs	Receptores tirosina quinase
RT-qPCR	Transcriptase reversa (RT) seguida de quantificação utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase
RUNX2	Fator de transcrição 2 relacionado à runt
S1P	Esfingosina-1-fosfato
SA	Alginato de sódio
SEMA4D	Semaforina 4D
SFB	Soro fetal bovino
SH2	Domínio de homologia a src 2

SH3	Domínio de homologia a src 3
SHC1	Proteína adaptadora SHC 1
SOS1	Fator de troca de nucleotídeo guanina SOS Ras / Rac
SP7	Fator de transcrição Sp7
SRC	Proteína tirosina quinase SRC
STAT	Membros do transdutor de sinal e ativador da família das proteínas de transcrição
TCP	Fosfato tricálcio
TGFBR1	Receptor 1 do fator de crescimento transformador
TGF-β1	O fator de crescimento transformador beta 1
TNFα	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR1	Receptor tirosina quinase 1 Relacionado a Fms
VEGFR2	Receptor de domínio de inserção de quinase
WNT10B	Membro da Família Wnt 10B

Capítulo 1

Introdução e justificativa desta tese

1.1 Tecido ósseo: defeitos e necessidades

O tecido ósseo é um tecido vital ao corpo humano atuando como um sistema interno de sustentação e proteção de órgãos (GAO et al., 2017; KHURANA, 2009). O tecido serve também como um reservatório de íons inorgânicos como cálcio, fosfato, citrato, carbonato, magnésio, fluoreto, dentre outros (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; IAQUINTA et al., 2019; KHURANA, 2009; PREETHI SOUNDARYA et al., 2018). Juntamente ao tecido muscular, o esqueleto determina a forma do corpo em todos os vertebrados e é responsável pela locomoção sem limitações (SCHEINPFLUG et al., 2018). Com o avanço nas pesquisas o tecido ósseo ganhou a nova faceta de um órgão endócrino, com destaque para a síntese de osteocalcina, um hormônio que atua na regulação do metabolismo de glicose, metabolismo energético e fertilidade masculina através da regulação da testosterona (KARSENTY, 2014; KARSENTY; KOUSTENI, 2018). Durante o desenvolvimento, o tecido ósseo tem capacidade de alterar sua forma e tamanho, além de em caso de lesões menores, se regenerar (DIMITRIOU et al., 2011; KHURANA, 2009; MAJIDINIA; SADEGHPOUR; YOUSEFI, 2018). Esta dinâmica tecidual é conhecida por remodelamento ósseo e ocorre por toda a vida, e é orquestrada pelos componentes celulares presentes no tecido. A **Figura 1** contém a representação da estrutura (Macro, micro e nano) do tecido ósseo.

De modo geral, o osso é formado por diferentes células e pela matriz óssea. Três são os tipos celulares especiais que compõe o tecido ósseo, são eles: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Osteoblastos são células mononucleadas, diferenciadas a partir de células tronco mesenquimais, especializada na síntese da matriz óssea. Osteócitos são a forma terminal da diferenciação de osteoblastos, totalizando cerca de 90% das células presentes no osso. São morfológicamente similares a neurônios, apresentando longos dendritos que atuam como sensores mecânicos. Além disso, osteócitos secretam uma série de fatores que atuam no metabolismo de cálcio e fosfato, impactando na mineralização óssea. O terceiro tipo celular são os osteoclastos, células multinucleadas, diferenciadas a partir de células tronco hematopoiéticas, que atuam na reabsorção da matriz óssea (KHURANA, 2009; RACHNER; KHOSLA; HOFBAUER, 2011; SONG, 2017). A matriz óssea por sua vez pode ser subdividida em duas partes: uma parte inorgânica, composta por majoritariamente por hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é a responsável pelo aspecto mineralizado característico do tecido, enquanto que a segunda é a parte orgânica composta por colágeno do tipo 1 (95%) e outras proteínas, conhecidas como proteínas não-colágeno (NCPs), como osteocalcina, osteoconectina, osteopontina, dentre outras (compondo 5%) (GRUSKIN et al., 2012; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; MURSHED, 2018; UNAL; CREECY; NYMAN, 2018). A interface entre colágeno e fosfatos de cálcio (especialmente hidroxiapatita) é fundamental para a estrutura do tecido. Essa interação ocorre majoritariamente entre cálcio e resíduos de prolina nas fibras de colágeno, sendo modulada pela

carbonatação de cristais de hidroxiapatita e presença de NCPs. A complexidade e dinamicidade desta interface é pela absorção e transferência do impacto que o osso é submetido (SONG, 2017; STOCK, 2015).

A vascularização do tecido ósseo é fundamental para sua homeostase durante o desenvolvimento do esqueleto, sobretudo em eventos biológicos referente ao crescimento e remodelação do osso (LAFAGE-PROUST et al., 2015; MERCADO-PAGÁN et al., 2015; MYNENI; MEZEY, 2017). Conjunto de vasos altamente especializados são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes, fatores de crescimento, hormônios, citocinas e quimiocinas, de acordo com as necessidades; além da importante função de remoção de resíduos metabólicos (CHUN et al., 2019; KOCHEROVA et al., 2019). A interação entre o endotélio e células ósseas vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, demonstrando um papel fundamental em eventos celulares de interesse ósseo, como a osteogênese (CARULLI et al., 2018).

Capítulo 6

Conclusão

6.1 Conclusão

Ao todo nossos resultados demonstram que o plasma-rico em plaquetas (PRP) liofilizado impacta na performance celular de osteoblastos de modo similar ao PRP líquido ao serem avaliadas vias clássicas. Também foi possível concluir que a associação do PRP com fosfatos de cálcio avaliados foi possível através da confecção de hidrogéis de alginato de sódio, devendo seu impacto ser mais bem estudado em futuros trabalhos *in vitro* e *in vivo*, como unidades biomiméticas de regeneração tecidual e podendo ser mais bem aplicada em manufatura aditiva.

Referências

AGHAJANOVA, L. et al. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 5, p. 757–770, 2018.

AIYELABEGAN, H. T.; SADRODDINY, E. Fundamentals of protein and cell interactions in biomaterials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, n. 88, p. 956–970, 2017.

ALFORD, A. I.; KOZLOFF, K. M.; HANKENSON, K. D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 65, p. 20–31, ago. 2015.

ALKINDI, M. et al. Guided bone regeneration with osteoconductive grafts and PDGF: A tissue engineering option for segmental bone defect reconstruction. **Journal of applied biomaterials & functional materials**, v. 19, 2021.

AMABLE, P. R. et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: Optimization and quantification of cytokines and growth factors. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 3, p. 1–13, 2013.

ASSIS, R. I. F. et al. Non-coding RNAs repressive role in post-transcriptional processing of RUNX2 during the acquisition of the osteogenic phenotype of periodontal ligament mesenchymal stem cells. **Developmental Biology**, v. 470, n. October 2020, p. 37–48, 2021.

AXPE, E.; OYEN, M. L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

BADER, G. D.; HOGUE, C. W. V. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. **BMC bioinformatics**, v. 4, p. 2, jan. 2003.

BATUSHANSKY, A.; TOUBIANA, D.; FAIT, A. Correlation-Based Network Generation, Visualization, and Analysis as a Powerful Tool in Biological Studies: A Case Study in Cancer Cell Metabolism. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 2009.

BAUM, K.; RAJAPAKSE, J. C.; AZUAJE, F. Analysis of correlation-based biomolecular networks from different omics data by fitting stochastic block models [version 2; peer review: 1 approved, 2 approved with reservations]. **F1000Research**, v. 8, 2019.

BERNARD, M. et al. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices-regulations.: In vitro screening and risk-management. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 8, p. 2025–2053, 2018.

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, 2017.

BILLIET, T. et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 6020–6041, set. 2012.

BIRGE, R. B. et al. SH2 and SH3-containing adaptor proteins: Redundant or independent mediators of intracellular signal transduction. **Genes to Cells**, v. 1, n. 7, p. 595–613, 1996.

BLAKE, J. A. et al. Gene Ontology Consortium: going forward. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D1049–D1056, 28 jan. 2015.

BURNOUF, T. et al. Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. **Blood Reviews**, v. 28, n. 4, p. 155–166, 2014.

BYAMBAA, B. et al. Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 16, p. 1700015, 19 ago. 2017.

CARREIRA, A. C. O. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. **Vitamins and hormones**, v. 99, p. 293–322, 2015.

CARULLI, C. et al. The biomolecular interactions between endothelium and bone cells: an overview. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 32, n. 6 Suppl. 1, p. 173–179, 2018.

CHEN, H. TE et al. Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3k, akt, c-src, and AP-1 signaling pathway. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

CHOI, Y. J. et al. 3D bioprinting of in vitro models using hydrogel-based bioinks. **Polymers**, v. 13, n. 3, p. 1–18, 2021.

CHUN, S. Y. et al. Preparation and Characterization of Human Adipose Tissue-Derived Extracellular Matrix, Growth Factors, and Stem Cells: A Concise Review. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 16, n. 4, p. 385–393, 2019.

CICEK, G. et al. Alpha-tricalcium phosphate (α -TCP): Solid state synthesis from different calcium precursors and the hydraulic reactivity. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 4, p. 809–817, abr. 2011.

CORN, P. G. et al. Targeting fibroblast growth factor pathways in prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 21, p. 5856–5866, 2013.

CÜCE, G.; MURAD, T. Platelets. Em: **Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology**. [s.l.] InTech, 2012. v. 1908p. 2–6.

CURTO, M. et al. Novel recruitment of Shc, Grb2, and Sos by fibroblast growth factor receptor-1 in v-Src-transformed cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 2, p. 555–560, 1998.

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. 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, 2018b.

DA S. FELTRAN, G. et al. Differential inflammatory landscape stimulus during titanium surfaces obtained osteogenic phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 8, p. 1597–1604, 2019.

DA SILVA, L. Q. et al. Platelet-rich plasma lyophilization enables growth factor preservation and functionality when compared with fresh platelet-rich plasma. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 7, 2018.

DA SILVA, R. A. et al. HOXA cluster gene expression during osteoblast differentiation involves epigenetic control. **Bone**, v. 125, n. May, p. 74–86, 2019a.

DA SILVA, R. A. et al. HOXA cluster gene expression during osteoblast differentiation involves epigenetic control. **Bone**, v. 125, 2019b.

DA SILVA, R. A. et al. The Impact of Bioactive Surfaces in the Early Stages of Osseointegration: An in Vitro Comparative Study Evaluating the HAnano® and SLActive® Super Hydrophilic Surfaces. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020a.

DA SILVA, R. A. et al. The Impact of Bioactive Surfaces in the Early Stages of Osseointegration: An in Vitro Comparative Study Evaluating the HAnano® and SLActive® Super Hydrophilic Surfaces. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020b.

DAHIYA, N. et al. Platelet MicroRNAs: An Overview. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 29, n. 4, p. 215–219, 2015.

DAVLOUROS, P. et al. Role of Calcium in Platelet Activation: Novel Insights and Pharmacological Implications. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 131–138, 2016.

DE FUSCO, C. et al. Osteopontin: Relation between Adipose Tissue and Bone Homeostasis. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

DE WITTE, T. M. et al. Bone tissue engineering via growth factor delivery: From scaffolds to complex matrices. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 4, p. 197–211, 2018a.

DE WITTE, T.-M. et al. Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices. **Regenerative Biomaterials**, v. 5, n. 4, p. 197–211, 2018b.

DEMIRTAŞ, T. T.; IRMAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 035003, 13 jul. 2017.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 189, 2014.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 189, 2015.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: Current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v. 9, 2011.

DIOGO, G. S. et al. Manufacture of β -TCP/alginate scaffolds through a Fab@home model for application in bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 6, n. 2, 2014.

DUARTE CAMPOS, D. F. et al. Bioprinting Cell- and Spheroid-Laden Protein-Engineered Hydrogels as Tissue-on-Chip Platforms. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. April, p. 1–13, 2020.

DUDU, V. et al. Role of epidermal growth factor-triggered PI3K/Akt signaling in the migration of medulloblastoma-derived cells. **Cellular and Molecular Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 402–413, 2012.

ERDÖS, P.; RÉNYI, A. On random graphs I. **Publicationes Mathematicae**, v. 6, p. 290–297, 1959.

ESCOBAR, G. et al. Pure platelet-rich plasma and supernatant of calcium-activated P-PRP induce different phenotypes of human macrophages. **Regenerative Medicine**, v. 13, n. 4, p. 427–441, 2018.

FAHIMIPOUR, F. et al. 3D printed TCP-based scaffold incorporating VEGF-loaded PLGA microspheres for craniofacial tissue engineering. **Dental Materials**, v. 33, n. 11, p. 1205–1216, 2017.

FARAMARZI, N. et al. Patient-Specific Bioinks for 3D Bioprinting of Tissue Engineering Scaffolds. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 11, p. 1–9, 2018.

FARIA, A. V. S. et al. The role of phospho-tyrosine signaling in platelet biology and hemostasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 3, p. 118927, 2021.

FERNANDES, C. J. C. et al. Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface creates a biointerface able to govern Src-dependent osteoblast metabolism as prerequisite to ECM remodeling. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 163, p. 321–328, mar. 2018.

FERREIRA, M. R. et al. OsteoBLAST: Computational Routine of Global Molecular Analysis Applied to Biomaterials Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 8 out. 2020.

FERREIRA, M. R.; ZAMBUZZI, W. F. Platelet microparticles load a repertoire of <scp>miRNAs</scp> programmed to drive osteogenic phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, n. November, p. jbm.a.37140, 10 dez. 2020.

FERREIRA, M. R.; ZAMBUZZI, W. F. Platelet microparticles load a repertoire of miRNAs programmed to drive osteogenic phenotype. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 109, n. 8, p. 1502–1511, 2021.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FROHBERGH, M. E. et al. Osseointegrative properties of electrospun hydroxyapatite-containing nanofibrous chitosan scaffolds. **Tissue engineering. Part A**, v. 21, n. 5–6, p. 970–81, 2015.

GAO, C. et al. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone Research**, v. 5, n. May, p. 1–33, 2017.

GAO, X. et al. Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP composite hydrogel as a potential cell carrier for cartilage repair. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 107, n. 9, p. 2076–2087, 2019.

GAVIÑO ORDUÑA, J. F. et al. Use of Platelet-rich Plasma in Endodontic Procedures in Adults: Regeneration or Repair? A Report of 3 Cases with 5 Years of Follow-up. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1294–1301, 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, nov. 2014a.

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

GERYK-HALL, M.; HUGHES, D. P. M. Critical signaling pathways in bone sarcoma: Candidates for therapeutic interventions. **Current Oncology Reports**, v. 11, n. 6, p. 446–453, 2009.

GIACOMO, V. DI; CATALDI, A.; SANCILIO, S. Biological factors, metals, and biomaterials regulating osteogenesis through autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 1–23, 2020.

GILBERT TRIPLETT, R.; BUDINSKAYA, O. New Frontiers in Biomaterials. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 105–115, 2017.

GONGADZE, E. et al. Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 1801–1816, 2011.

GREBE, A.; HOSS, F.; LATZ, E. NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 122, n. 12, p. 1722–1740, 2018.

GRIFFIN, X. L. et al. Platelet rich therapies for long bone healing in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 11 jul. 2012.

GRUSKIN, E. et al. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1063–1077, 2012.

GUAN, N. et al. Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 1438–1451, 2020.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385–396, 2006.

HARMEY, D. et al. Regulation by Osteoblast differentiation by Pasteurella Multocida toxin (PMT): A role for Rho GTPase in bone formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 4, p. 661–670, 2004.

HARRIS, C. R. et al. Array programming with NumPy. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 357–362, 2020.

HAUGEN, H. J. et al. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, n. S21, p. 92–102, 2019.

HAUGEN, H. J. et al. Injectable biomaterials for dental tissue regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020.

HORSTMAN, L. L. et al. Role of platelets in neuroinflammation: A wide-angle perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, p. 1–22, 2010.

HU, K.; OLSEN, B. R. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. **Bone**, v. 91, p. 30–38, 2016.

HUCK, K. et al. The rho GTPase RAC1 in osteoblasts controls their function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 1–16, 2020.

IAQUINTA, M. R. et al. Innovative biomaterials for bone regrowth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–17, 2019.

ISHII, K. et al. **FT-IR analysis of phosphorylated protein**. (M. D. Faupel, P. Meyrueis, Eds.)Biophotonics New Frontier: From Genome to Proteome. **Anais...**8 set. 2004.

JARDIM, V. C. et al. BioNetStat: A tool for biological networks differential analysis. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. JUN, p. 1–13, 2019.

JEONG, J. et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 1, p. 4, 14 dez. 2019.

JIN, Q.; MA, P. X.; GIANNOBILE, W. V. Platelet-Derived Growth Factor Delivery via Nanofibrous Scaffolds for Soft-Tissue Repair. **Advances in skin & wound care**, v. 1, p. 375–381, 2010.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 31, n. 04, p. 381–392, ago. 2005.

KALFAS, I. H. Principles of bone healing. **Neurosurgical focus**, v. 10, n. 4, p. E1, abr. 2001.

KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 4 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. 1700693, fev. 2018.

KARKACHE, I. Y. et al. Serine/threonine phosphatases in osteoclastogenesis and bone resorption. **Gene**, v. 771, p. 145362, 2021.

KARSENTY, G. Chapter 12 - Bone as an Endocrine Organ. Em: ULLOA-AGUIRRE, A.; CONN, P. M. (Eds.). **Cellular Endocrinology in Health and Disease**. Boston: Academic Press, 2014. p. 193–205.

KARSENTY, G.; KOUSTENI, S. Bone as an endocrine organ. **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, v. 18, n. 5, p. 47–51, 2018.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**. , 2020.

KASTEN, P. et al. Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. **Cells Tissues Organs**, v. 183, n. 2, p. 68–79, 2006.

KATZ, M.; AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1161–1176, 30 ago. 2007.

KELLEY, N. et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 1–24, 2019.

KERR, B. A. et al. Platelets govern pre-metastatic tumor communication to bone. **Oncogene**, v. 32, n. 36, p. 4319–4324, 2013.

KHURANA, J. S. **Bone Pathology**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009.

KIM, J. M. et al. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2020.

KIM, T. G. et al. Hierarchically assembled mesenchymal stem cell spheroids using biomimicking nanofilaments and microstructured scaffolds for vascularized adipose tissue engineering. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 14, p. 2303–2309, 2010.

KOCHEROVA, I. et al. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1602, 2019.

KOHLI, N. et al. Bone remodelling in vitro : Where are we headed? **Bone**, v. 110, p. 38–46, 2018.

KRAMMER, T. L.; MAYR, M.; HACKL, M. Micromas as promising biomarkers of platelet activity in antiplatelet therapy monitoring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, 2020.

KUHN, M.; JACKSON, S.; CIMENTADA, J. **corr: Correlations in R**. CRAN, , 2020.

KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, 2015.

LAFAGE-PROUST, M.-H. et al. Assessment of bone vascularization and its role in bone remodeling. **BoneKEy Reports**, v. 4, n. April, p. 1–8, 2015.

LAKHANI, R. S. New biomaterials versus traditional techniques: Advances in cleft palate reconstruction. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 24, n. 4, p. 330–335, 2016.

LANG, S.; LOIBL, M.; HERRMANN, M. Platelet-rich plasma in tissue engineering: Hype and hope. **European Surgical Research**, v. 59, n. 3–4, p. 265–275, 2018.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition**. [s.l.: s.n.].

LEE, H. R. et al. Immobilization of planktonic algal spores by inkjet printing. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019a.

LEE, J. et al. Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 4, p. 1–20, 2019b.

LEE, J. et al. Human adipose-derived stem cell spheroids incorporating platelet-derived growth factor (PDGF) and bio-minerals for vascularized bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 255, n. April, 2020.

LEMMERS, B. et al. **Essential role for caspase-8 in toll-like receptors and NFκB signaling**. **Journal of Biological Chemistry**, 2007.

LI, D. et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. **Nature communications**, v. 7, p. 10872, 2016.

LI, X. et al. HER4 promotes the growth and metastasis of osteosarcoma via the PI3K/AKT pathway. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 52, n. 4, p. 354–362, 2020.

LIENEMANN, P. S.; LUTOLF, M. P.; EHRBAR, M. Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1078–1089, 2012.

MACHADO, M. I. P. et al. Cobalt-chromium-enriched medium ameliorates shear-stressed endothelial cell performance. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, n. April, p. 163–171, jul. 2019.

MAJIDINIA, M.; SADEGHPOUR, A.; YOUSEFI, B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937–2948, 2018.

MAN, Y. et al. Angiogenic and osteogenic potential of platelet-rich plasma and adipose-derived stem cell laden alginate microspheres. **Biomaterials**, v. 33, n. 34, p. 8802–8811, 2012.

MARIE, P. J.; MIRAOU, H.; SÉVEÈRE, N. FGF/FGFR signaling in bone formation: Progress and perspectives. **Growth Factors**, v. 30, n. 2, p. 117–123, 2012.

MARKSTEDT, K. et al. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, 2015.

MARTINEZ-ZELAYA, V. R. et al. In vitro and in vivo evaluations of nanocrystalline Zn-doped carbonated hydroxyapatite/alginate microspheres: zinc and calcium bioavailability and bone regeneration. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 3471–3490, maio 2019.

MARTINS, M. L. et al. Immobilization of Paclitaxel on Hydroxyapatite for Breast Cancer Investigations. **Langmuir**, v. 36, n. 30, p. 8723–8732, 2020.

MARX, R. E. et al. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998.

MCBEATH, R. et al. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 483–495, abr. 2004.

MERCADO-PAGÁN, Á. E. et al. Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 718–729, 2015.

MOUNTZIARIS, P. M.; MIKOS, A. G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 14, n. 2, p. 179–186, jun. 2008.

MUN, S. H.; PARK, P. S. U.; PARK-MIN, K. H. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1239–1254, 2020.

MURSHED, M. Mechanism of Bone Mineralization. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 12, p. 1–12, 2018.

MYNENI, V. D.; MEZEY, E. Regulation of bone remodeling by vitamin K2. **Oral Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1021–1028, 2017.

NADHAN, R.; SRINIVAS, P.; PILLAI, M. R. **RTKs in pathobiology of head and neck cancers**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 147

NANDI, S. K. et al. 3D-printed β -TCP bone tissue engineering scaffolds: Effects of chemistry on in vivo biological properties in a rabbit tibia model. **Journal of Materials Research**, v. 33, n. 14, p. 1939–1947, 27 jul. 2018.

NAYAK, A. K. et al. Hydroxyapatite-alginate Based Matrices for Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 31, p. 3406–3416, 2019.

NEWVILLE, MATTHEW; STENSITZKI, TILL; ALLEN, DANIEL B.; INGARGIOLA, A. **LMFIT: Non-Linear Least-Squares Minimization and Curve-Fitting for Python**. Disponível em: <<https://lmfit.github.io/lmfit-py/intro.html>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R.; SCHWARTZ, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 633–643, set. 2010.

PELLEGRINI, G. et al. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12349, 2018.

PERRINE, S. M. M. et al. Mandibular dysmorphology due to abnormal embryonic osteogenesis in FGFR2-related craniosynostosis mice. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 12, n. 5, 2019.

PREETHI SOUNDARYA, S. et al. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1228–1239, 2018.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: Now and the future. **The Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276–1287, 2011.

RANJAN, K.; PATHAK, C. **FADD regulates NF- κ B activation and promotes ubiquitination of cFLIP L to induce apoptosis**. **Scientific Reports**, 2016.

REN, X. et al. Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. January, p. 1–9, 2020.

ROSSET, E. M.; BRADSHAW, A. D. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. **Matrix Biology**, v. 52–54, n. 1, p. 78–87, maio 2016.

RUCCI, N. Molecular biology of bone remodelling Mini-review. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 49–56, 2008.

SADAT-SHOJAI, M. et al. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7591–7621, 2013.

SANCILIO, S. et al. Alginate/hydroxyapatite-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering improve dental pulp biomineralization and differentiation. **Stem Cells International**, v. 2018, 2018.

SANTOS, A. A. DOS et al. The role of bone morphogenetic protein on bone tissue repair. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 194–195, 2005.

SARTORETTO, S. C. et al. The role of apoptosis associated speck-like protein containing a caspase-1 recruitment domain (ASC) in response to bone substitutes. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 112, p. 110965, jul. 2020.

SCHEINPFLUG, J. et al. Journey into bone models: A review. **Genes**, v. 9, n. 5, 2018.

SCHON, B. S. et al. Validation of a high-throughput microtissue fabrication process for 3D assembly of tissue engineered cartilage constructs. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 3, p. 629–642, mar. 2012.

SCHUURMAN, W. et al. Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties. **Biofabrication**, v. 3, n. 2, 2011.

SCULLY, D.; NASEEM, K. M.; MATSAKAS, A. Platelet Biology in Regenerative Medicine of Skeletal Muscle. **Acta Physiologica**, n. January, p. e13071, 2018.

SEIF, F. et al. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.

SELL, S. L. et al. Principal component analysis of blood microRNA datasets facilitates diagnosis of diverse diseases. **PLoS ONE**, v. 15, n. 6 June, p. 1–26, 2020.

SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 1 nov. 2003.

SHARDA, A.; FLAUMENHAFT, R. The life cycle of platelet granules. **F1000Research**, v. 7, n. 0, p. 236, 2018.

SHARMA, D.; KANNEGANTI, T. D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. **Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 6, p. 617–629, 2016.

SHEN, C. et al. Transforming the Degradation Rate of β -tricalcium Phosphate Bone Replacement Using 3-Dimensional Printing. **Annals of Plastic Surgery**, v. 87, n. 6, p. e153–e162, dez. 2021.

SHI, X. et al. Research progress on the PI3K/AKT signaling pathway in gynecological cancer (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 6, p. 4529–4535, 2019.

SINGH, A. et al. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. **Progress in Orthodontics**, v. 19, n. 1, 2018.

SINGH, S. et al. Structure functional insights into calcium binding during the activation of coagulation factor XIII A. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2019.

SONG, J. L. et al. Enhancement of mechanical strength of TCP-alginate based bioprinted constructs. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 103, n. November 2019, p. 103533, 2020.

SONG, L. Calcium and Bone Metabolism Indices. Em: **Advances in Clinical Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 82p. 1–46.

STOCK, S. R. The Mineral–Collagen Interface in Bone. **Calcified Tissue International**, v. 97, n. 3, p. 262–280, 2015.

SU, N.; JIN, M.; CHEN, L. **Role of FGF/FGFR signaling in skeletal development and homeostasis: Learning from mouse models**. **Bone Research**China, 2014.

TANG, Z. et al. Inhibition of CRY2 by STAT3/miRNA-7-5p Promotes Osteoblast Differentiation through Upregulation of CLOCK/BMAL1/P300 Expression. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 19, n. March, p. 865–876, 2020.

THRIVIKRAMAN, G. et al. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 4, p. 835–856, 2017.

THUSHARA, R. M. et al. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: An outlook. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 93, n. 3, p. 149–158, mar. 2015.

UDOMLUCK, N. et al. Surface functionalization of dual growth factor on hydroxyapatite-coated nanofibers for bone tissue engineering. **Applied Surface Science**, v. 520, n. March, p. 146311, 2020.

UNAL, M.; CREECY, A.; NYMAN, J. S. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, n. 3, p. 205–215, 2018.

USHEY, K.; ALLAIRE, J. J.; TANG, Y. **reticulate: Interface to “Python”**. , 2021.

UTAMA, R. H. et al. A 3D Bioprinter Specifically Designed for the High-Throughput Production of Matrix-Embedded Multicellular Spheroids. **iScience**, v. 23, n. 10, 2020.

VALENZUELA, C. P.; RODRIGUEZ-LLAMAZARES, S. **spftir: Pre-Processing and Analysis of Mid-Infrared Spectral Region**. , 2016.

VARDAR, E. et al. IGF-1-containing multi-layered collagen-fibrin hybrid scaffolds for bladder tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 41, p. 75–85, 2016.

VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, n. 7, p. 1057–1066, 2009.

VEGA, F. M. et al. RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. **Journal of Cell Biology**, v. 193, n. 4, p. 655–665, 2011.

VILGELM, A. E. et al. MDM2 antagonists overcome intrinsic resistance to CDK4/6 inhibition by inducing p21. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 505, 2019.

VISHWAKARMA, A. et al. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 470–482, jun. 2016.

VY, M. et al. Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries (Review) Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 4, p. 1–126, 2013.

WALMSLEY, G. G. et al. Stem Cells in Bone Regeneration. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 12, n. 5, p. 524–529, 2016.

WANG, C.; LIAO, H.; CAO, Z. Role of osterix and microRNAs in bone formation and tooth development. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 2934–2942, 2016.

WANG, K. et al. Optimization of the Platelet-Rich Plasma Concentration for Mesenchymal Stem Cell Applications. **Tissue Engineering - Part A**, v. 25, n. 5–6, p. 333–351, 2019.

WANG, L. et al. NLRP3 inflammasome activation in mesenchymal stem cells inhibits osteogenic differentiation and enhances adipogenic differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 484, n. 4, p. 871–877, 2017a.

WANG, X. et al. Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 2, fev. 2017b.

WANG, Z. et al. Mechanism of dexmedetomidine regulating osteogenesis-angiogenesis coupling through the miR-361-5p/VEGFA axis in postmenopausal osteoporosis. **Life Sciences**, v. 275, n. 126, p. 119273, jun. 2021.

WEI, P. et al. IGF-1-releasing PLGA nanoparticles modified 3D printed PCL scaffolds for cartilage tissue engineering. **Drug Delivery**, v. 27, n. 1, p. 1106–1114, 2020.

WEIL, T.; BARZ, M. From Polymers to Functional Biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, v. 17, n. 10, p. 17–20, 2017.

WICKHAM, H. et al. Welcome to the {tidyverse}. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WITT, R. et al. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. **BMC Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 15, 28 dez. 2017.

WU, J.; HEEMSKERK, J. W. M.; BAATEN, C. C. F. M. J. Platelet Membrane Receptor Proteolysis: Implications for Platelet Function. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2021.

XIE, Y. et al. Effects of PRP and LyPRP on osteogenic differentiation of MSCs. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 1, p. 116–126, 2020a.

XIE, Y. et al. FGF/FGFR signaling in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020b.

XU, S. et al. Effects of HAp and TCP in constructing tissue engineering scaffolds for bone repair. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 30, p. 6110–6118, 2017.

YU, T. et al. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZADPOOR, A. A. Meta-biomaterials. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 1, p. 18–38, 2020.

ZAFAR, M. S. et al. Biomimetic aspects of restorative dentistry biomaterials. **Biomimetics**, v. 5, n. 3, p. 1–42, 2020.

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

ZAMBUZZI, W. F. et al. Biological behavior of pre-osteoblasts on natural hydroxyapatite: a study of signaling molecules from attachment to differentiation. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 97, n. 2, p. 193–200, maio 2011b.

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

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

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

ZHANG, W. et al. Mechanisms of miR-128-3p in inhibiting osteoblast differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 22, n. 6, p. 5041–5052, 2020.

ZHANG, X. et al. Engineering Platelet-Rich Plasma Based Dual-Network Hydrogel as a Bioactive Wound Dressing with Potential Clinical Translational Value. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 8, p. 1–14, 2021.

ZHANG, Y. H. Nitric oxide signalling and neuronal nitric oxide synthase in the heart under stress. **F1000Research**, v. 6, n. May, 2017.

ZHAO, B. Intrinsic Restriction of TNF-Mediated Inflammatory Osteoclastogenesis and Bone Resorption. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. October, p. 1–8, 2020.

ZHAO, H. Y. et al. Research Advances in Tissue Engineering Materials for Sustained Release of Growth Factors. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

ZHOU, H. et al. Monetite (Dcpa), an Important Calcium Phosphate Compound - its Structure, Processing, and Applications. **SSRN Electronic Journal**, 2020.

ZOU, J. et al. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells. **Connective Tissue Research**, v. 55, n. 4, p. 304–309, 2014.