

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

MARCEL RODRIGUES FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, 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 BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

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

MARCEL RODRIGUES FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, 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 compartilharem 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, jantas, 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 alternativos 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 absorbância 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 β e Tnf α	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 tricalcio (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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 hidrogeis 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 imunoabsorção 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	Grama
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 láctico-co-ácido glicólico)
PLLA	Ácido polilático
PMP	Micropartículas de plaquetas
PO₄	Fosfato
PRP	Plasma-rico em plaquetas
PXN	Paxilina
R²	Coeficiente 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 morfologicamente 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).

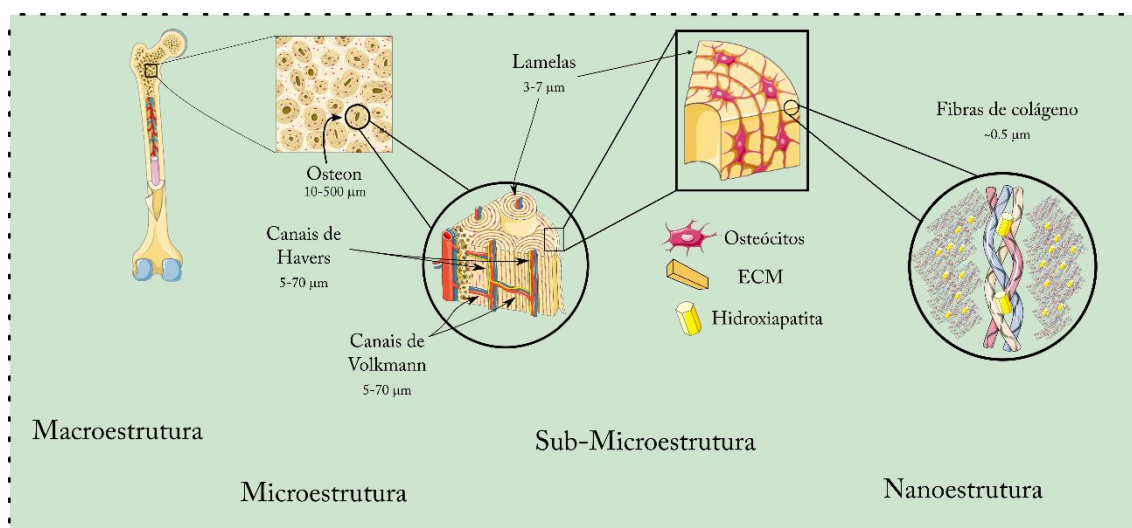


Figura 1 - Estruturas do tecido ósseo. Elementos gráficos foram obtidos em <https://smart.servier.com/>.

1.2 A sincronia das células ósseas

O tecido ósseo passa por remodelamento ao longo da vida. Este remodelamento tem como objetivo a manutenção da homeostase de cálcio e outros íons, a correção de microfraturas e isquemias ósseas (GEMINI-PIPERNI et al., 2014a; RUCCI, 2008). O remodelamento é composto de dois processos: a reabsorção óssea realizada por osteoclastos e a síntese de nova matriz por osteoblastos (SANTOS et al., 2005; ZAMBUZZI; MILANI; TETI, 2010). O processo de reabsorção se dá pelo recrutamento de células precursoras de osteoclastos, seguido de seu comprometimento com o fenótipo osteoclástico, etapa conhecida por osteoclastogênese (KARKACHE et al., 2021; ZHAO, 2020). Uma vez maduros, os osteoclastos secretam fosfatases ácidas para a degradação da fase mineral e proteínas como metaloproteinases e *cathepsina K* (CSTK) responsáveis pela degradação da matriz orgânica (RUCCI, 2008; SONG, 2017). Já

osteoblastos atuam sintetizando a matriz através da secreção de proteínas como colágeno do tipo I e NPCs (GEMINI-PIPERNI et al., 2014b; ZHAO, 2020). Osteoblastos modulam a osteoclastogênese através da secreção de *fator estimulante de colônia de macrófagos* (M-CSF), *ativador de receptor do fator nuclear κB* (RANKL) e *osteoprotegerina* (OPG). M-CSF é a responsável pela formação de aglomerados de macrófagos, conhecidos como colônias, enquanto RANKL dispara as vias de sinalização de MAPK e NF κ B levando a maturação de osteoclastos (MUN; PARK; PARK-MIN, 2020). Já OPG funciona como uma armadilha sequestrando RANKL e desta maneira regulando negativamente a osteoclastogênese (MUN; PARK; PARK-MIN, 2020) (**Figura 2**). Osteoclastos também agem modulando a atividade de osteoblastos através de moléculas secretadas. Proteínas como WNT10B, S1P, CTHRC1 e C3 agem induzindo a diferenciação osteoblástica, enquanto SEMA4D atua na sua inibição (KIM et al., 2020; LI et al., 2016). Fatores de crescimento solúveis como TGF- β 1 e IGF1 presentes na matriz são liberados durante a reabsorção óssea podendo modular a atividade de osteoblastos, demonstrando um efeito indireto de osteoclastos na atividade de osteoblastos (KIM et al., 2020; LI et al., 2016).

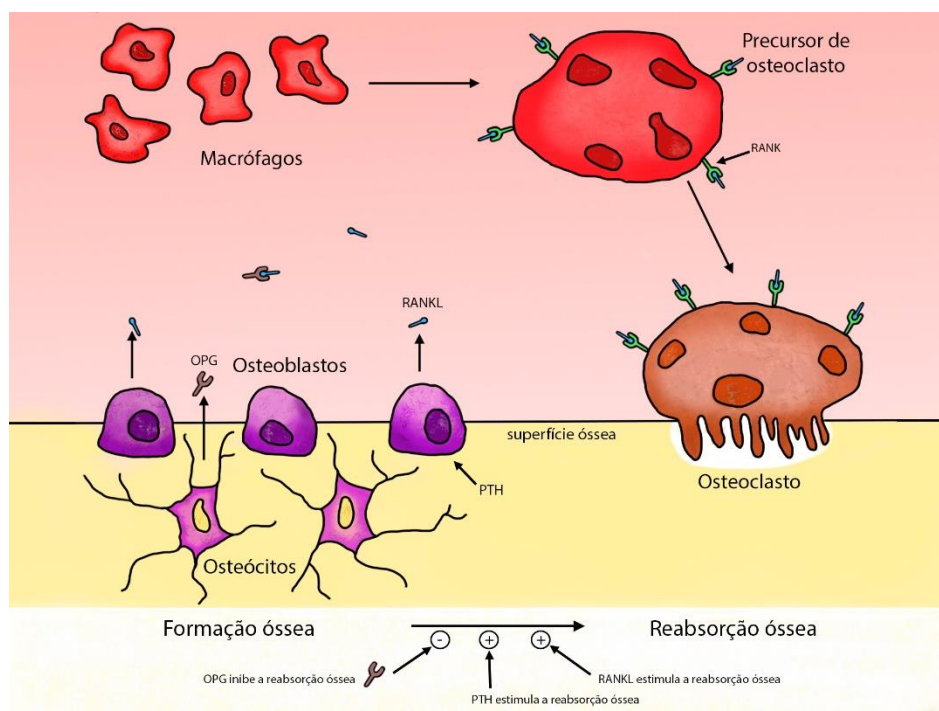


Figura 2 – Comunicação celular entre osteoblastos e osteoclastos. Figura adaptada gentilmente por Paula Bertin de Moraes de <https://www.orthobullets.com/basic-science/9010/bone-signaling-and-rankl> acessada em 25/06/2021.

1.3 Regeneração óssea

A regeneração óssea é um complexo processo multifatorial na qual a região lesada do tecido é preenchida com células funcionais de mesmas características que o tecido original. Este

processo é regido por diferentes tipos celulares e modulados por citocinas, fatores de crescimento e outras biomoléculas (MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008).

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

O processo de regeneração óssea é composto por distintas etapas, que podem ocorrer de modo simultâneo (**Figura 3**). São elas: inflamação, formação de calos, formação de calos duros, remodelação (DE WITTE et al., 2018b; KALFAS, 2001; MOUNTZIARIS; MIKOS, 2008). A etapa inflamatória ocorre nos primeiros dias após a lesão, onde o coágulo resultante do rompimento de vasos libera diversas citocinas pro-inflamatórias, de origem plaquetárias que estimulam o recrutamento de células inflamatórias (ALFORD; KOZLOFF; HANKENSON, 2015; DE WITTE et al., 2018b). Citocinas classicamente relatadas a este processo são FGF2, M-CSF, IL1 e IL6 (DE WITTE et al., 2018b). Após o período inflamatório ocorre a formação do calo mole. Durante esta etapa ocorre a angiogênese na região lesada, de modo a prover oxigênio e transportar células competentes a região (DE WITTE et al., 2018b). A angiogênese é um processo crucial para a regeneração óssea, que por sua vez é modulada por moléculas pro-angiogênicas de origem osteoblástica e/ou plaquetária (FROHBERGH et al., 2015; LIENEMANN; LUTOLF; EHRBAR, 2012). A etapa seguinte, formação de calo duro, onde os osteoblastos maduros secretam matriz óssea e osteoclastos agem no remodelamento do novo tecido. Esta etapa é regida por BMPs e fatores de crescimento como TGF β , FGF, IGF e PDGF (DE WITTE et al., 2018b). Assim, faz-se necessários biomateriais inteligentes capazes de orquestrar moléculas provenientes de diferentes tipos celulares, integrando uma resposta biológica capaz de favorecer os mecanismos de reparo tecidual.

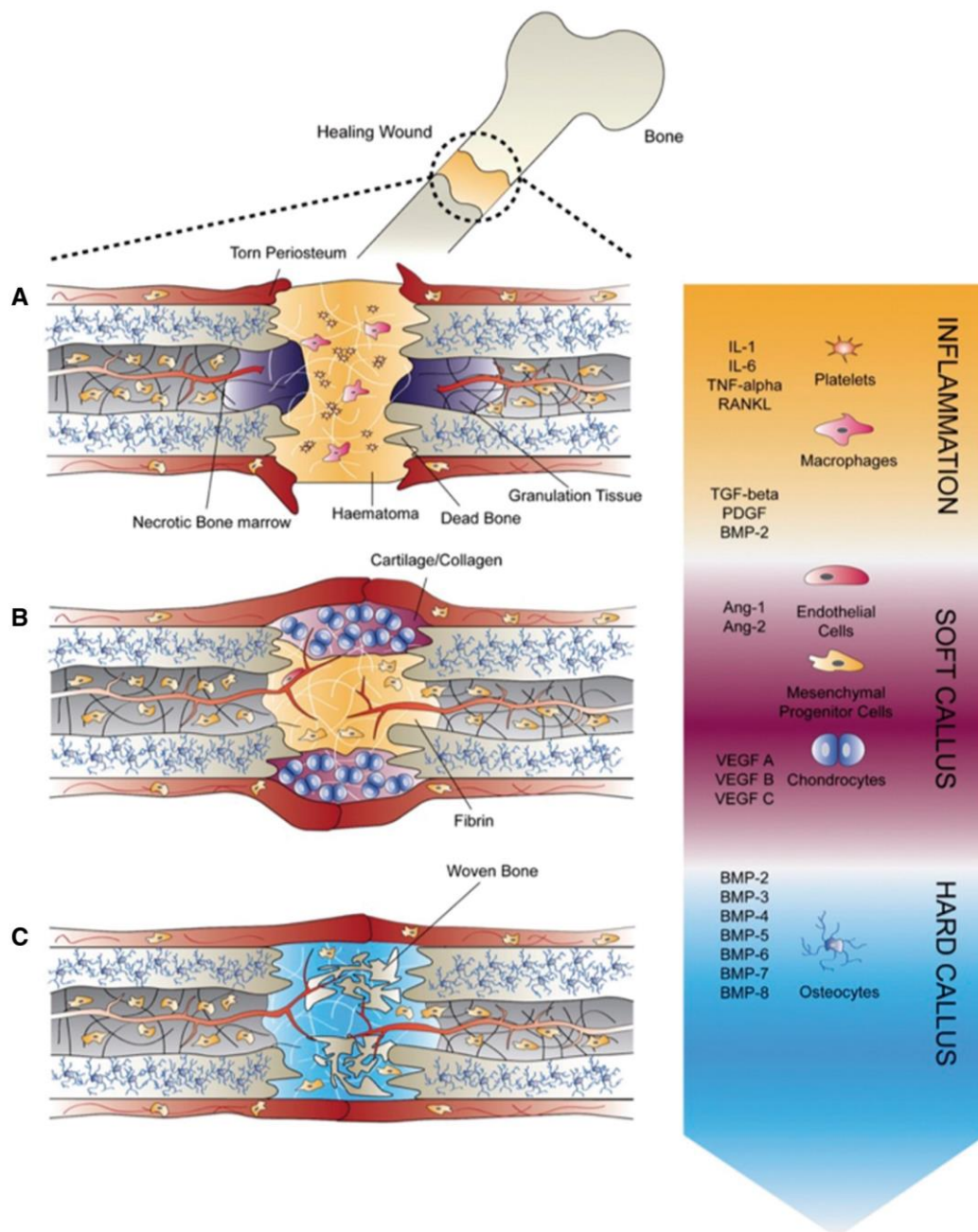


Figura 3 – Diferentes etapas da regeneração óssea. Figura publicada por DE WITTE et al., 2018.

1.4 Biomateriais

A despeito da ótima capacidade de remodelamento do tecido ósseo, uma vez que ocorra uma lesão que supere o tamanho crítico faz-se necessário o uso de intervenções para auxiliar na regeneração tecidual (LEE et al., 2019b; THRIVIKRAMAN et al., 2017). A engenharia de tecidos para o osso apoia-se principalmente em quatro pilares:

- Recrutar células competentes para a região lesionada;
- Uso de moléculas de sinalização para guiar a resposta celular;

- iii. Matrizes de suporte, capazes de direcionar e sustentar a formação do osso durante sua regeneração, os biomateriais;
- iv. Estabilidade mecânica da região lesionada.

Embora saibamos que o enxerto de osso autólogo seja o padrão-ouro para terapêutica do tecido lesado, devido a suas excelentes propriedades osteocondutora (estimular/conduzir células ósseas por sua superfície), osteoindutora (indução do processo de diferenciação em células progenitoras) e osteogênica (capacidade da formação de osso devido a presença de células competentes), a obtenção deste tecido, que normalmente ocorre por acesso em vias intra-orais e da crista ilíaca, reflete em uma significativa morbidade e custo para o paciente, além de afetar diretamente sistema de saúde público e muitas vezes em quantidade e qualidade limitadas (KOHLI et al., 2018). Dentre as alternativas sintéticas, próteses de titânio são considerados o padrão-ouro, capaz de fornecer excelente integração com o tecido e modular eventos celulares de interesse, como adesão, proliferação e diferenciação celular (GONGADZE et al., 2011; KULKARNI et al., 2015; PELLEGRINI et al., 2018). A modificação de superfícies de titânio é uma estratégia que demonstra excelentes resultados. Esta modificação pode ocorrer através de ataques ácidos de modo a promover uma nanotexturização da superfície (BEZERRA et al., 2017; DA SILVA et al., 2020a; FERNANDES et al., 2018). Outra modificação se dá na adição de cristais de hidroxiapatita em escala nanométrica promovendo uma resposta celular mais rápida, diminuindo o tempo da osteointegração (BEZERRA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020).

Biomateriais metálicos como o titânio possuem como desvantagem o fato de serem praticamente não reabsorvíveis pelo organismo, pode ocorrer infecção no local, apresentarem um módulo de Young¹ distinto do tecido original, dentre outras (DE WITTE et al., 2018a). Outra classe de material amplamente utilizado é cerâmicas, com grande destaque ao uso de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita (HAp) e fosfato tricálcio (TCP) (JEONG et al., 2019). Ambos apresentam excelentes propriedades osteocondutivas, osteoindutoras, não apresentando toxicidade, e podendo ser degradados pelo organismo durante o processo de reabsorção (JEONG et al., 2019; XU et al., 2017). Apesar destas vantagens em sua aplicação, fosfatos de cálcio são quebradiços o que limita sua aplicação terapêutica (BERNARD et al., 2018; WEIL; BARZ, 2017; XU et al., 2017). Para contornar esse desafio é proposto associá-los ao uso de polímeros de alta biocompatibilidade, assim aumentando a resistência mecânica e elasticidade do biomaterial. De fato esta estratégia visa mimetizar o tecido ósseo que utiliza fibras de colágeno do tipo I juntamente a hidroxiapatita (LANZA; LANGER; VACANTI, 2013; ZAFAR et al., 2020).

¹ Propriedade elástica de corpos sólidos ao resistirem a tensões mecânicas lineares.

Diversos polímeros são utilizados na mimetização do tecido ósseo com foco regeneração óssea, estes podendo ser de origem natural ou sintética (LANZA; LANGER; VACANTI, 2013; ZAFAR et al., 2020). A escolha do polímero envolve um balanço entre suas vantagens e desvantagens. A **Tabela 1** adaptada de Choi et al. resume as principais vantagens e desvantagens de cada polímero.

Tabela 1 - Polímeros utilizados em regeneração óssea. Adaptado de (CHOI et al., 2021).

Tipo	Material	Vantagem	Desvantagem
Natural	Alginato	Gelificação simples Boa estabilidade	Menos interação celular Menos biodegradação
	Gelatina	Baixa antigenicidade Baixo custo	Menos estável Baixas propriedades mecânicas
	Ácido hialurônico	Boa interação celular Boa angiogênese	Degradação rápida Baixa estabilidade mecânica
	Fibroína de seda	Degradação lenta Boas propriedades mecânicas	Resposta alérgica Menos interação celular
	Colágeno	Boa interação celular	Menos estabilidade Baixas propriedades mecânicas
	Fibrina	Boa angiogênese Gelificação rápida	Baixa estabilidade mecânica Obstrui facilmente
	Matriz extracelular desmineralizada	Semelhante à composição e estrutura de ECM nativa	Baixa fidelidade de formato Baixas propriedades mecânicas
Sintética	Agarose	Gelificação simples	Menos estabilidade Baixas propriedades mecânicas
	Polietilenoglycol (PEG)	Reprodutibilidade Modificação química fácil	Interação celular baixa Frac resistência mecânica
	Polissiloxano	Boas propriedades mecânicas Degradação lenta	Baixa interação celular Relativamente caro

Para este trabalho optamos pela utilização do alginato. Alginato é um polímero abundante na natureza sendo encontrado como componente estrutural em algas marinhas marrons (phaeophyceae) e como polissacarídeo capsular em bactérias do solo (HECHT; SREBNIK, 2016).

De fórmula química $(C_6H_8O_6)_n$, alginato é composto por monômeros de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, sendo estes conhecidos como blocos M e G, respectivamente, ligados por uma ligação β -1,4 (DODERO et al., 2019; HECHT; SREBNIK, 2016; YOON et al., 2014). Inúmeras aplicações biotecnológicas vêm sendo implementadas utilizando alginato devido a sua alta capacidade de reticulação (“cross-linking”) instantânea independente de temperatura e a sua transição sol/gel na presença de cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , dentre outros (HECHT; SREBNIK, 2016; YOON et al., 2014). O modelo de reticulação da alginato é conhecido como caixa-de-ovos (“egg-box”), onde os cátions multivalente interagem com os blocos G provendo resistência a rede formada (LEE et al., 2019a).

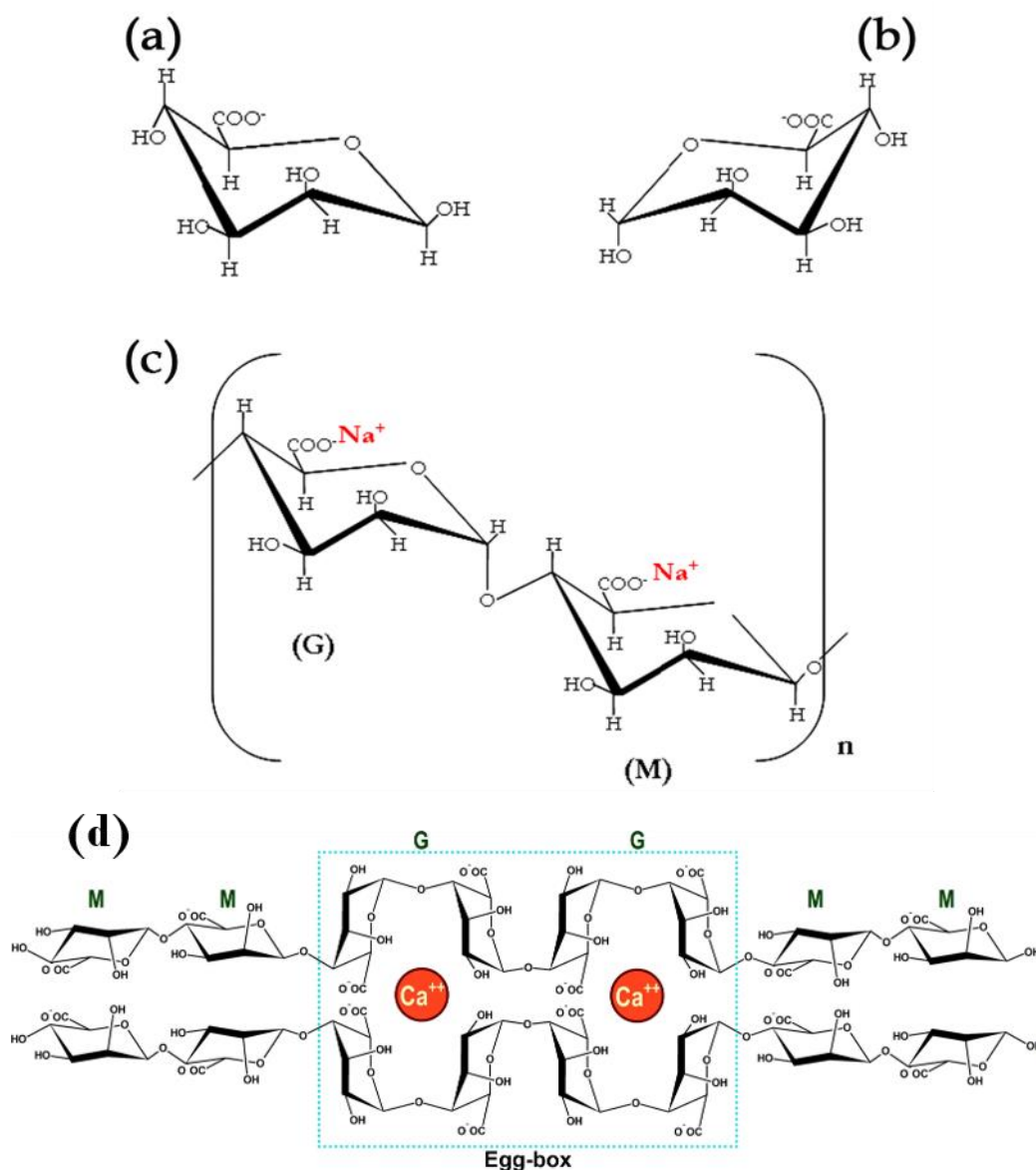


Figura 4 - Estrutura química de alginato. A) Monômero de ácido α -L-gulurônico, b) monômero de ácido β -D-manurônico, c) polímero de alginato com átomo de sódio, d) esquema do modelo de caixa-de-ovos para a reticulação com átomos de cálcio (Adaptado de Lee et al. 2019).

1.5 Fatores de crescimento para a construção do tecido

Fatores de crescimento (GF) são proteínas solúveis que desempenham papel central na sinalização celular em diferentes processos biológicos como crescimento celular, migração celular, viabilidade celular, diferenciação dentre outras (FERREIRA; ZAMBUZZI, 2020; GUAN et al., 2020). Dentre os GFs mais conhecidos estão o *fator de crescimento endotelial vascular* (VEGF), *fator de crescimento epidérmico* (EGF), *factor de crescimento derivado de plaquetas* (PDGF), *fator de crescimento semelhante à insulina* (IGF), *fator de crescimento transformador beta* (TGF β) e *proteína morfogenética óssea* (BMP) que apresentam conhecida ação no tecido ósseo. A **Tabela 2** contém um resumo destes GFs e seus os mecanismos conhecidos.

Tabela 2 - Relação de fatores de crescimento e sua ação no tecido ósseo.

GF	Origem celular	Efeito biológico	Ação no osso
BMP	Células endoteliais, células osteoprogenitoras, condrócitos, osteoblastos	Condro/osteogênese, osteoindução	Migração de osteoprogenitores, indução de proliferação, diferenciação e síntese da matriz
EGF	Rins, próstata, glândula salivares, pâncreas	Inibição da osteogênese	Sinergismo com mecanotransdução, regulação da fase inflamatória
FGF	BMSC, condrócitos, células endoteliais, macrófagos, monócitos, osteoblastos, plaquetas	Angiogênese, proliferação de fibroblastos e células musculares lisas dos vasos	Maturação de condrócitos (FGF-1). Proliferação e diferenciação de osteoblastos, inibição da apoptose de osteoblastos imaturos, indução da apoptose de osteócitos maduros, reabsorção óssea (FGF-2)
IGF	Células endoteliais, condrócitos, hepatócitos, osteoblastos, plaquetas	Regulação dos efeitos do hormônio do crescimento	Proliferação de osteoblastos e síntese da matriz óssea, reabsorção óssea
PDGF	Células endoteliais, macrófagos, monócitos, osteoblastos, plaquetas	Proliferação de células do tecido conjuntivo, quimiotaxia de monócitos / macrófagos e células musculares lisas, angiogênese	Migração, proliferação e diferenciação de osteoprogenitores
TGF-β	BMSC, condrócitos, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, plaquetas	Imunossupressão, angiogênese, estimulação do crescimento celular, diferenciação e síntese ECM	Proliferação indiferenciada de células mesenquimais, recrutamento de precursores de osteoblastos; diferenciação de osteoblastos e

			condrócitos (mas inibição da diferenciação terminal), produção de matriz óssea, recrutamento de precursores de osteoclastos
VEGF	Osteoblastos, plaquetas	Angiogênese	Conversão de cartilagem em osso, proliferação e diferenciação de osteoblastos

Nas últimas décadas a engenharia de tecidos vem buscando utilizar estes fatores de crescimento na construção de biomateriais inteligentes para regeneração tecidual (GUAN et al., 2020; ZHANG et al., 2021). A fonte destes fatores de crescimento pode se dar através de proteínas recombinantes ou de fonte autóloga (ZAFAR et al., 2020; ZHANG et al., 2021; ZHAO et al., 2015). Dentre os biomateriais propostos destacam-se o uso de hidrogéis capazes de serem injetados no local da lesão e prover a distribuição destes fatores de crescimento de modo localizado (HAUGEN et al., 2020; REN et al., 2020; ZAFAR et al., 2020).

Em um trabalho de revisão Ren et al. descrevem que fatores de crescimento podem ser ligados covalentemente a fibrina através de reação com o fator de coagulação XIIIa, se ligando assim aos resíduos de lisina da rede de fibrina (REN et al., 2020). Diversos fatores de crescimento não possuem em suas sequencias domínio de ligação com metais o que dificulta sua direta interação com hidroxapatita e outros cálcio-fosfatos, por isso é necessário a interação destes com proteínas do matriz extracelular óssea como osteocalcina e osteoconectina (REN et al., 2020).

1.6 Sinalização celular baseada em fatores de crescimento como estratégia na bioengenharia de tecidos

Células contém uma série de receptores especializados em sua membrana que ao interagirem com os diferentes fatores de crescimento desencadeiam vias de sinalização específicas (GUAN et al., 2020; NADHAN; SRINIVAS; PILLAI, 2020). Estes receptores são classicamente relatados como do tipo tirosina quinase (RTKs) e, de modo resumido, após o estímulo de fatores de crescimento estes receptores se homo ou heterodimerizam e ocorre a fosforilação de resíduos tirosina da porção intracelular (ZAMBUZZI et al., 2011a). Após este primeiro evento, proteínas sinalizadoras que contenham domínios SH2 ou SH3 interagirem os resíduos de fosfotirosina e disparam uma cascata de sinalização modulada por proteínas quinase e fosfatase (BIRGE et al., 1996). Vias de sinalização celulares clássicas com MAPK, PI3K-AKT, JAK-STAT são exemplos de vias moduladas por fatores de crescimento (DUDU et al., 2012; KATZ; AMIT; YARDEN, 2007; SEIF et al., 2017; SHI et al., 2019).

Uma série de trabalhos vem nos últimos anos explorando o efeito de fatores de crescimento entregues via biomateriais em diversos tecidos. A associação de IGF com fibrina-colágeno foi estudada para a engenharia de tecidos da bexiga e musculoesquelético (VARDAR et al., 2016; WITT et al., 2017) e com PLGA para cartilagem (WEI et al., 2020). VEGF foi associado a TCP, PLGA e GelMA (Gelatina metacrilada) para confecção de materiais com maior poder de indução da angiogênese no local da lesão (BYAMBAA et al., 2017; FAHIMIPOUR et al., 2017). O efeito de indução da angiogênese e da osteogênese de PDGF também foi estudado em associação a TCP, PLLA e PLGA (ALKINDI et al., 2021; JIN; MA; GIANNOBILE, 2010; LEE et al., 2020). FGF e BMP2 foram associadas a hidroxiapatita através de nanofibras de gelatina e foram utilizados em modelo de diferenciação osteoblástica utilizando células mesenquimais de tecido adiposo (UDOMLUCK et al., 2020). Esses são alguns exemplos de trabalhos que buscam a incorporação de fatores de crescimento a biomateriais na busca de modular as etapas da regeneração tecidual. No entanto, a maioria desses trabalhos apresentam uma lacuna na exploração de vias de sinalização celulares clássicas, focando na expressão genes/proteínas como colágeno, RUNX2, osterix, osteocalcina, dentre outras pertencentes ao processo de diferenciação osteoblástica e matriz óssea.

1.7 Plaquetas: Biologia e fonte de autóloga de moléculas ativas

Plaquetas são células componentes do sangue essenciais para a hemostasia atuando na manutenção da integridade vascular quando estão são lesionadas (SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018). Com formato discoide e anucleadas, plaquetas vem ganhando atenção devido a descoberta de sua participação em distintos processos biológicos como angiogênese, cicatrização, metástase, inflamação, imunidade inata, crescimento e desenvolvimento (BURNOUNF et al., 2014; KERR et al., 2013; SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018). Originadas através da apoptose de megacariócitos a medula óssea durante o processo de apoptose, plaquetas possuem a maquinaria celular da célula-mãe para seu funcionamento normal, o que acarreta em sofrerem o processo de apoptose como qualquer célula nucleada, exceto pelos eventos de apoptose nuclear (THUSHARA et al., 2015). A apoptose em plaquetas é responsável pelo evento conhecido por degranulação plaquetária ou a exocitose granular, que pode ser considerado o evento central à função plaquetária, sendo parte de todo rol de atividades plaquetárias (SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018; THUSHARA et al., 2015). São três os principais tipos de grânulos, conhecidos, presentes em plaquetas: Grânulos alfa, densos e lisossomos (SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018). Importante destacar que diversos autores atribuem a esse conjunto de grânulos o termo micropartículas de plaquetas (PMP).

Medindo cerca 200-500 nm, os grânulos-alfa são estruturas exclusivas de plaquetas sendo os tipos mais abundantes de grânulos com cerca de 50-80 por plaqueta, sendo responsável por

cerca de 10 % de seu volume. Já os grânulos-denso são os segundos mais abundantes, com cerca de 3-10 por plaqueta e diâmetro com aproximadamente 150 nm. Também são estruturas exclusivas a plaquetas. Por fim, plaquetas possuem cerca de 1-3 lisossomos e peroxissomos, porém sua função em plaquetas permanece desconhecida. Seu diâmetro é de aproximadamente 200-250 nm (CÜCE; MURAD, 2012; SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018). Estes distintos grânulos possuem conteúdos de biomoléculas distintas (FARIA et al., 2021; SHARDA; FLAUMENHAFT, 2018).

O processo de ativação plaquetária ocorre pela interação de diversos agonistas com receptores de membrana (DAVLOUROS et al., 2016; FARIA et al., 2021; WU; HEEMSKERK; BAATEN, 2021). Proteínas como colágeno, fibrina, fibronectina, trombina, fator de von Willebrand são alguns exemplos de agonistas para a ativação plaquetária (FARIA et al., 2021; HORSTMAN et al., 2010; JURK; KEHREL, 2005). A ativação plaquetária é um processo biológico fundamental para a manutenção da integridade vascular, porém sua desregulação é observada em uma série de doenças. Após a ativação uma série de eventos ocorrem para a conversão do fibrinogênio, uma proteína solúvel no plasma, para fibrina, um polímero insolúvel, por meio de ação da enzima trombina (WU; HEEMSKERK; BAATEN, 2021).

Uma série de proenzimas auxiliam esta etapa, que ao final promove a formação do coágulo formado pela rede de fibrina. Estas, conhecidas como fatores de coagulação, foram nomeadas de I a XIII de acordo com a ordem de sua descoberta (WU; HEEMSKERK; BAATEN, 2021). O cálcio iônico, designado como fator IV, exerce um papel importante neste processo modulando diversas reações na cascata de coagulação, sendo concentrações de cálcio sério acima de 0,9 mM sendo capazes de promover a coagulação (DAVLOUROS et al., 2016; SINGH et al., 2019; VARGA-SZABO; BRAUN; NIESWANDT, 2009). A **Figura 5** contém um esquema da complexa cascata de coagulação, com especial destaque para a participação do cálcio.



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).

1.8 Plasma-rico em Plaquetas (PRP): processo de obtenção, resultados preliminares e aplicações clínicas

O processo de obtenção do PRP é baseado em isolar a porção do plasma e em seguida concentrar as plaquetas de um doador. Em uma revisão publicado pelo grupo de Dhurat e Sukesh foram discutidas as principais estratégias (DHURAT; SUKESH, 2014). De modo geral, existem dois métodos principais, segundo Dhurat e Sukesh: método do PRP puro e método “buff-coat”,

utilizado para a produção de PRP rico em leucócitos (L-PRP). Ambos os procedimentos consistem em duas etapas de centrifugação, com diferença nas velocidades aplicadas em cada etapa. Após a primeira centrifugação o sangue é dividido em três frações, a inferior contém eritrócitos, a superior contendo plasma e plaquetas e uma camada fina intermediária, conhecida como “buffy coat”, contendo leucócitos. O método do PRP puro consiste em coletar toda a porção superior (Plasma e plaquetas), e realizar uma segunda centrifugação para concentrar as plaquetas na porção inferior. Já para o método do “buffy coat” a camada de leucócito também é coletada e em seguida levada para uma segunda centrifugação onde leucócitos serão removidos do PRP.

A escolha das velocidades das centrifugações é oposta para cada método: para o PRP puro primeiro se realiza uma centrifugação lenta e depois uma mais rápida, já para o método “buffy coat” primeira é realizada uma rápida e depois uma lenta. Parâmetros como temperatura, tempo de centrifugação e intervalos entre as centrifugações são importantes para a otimização da obtenção do PRP (AMABLE et al., 2013; DHURAT; SUKESH, 2015). A revisão de Dhurat e Sukesk indicou o método proposto por Amable et al. como o melhor procedimento para obtenção de PRP baseado no isolamento de plaquetas e quantificação de citocinas e fatores de crescimento após ativação plaquetária (AMABLE et al., 2013; DHURAT; SUKESH, 2015). O método proposto por Amable et al. consiste em uma primeira centrifugação lenta a $300 \times g$ por 5 minutos, seguida de uma centrifugação mais forte a $700 \times g$ por 17 minutos. A ativação plaquetária se deu utilizando 20 mM de CaCl_2 (AMABLE et al., 2013).

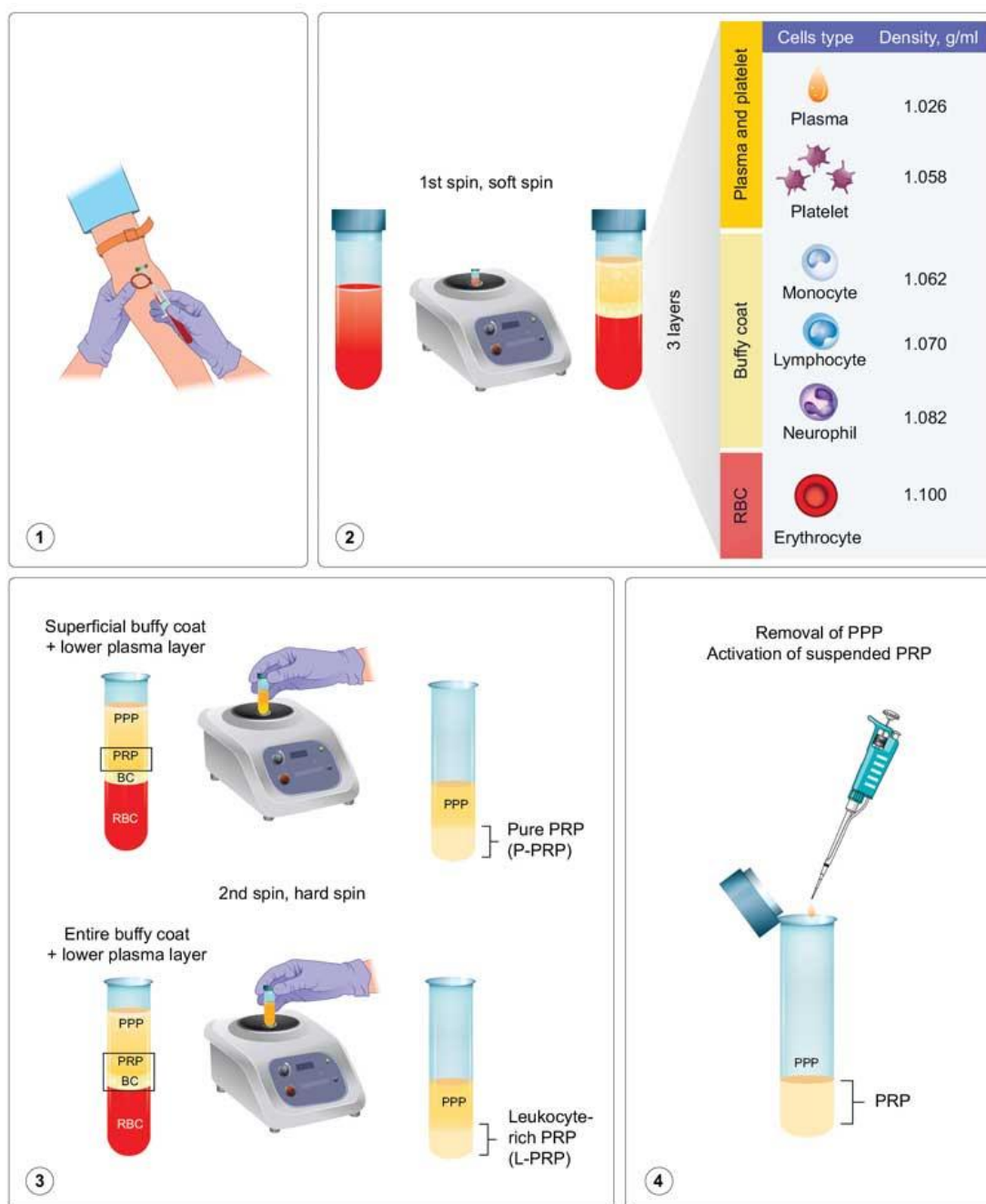


Figura 6 – Esquema do processo de obtenção do plasma-rico em plaquetas. Figura obtida em <https://jcadonline.com/platelet-rich-plasma-review/>

O primeiro artigo sobre PRP foi publicado em 1954 (SCULLY; NASEEM; MATSAKAS, 2018). Um importante aspecto do uso do PRP no tratamento de lesões é a possibilidade de se fazer o tratamento com o plasma obtido do próprio paciente, desta forma personalizando o tratamento. Embora a técnica padrão-ouro seja o uso de osso autólogo, PRP vem cada vez mais sendo utilizado no tratamento de patologias relacionadas ao tecido ósseo, tais como, osteoartrite, intervenções de substituição de dente, injeções durante artroscopia, dentre outras, devido a sua capacidade em promover angiogênese e proliferação de osteoblastos, condições fundamentais

para a recuperação da lesão (GAVIÑO ORDUÑA et al., 2017; VY et al., 2013; WANG et al., 2017b). Para ossos longos, embora os dados para testes com animais *in vivo* indiquem resultados promissores, testes clínicos ainda não levaram a uma conclusão sobre o uso do PRP no tratamento (GRIFFIN et al., 2012). Griffin et al. afirmou que embora não possa ser descartado um benefício do uso de PRP na cicatrização de ossos longos, ainda são necessários mais ensaios para sustentar o uso desta prática durante a intervenção. O uso de PRP vem sendo associado a diferentes biomateriais na busca por melhores resultados (GRIFFIN et al., 2012).

Hidroxiapatita, quitosana, hidrogeis e diversos polímeros são alguns exemplos de biomateriais que vem sendo associados ao PRP (GAO et al., 2019; MARTINEZ-ZELAYA et al., 2019; WANG et al., 2017b). Estes materiais já vêm inclusive sendo aplicados na modificação de superfícies de biomateriais visando a melhor adesão celular, promovendo assim uma melhor osteointegração (GAVIÑO ORDUÑA et al., 2017; GRIFFIN et al., 2012). Embora algum progresso tenha sido alcançado neste cenário, ainda existe uma lacuna em estudos de caracterização físico-químicas destes compósitos, bem como poucos estudos que explorem mecanismos moleculares da resposta de células submetidas a estes biomateriais e aplicadas para design de biomateriais funcionais, através da bioimpressão de tecidos. Os artigos científicos recentes apontam a bioimpressão em 3D e as aplicações da manufatura aditiva para o desenvolvimento de uma tecnologia híbrida, como uma das mais importantes perspectivas na área da engenharia de tecidos (BILLIET et al., 2012; DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017; FARAMARZI et al., 2018). Por exemplo, a produção de arcabouços poliméricos sólidos tem sido combinada a hidrogéis carregados com células (DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017; SCHUURMAN et al., 2011; SONG et al., 2020); a tecnologia de impressão em 3D tem sido combinada a deposição de esferóides formados a partir de células (DUARTE CAMPOS et al., 2020; KIM et al., 2010; SCHON et al., 2012; UTAMA et al., 2020).

1.9 Justificativa

A busca por biomateriais capazes de modular a resposta celular e estimular a regeneração tecidual é um dos grandes desafios de nosso tempo (HAUGEN et al., 2019). Avanços foram obtidos, porém ainda existem lacunas a serem preenchidas na obtenção de um “biomaterial ideal” para o tecido ósseo (ZADPOOR, 2020). Novas tecnologias vêm sendo incorporadas como bioinformática, inteligência artificial, bioimpressão 3D, *organ on-na-chip*, dentre outros, no desenvolvimento de biomateriais nos últimos anos (LAKHANI, 2016). Nosso grupo vem na última década investigando a resposta celular a biomateriais com um olhar para a transdução de sinais em vias como de adesão, sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a; FERNANDES et al., 2018; ZAMBUZZI et al., 2014). Esse repertório

nos posiciona no centro da discussão sobre a incorporação dessas ferramentas, bem como na proposição de novos materiais (GILBERT TRIPLETT; BUDINSKAYA, 2017).

Neste contexto, entendendo o potencial do PRP como uma fonte autóloga de fatores de crescimento, já amplamente utilizada em diversos procedimentos terapêuticos, propomos o seu uso em biomateriais para regeneração óssea. Devido a curta vida de plaquetas, “fator ativo do PRP”, levantamos a possibilidade da liofilização do PRP para aumentar sua vida útil. O liofilizado então irá compor nosso material proposto, que também conta com a presença de fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita e fosfato tricálcio, numa rede de alginato, compondo assim um hidrogel para entrega de moléculas de interesse ao tecido ósseo.

1.10 Objetivo

Desenvolvimento de um biomaterial associando plasma-rico em plaquetas à hidroxiapatita/fosfato tricálcio capaz de impactar a performance celular e regeneração óssea.

1.10.1 Objetivos específicos

- i. Obter e caracterizar o liofilizado de PRP;
- ii. Investigar mecanismos moleculares da performance celular de células mesenquimais e pré-osteoblastos desafiadas por PRP ou liofilizado;
- iii. Associar o liofilizado de PRP à hidroxiapatita/TCP e caracterizar físico-quimicamente;
- iv. Investigar mecanismos moleculares da performance celular de células pré-osteoblasto e macrófagos desafiadas por meio condicionado pelo compósito desenvolvido.

Capítulo 2

Artigo publicado

*Platelet microparticles load a repertoire of miRNAs
programmed to drive osteogenic phenotype.*

ORIGINAL ARTICLE



Platelet microparticles load a repertoire of miRNAs programmed to drive osteogenic phenotype

Marcel Rodrigues Ferreira | Willian Fernando Zambuzzi

Department of Chemistry and Biochemistry, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, campus Botucatu, São Paulo, Brazil

Correspondence

Professor Willian Fernando Zambuzzi, Department of Chemistry and Biochemistry, São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, campus Botucatu, São Paulo 18618-970, Brazil.
Email: w.zambuzzi@unesp.br

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2014/22689-3, 2018/05731-7, 2019/26854-2

Abstract

Autologous platelet-rich plasma accelerates bone healing by releasing biomolecules during their degranulation process, which are transported by vesicle-like structures called platelet microparticles (PMPs). However, the underlying mechanisms regulating the osteogenic differentiation by PMP-released miRs remain poorly understood and this prompted us to better address this issue. Thus, miRNAseq expression profiles (E-GEOD-76789) were downloaded from ArrayExpress database. GEO2R was performed to evaluate the differential expression, and mirnatap R package was used to find targets for differentially expressed miRNAs. An extend protein-protein (ePPI) network for osteogenic marker proteins was generated using String, and DAVID tools were used to perform gene ontology and KEGG pathway analysis from ePPI and miRNAs targets. Our data show that ePPI network was composed by 232 nodes and 2,175 edges, with a clustering coefficient of 0.546. MCODE was able to identify seven clusters contained in the ePPI network, and the two that presented a score above 10 were used in further analysis. Conversely, 15,944 different targets were found as down-expressed while 5,715 different targets were up-expressed. Among the downregulated 75 miRNAs, 70 have predicted targets present in the ePPI network, while the 21 upregulated miRNAs have 19 predicted targets in the ePPI network. Our study provides a registry of miRNAs that play a central role in regulating osteogenic phenotype, which might have potential therapeutic applications in bone regeneration and bone tissue engineering.

KEYWORDS

bioengineering, bone, miRNA, platelet microparticles, platelets-rich plasma, regeneration

1 | INTRODUCTION

Currently, the process of bone regeneration is a major challenge in patient care. Although bone tissue has excellent self-regeneration capacity, some lesions require surgical interventions to guarantee adequate wound healing.¹ Bone-healing therapies are a multifactorial process aimed at recruiting competent cells to differentiate into osteoblasts, in addition to stimulating them to grow bone tissue.² Although well-orchestrated by osteoblasts, bone regenerating mechanism could be the target of infectious processes as well as those happening within the oral environment during appositional bone growth

surrounding dental implants. Moreover, other infections deserve attention, such as the infection with salmonella that remains a global public health challenge. Infection scenario compromises the capacity and plasticity of cells to drive tissue regeneration, and this challenge must be considered when the global knowledge about tissue regenerating is achieved.

Within the bone regeneration process, osteoblasts have a pivotal role by secreting extracellular matrix and further releasing mineralized vesicle to drive mineralization. Additionally, osteoblasts are highly active cells in the process of bone healing, either by synthesizing the bone matrix or by crosstalking with osteoclasts, resorbing cells,

promoting a fundamental balance of bone growth and resorption, and guaranteeing bone health.^{3–5} Osteoblast originates from mesenchymal stem cells (MSCs), which can also differentiate into adipocytes, fibroblasts, myoblasts, and others.^{6–8} This multipotent aspect of MSCs requires a delicate regulation of the cellular machinery involving osteogenic proteins, such as Runx2, Bmps, Spp1, Bglap, Sp7, and Alpl.^{9–11} These genes are target of a multitude of signaling pathways upon activation of a set of proteins embedded into cell membrane.

Specific for bone, regeneration of tissue presenting original characteristics is a challenge in bioengineering. Physiologically, the injured tissue requires a multitude of mechanisms to guide bone healing, in which platelets contribute. Platelets are anucleated, circulating, discoid-shaped cells classically related to the blood coagulation process.¹² Although lacking nuclei, platelets are able to synthesize proteins through a specialized post-transcriptional and translational repertoire.¹³ Platelets contain at least three different granule types (alpha-granules, delta-granules, and lysosomes¹⁴), each of them being true reservoirs of growth factors, proteins, micro RNAs (miRNAs), cytokines, chemokines, and other biomolecules.¹⁵ The exocytosis of this granular content is seen in various clinical interventions, such as platelet-rich plasma (PRP).¹⁶ The autologous content of PRP is the key point of this practice, making this intervention widely individualized. Different agonists are able to activate platelets promoting the degranulation process, responsible for the release of granules and microparticles (platelet microparticles [PMPs]).^{15,17,18} The PMPs are 0.1–1.0 μm vesicle-like structures (containing phospholipid bilayer), corresponding to about 80% of the circulating microparticles.¹⁵

Through their circulation, PMPs are able to deliver miRNAs to different cell types, such as endothelial, vascular, hepatocyte, tumors, and immune system cells.^{19,20} The miRNAs are short non-coding RNAs with about 22 nucleotides that regulate the post-transcriptional process by miRNA-mRNA binding to double-stranded RNA, initiating the degradation process of the mRNA transcript or the inhibition of protein translation.^{21,22} This fine regulation impacts several biological processes in different signaling pathways and are fundamental in processes, such as stem cell differentiation, immune response, cancer development, and bone remodeling.^{21,23} For a better understanding of the role of miRNAs in these and different biological processes, different methodologies are being used, from high throughput sequencing (miRNA-seq) to several algorithms for predicting targets.²²

In this analysis, we previously selected *in silico* an array of miRNAs of platelet microparticles (E-GEOD-76789) from ArrayExpress, a public repository of massive data from high-throughput functional genomics experiments, and used GEO2R online tool to evaluate differential expression of miRNAs. A protein–protein interaction network of osteogenic biomarker proteins was built using String, and the relations between detected miRNAs and targets were analyzed using different R packages. Moreover, DAVID tools were used to analyze biological process, molecular function, and KEGG pathway. Over the last decade, considerable funding throughout the world enabled massive data to be built about different biological

contexts. However, the capacity of bioanalysis has not accompany this progress, and strategies for *in silico* approaches are needed to better revisit these data. Therefore, this study explores bioinformatic tools to declare that platelets microparticles loads a repertoire of miRNAs programmed to drive osteogenic phenotype, and this knowledge is necessary to better understand the landscape of bone tissue regeneration.

2 | METHODS

2.1 | Array selection and processing

E-GEOD-76789 was chosen from the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress), which is a public and freely available database. Briefly, the authors collected platelets using a protocol approved by the Institutional Review Board. Platelets were isolated after blood centrifugation (1200r for 30 min at 21°C), then the supernatant (platelet rich plasma) was centrifuged at 2000r for 30 min at 21°C, and the pellet containing platelets was resuspended in RPMI-1640 medium (HyClone, Logan, UT, USA). Platelets were counted (Clinical Laboratory, Shanghai First Maternity Hospital, and Children's Hospital, Shanghai) and adjusted to a density of 150×10^6 cells/ml and split into two groups. The first was supplemented with 1.5% ACD (sigma) and stimulated with thrombin (1.0 U/ml; Takeda Austria) for 1 h. The second was cultivated in the empty medium for 48 h for natural apoptosis. This group was considered control. The PMPs were in the supernatant after centrifugation at 4000 r for 10 min at 4°C, then the supernatants were centrifuged at 50,000g for 60 min at 4°C. The pellets containing MPs were resuspended in RPMI-1640 medium and quantified by the BCA method. Total RNA was extracted using the mirVanaTM RNA Isolation Kit (Applied Biosystem p/n AM1556) using the manufacturer's instructions. Then, 0.1 mg of total RNA was dephosphorylated, denatured and then labeled with Cyanine-3-CTP (Cy3) using the Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent) according to the manufacturer's instructions, followed by RNAeasy column purification (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Dye incorporation and cRNA yield were verified with the NanoDrop ND-1000 UV–VIS spec 3.2.1 spectrophotometer. Then, 0.6 μg of Cy3-labeled cRNA (specific activity >10.0 pmol Cy3/ μg cRNA) was fragmented at 60°C for 30 min in a 25 μl reaction volume containing 25 $\times$ Agilent fragmentation buffer and 10 $\times$ Agilent blocking agent following the manufacturer's instructions. Upon completion of the fragmentation reaction, 25 μl of 2 $\times$ GEX HI-RPM hybridization buffer was added to the fragmentation mixture and hybridized with the Microarray V19.0 8 $\times$ 60K Agilent-046065 (Agilent) miRNA for 17 h at 65° in a hybridization oven Agilent rotary. After hybridization, the microarrays were washed 1 min at room temperature with GE 1 wash buffer (Agilent) and 1 min with GE wash buffer at 37°C (Agilent), then dried immediately by brief centrifugation. The slides were scanned immediately after washing on the Agilent DNA Microarray scanner (G2505C) using a color scan

setup for 8×60 k slides (scan area 61×21.6 mm, scan resolution $3 \mu\text{m}$, dye channel set to green and green PMT is set to 100%). The scanned images were analyzed using the Feature Extraction 10.7.1 software. (Agilent), with standard parameters to obtain the intensities of the processed signal subtracted and spatially retained as raw data, which were normalized in the quantile algorithm with Genespring 12.0 (Agilent). The processed data were downloaded. The miRNAs differentially expression was analyzed with GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). The miRNAs with adjusted p -value < 0.01 and $\log_2 |FC| > 1$ were considered upregulated, while miRNAs with adjusted p -value < 0.01 and $\log_2 |FC| < 1$ were considered downregulated (FC: fold change of the group stimulated by thrombin compared to that of natural apoptosis, considered control).

2.2 | Protein-Protein interaction network and cluster analysis

A protein-protein interaction (PPI) network was build using osteogenic marker proteins in String.²⁴ The input proteins were RUNX2, ALPL, BMP2, BMP7, SPP1, TNFRSF11B, BGLAP, SP7, IBSP, TNFSF11, SMAD2, and SMAD3. Table 1 contains proteins names and uniprot accession of osteogenic markers proteins used as input in String. Then, the initial PPI network was expanded to 20 proteins in first shell and 200 in second shell, using active interaction sources as *Textmining*, *Experiments*, and *Databases*, considering minimum required interaction score as 0.900 (highest confidence). The expanded PPI network (ePPI) was analyzed using the Cytoscape²⁵ tool NetworkAnalyzer and MCODE²⁶ was used to screen clusters contained in the network with degree cutoff = 2, node score cutoff = 0.2, k-core = 2, and max. Depth = 100.

TABLE 1 Osteogenic markers protein uniprot accession

	Protein name	Uniprot accession
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	Q13950
ALPL	Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific isozyme	P05186
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	P12643
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	P18075
SPP1	Osteopontin	P10451
TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	O00300
BGLAP	Osteocalcin	P02818
SP7	Transcription factor Sp7 (Osterix)	Q8TDD2
IBSP	Bone sialoprotein 2	P21815
TNFSF11	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (Rankl)	O14788
SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2	Q15796
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3	P84022

2.3 | miRNA predicted targets

The prediction of mRNA targets for differentially regulated miRNA was performed using the R programming environment through the packages miRNet²⁷ and miRNet.db.²⁷ The analysis of miRNet was fulfilled based on the databases PicTar,²⁸ DIANA,²⁹ TargetScan,³⁰ MiRanda,³¹ and miRDB.³² A miRNA-mRNA network was built using the R programming environment through with SNA,³³ Network,^{34,35} and ggnet³⁶ packages.

2.4 | Ontology and pathways analysis of miRNAs targets

The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) was chosen to perform Gene Ontology,^{37,38} and KEGG Pathway analysis³⁹ from targets of up and downregulated miRNAs.

3 | RESULTS

3.1 | Identification of up and down expressed miRNA

In this study, 10 samples were used, five replicates from control group (Natural apoptosis) and 10 others for treated group (Stimulated with thrombin). Using GEO2R, the differentially expressed miRNAs were assessed. From 2006 miRNAs, 21 (1%) miRNAs were considered upregulated and 75 (3%) were considered downregulated (Figure 1).

3.2 | ePPI network of osteogenic marker proteins

String was used to generate and expand a PPI network of osteogenic marker proteins. NetworkAnalyzer, tool from Cytoscape, was used to perform the analysis of the ePPI network. The ePPI network is composed by 232 nodes and 2,175 edges, with a clustering coefficient of 0.546. The degree of connectivity, betweenness centrality, and closeness centrality were also determined (Table 1). MCODE was able to identify seven clusters contained in the ePPI network, and the two with a score above 10 were used for further analysis (Figure 2).

3.3 | miRNA predicted targets

Predicted targets for the differentially expressed miRNAs were obtained using miRNet and miRNet.db packages, searching in five different databases. For the down-expressed miRNAs, 15,944 different targets were found as well as 5,715 different targets for the up-expressed miRNAs. Among the downregulated 75 miRNAs, 70 have predicted targets present in the ePPI network, while the 21 upregulated ones have 19 predicted targets in the ePPI network.

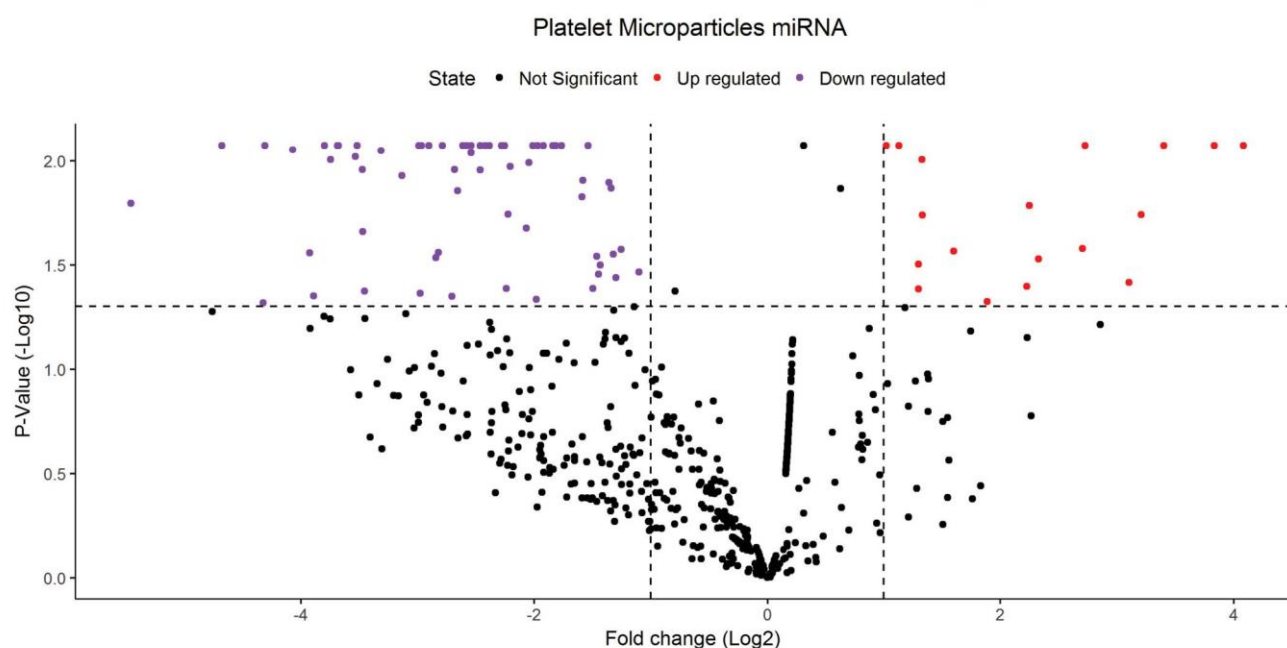


FIGURE 1 Volcano Plot from E-GEOD-76789. Red dots represents miRNAs with $\log_2\text{FoldChange} > 1$ and adjusted p -value < 0.01 (upregulated), purple dots represents miRNAs with $\log_2\text{FoldChange} < -1$ and adjusted p -value < 0.01 (downregulated), and black dots represents miRNAs with no significant expression results

Both Tables 2 and 3 contain the top 10 miRNA (up or down, respectively) with the number of predicted targets and the number of predicted targets contained in the ePPI network. Figure 3 is a network map of miRNA-mRNA interaction of up and downregulated miRNAs.

3.4 | Gene ontology function and KEGG pathway enrichment analysis

For a better understanding of the participation of the miRNAs differentially expressed in biological processes, ontology enrichment analysis (Gene ontology) and signaling pathways (KEGG) using DAVID tools are presented. Tables 4 and 5 contain results of the top 20 ontologies (up and down, respectively) and top 10 pathways (up and down, respectively). DAVID tool was also considered to perform an enrichment analysis of signaling pathways present in the two clusters obtained from the ePPI network (Figure 2c,e).

4 | DISCUSSION

Platelet-rich plasma is commonly used in therapies for bone regeneration,^{16,40} due to high concentrations of PDGF, EGF, VEGF, IGF, and other growth factors.^{41,42} Importantly, VEGF drives the angiogenesis during bone healing while other growth factors concomitantly compromise osteoblast differentiation. To better address the performance of endothelial cells, we subjected these cells to a shear stress model and we demonstrated earlier the involvement of

WNT/b-catenin signaling in modulating ECM remodeling as a possible prerequisite event to drive angiogenesis. The process of platelet apoptosis releasing microparticles loaded with those growth factors and miRNAs has often been reported.^{20,43-45} We applied *in silico* tools to better understand the success of platelets-based therapies in bone, mainly considering the molecular landscape involved with osteoblast differentiation. An ePPI network was built using String based on proteins classically related to the process of osteoblastic differentiation. String is a powerful bioinformatic tool for the construction of interaction networks between proteins, which are very useful in the analysis of biological functions. Table 6 summarizes the results of the ePPI analysis, revealing a core of proteins with important biological roles in this cellular context. Among the proteins listed, TGFbeta is associated with the expression of BMPs that requires SMAD signaling as immediate response upon BMPR activation. Lengerke et al. found a coupling between BMP and WNT upstream from the activation of HOX genes.⁴⁶ Importantly, we demonstrated that HOXA gene cluster is epigenetically modulated during osteoblast differentiation.⁴⁷ Another important point is the possible and concomitant signaling that requires the activation of beta catenin as a mechanism to regulate ECM remodeling in platelet-induced osteoblast differentiation and mineralization.

MCODE identified collections of related proteins (clusters), and we chose to analyze the ones with high score, indicating high reliability of the data. Two clusters were then submitted to enriched pathway analysis (KEGG) using DAVID tools. Cluster 1, containing 19 proteins (TGFB3, TGFB2, LEFTY2, VEGFA, ALB, APP, IGF1, FN1, CLU, PDGFB, TGFB1, TIMP1, SPARC, TIMP3, HGF, THBS1,

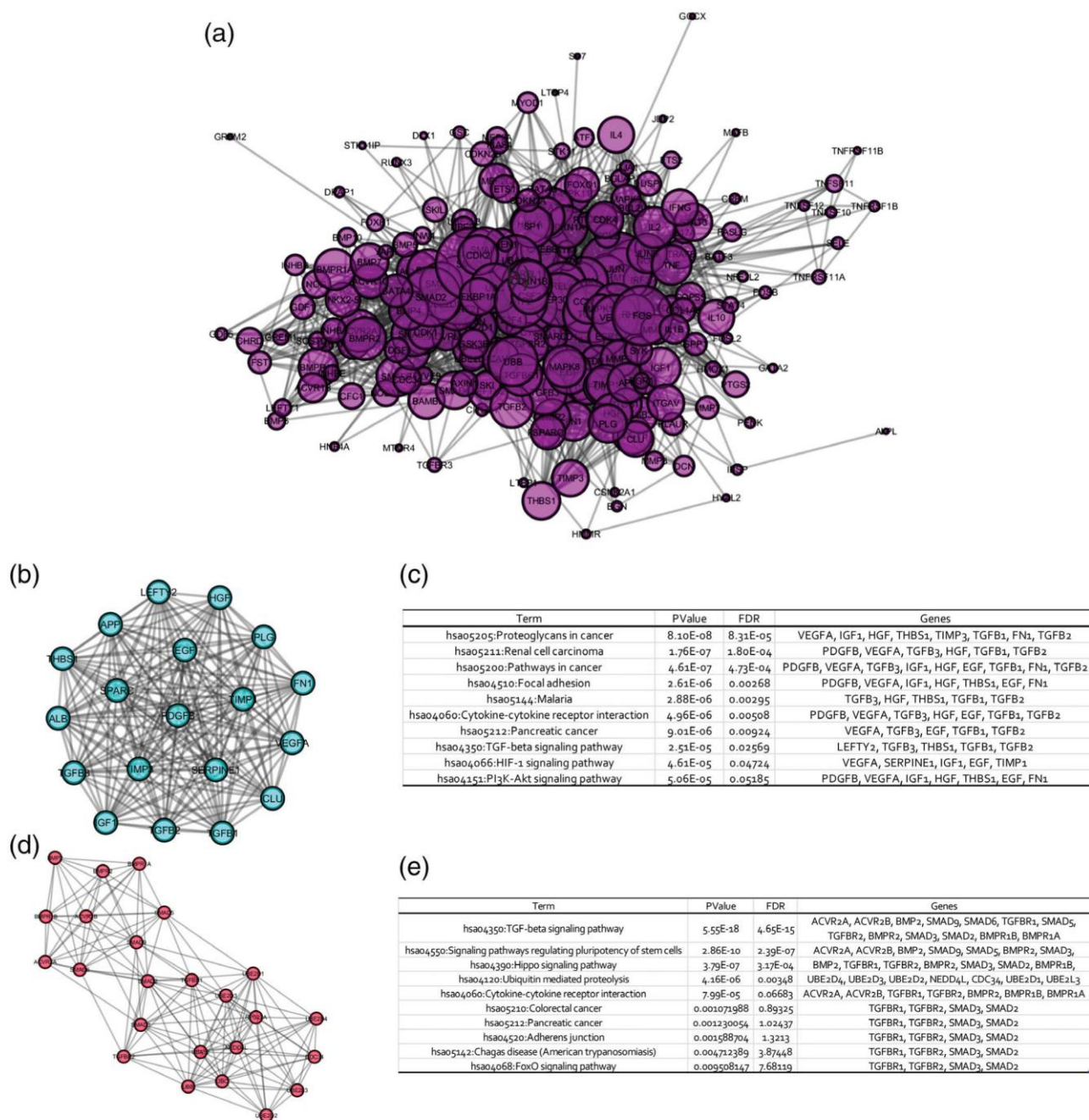


FIGURE 2 Expanded protein–protein interaction (ePPI) of osteogenic markers proteins. (a) Protein–protein interaction of ePPI network, node size was ordered by degree of connectivity. (b) and (d) are clusters 1 (score = 19) and 2 (score = 12.174); (c) and (e) are the enriched pathways of clusters 1 and 2, respectively

SERPINE1, EGF, and PLG) and score = 19, presents enriched pathways involving Focal adhesion, Proteoglycans and Pathways in cancer, Cytokine-cytokine receptor interaction, TGF-beta signaling, HIF-1 signaling, and PI3K-Akt signaling pathway. Here, another point suggests a coupling of angiogenesis and osteogenesis processes during platelets-induced bone growth since HIF1 stimulate the VEGF signaling in governing endothelial cell proliferation and further angiogenesis. In turn, PI3K/AKT signaling guarantees survival signaling with

potential to upregulate the expression of eNOS gene and contribute with angiogenesis dependently to NO signaling. Cluster 2, containing 24 proteins (UBE2D4, BMPR2, ACVR2A, SMAD6, SMAD3, ACVR2B, BMPR1B, UBE2D2, UBE2D1, TGFBR2, BMPR1A, UBE2D3, UBC, RPS27A, UBA52, BMP2, SMAD5, UBB, NEDD4L, UBE2L3, SMAD9, CDC34, SMAD2, and TGFBR1) and score = 12,174, presents enriched pathways involving TGF-beta signaling, Regulating pluripotency of stem cells, Hippo signaling, Cytokine-cytokine receptor interaction,

TABLE 2 Top 10 upexpressed miRNAs

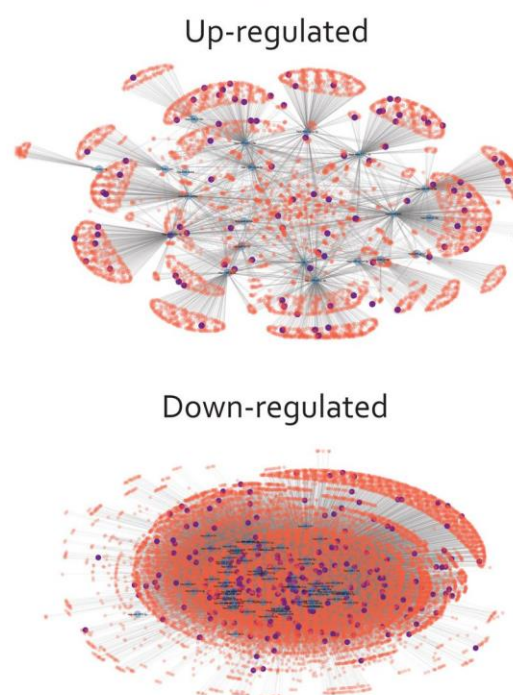
miRNA	miRNA targets	ePPI targets
Hsa-miR-7-5p	14,700	203
Hsa-miR-361-3p	6,800	117
Hsa-miR-361-5p	6,800	117
Hsa-miR-128	4,781	83
Hsa-miR-149-3p	2,168	38
Hsa-miR-195-5p	1,739	35
Hsa-miR-424-5p	1,595	30
Hsa-miR-30e-3p	1,471	28
Hsa-miR-34a-5p	1,447	30
Hsa-miR-181b-5p	1,350	30

TABLE 3 Top 10 downexpressed miRNAs

miRNA	miRNA targets	ePPI targets
Hsa-miR-940	933	17
Hsa-miR-4,665-3p	727	11
Hsa-miR-33b-3p	674	10
Hsa-miR-4,433-3p	672	13
Hsa-miR-3,162-3p	571	15
Hsa-miR-365a-3p	545	11
Hsa-miR-1260a	529	8
Hsa-miR-1,587	517	8
Hsa-miR-6,515-3p	478	6
Hsa-miR-4,286	454	3

Adherens junction, and FoxO signaling. Cluster 1 contains proteins classically reported as growth factors in PRP, such as TGF β s, PDGFB, HGF, IGF1, VEGFA, and EGF. In addition, proteins, such as ALB, CLU, FN1, PLG, which are related to platelet degranulation,^{48–50} are also contained. The TGF- β pathway was highlighted in cluster 2 with receptors of BMP and TGF- β , different SMADs and BMP2 being contained in this cluster. TGF- β pathway is classically related to osteoblastic differentiation.⁵¹ Furthermore, the Hippo signaling pathway, which was observed in this cluster, is particularly related to developmental biology. Widely conserved in different species, the Hippo signaling is well established in osteoblastogenesis.^{52,53}

E-GEOD-76789 contains samples from PMPs derived from apoptosis platelets and from thrombin stimulating platelets, both five replicates. The miRNAs contained in microparticles released during platelets apoptosis occur regularly in platelet biology and were interpreted as control for analyzes in this study. PMPs released due to stimulation with thrombin were considered the treated group. The differentially expressed miRNAs (up or down) were used as input to search for predicted targets, with a special interest in the targets contained in the ePPI network generated for genes related with osteogenic differentiation. The set of differentially expressed miRNAs may impact osteoblastic differentiation, because of the 96 differentially expressed miRNAs, 89 have targets in the ePPI network.

**FIGURE 3** Differentially expressed miRNA-mRNA network map. Map of upregulated and downregulated miRNAs. Blue dots represent miRNAs, red dots represent mRNAs predicted as targets, and purple dots represent mRNA present in expanded protein-protein interaction (ePPI) predicted as targets

Since the function of each miRNA has not yet been elucidated, an analysis of networks and ontologies was performed from the predicted targets of these miRNAs. Gene Ontology analysis indicated that miRNAs targets were involved mostly in regulation of transcription, through RNA polymerase II promoter or DNA binding, when miRNAs were up or down regulated. Ontologies related to the transcription of intracellular signals and phosphorylation by tyrosine or serine/threonine kinase and related to GTPase activity were found in both cases (up or down regulated). Furthermore, the KEGG pathways of downregulated miRNAs targets included cAMP signaling pathway, cGMP-PKG signaling pathway, Rap1 signaling pathway, Protein processing in endoplasmic reticulum, AMPK signaling pathway, Insulin secretion, among others, while up-regulated miRNAs targets were enriched in Pathways in cancer, Proteoglycans in cancer, MAPK signaling pathway, ErbB signaling pathway, Ras signaling pathway, and endocytosis.

A possible explanation for repeated ontologies in the up and downregulated groups is in the target prediction approach for miRNAs used in this work, since the same miRNA may interact with more than one mRNA and the mRNAs predicted as targets were used as input in the DAVID tools and the same mRNAs have been predicted for miRNAs up and downregulated. However, this approach reinforces the importance of these biological events in techniques using platelets as PRP or PPP injection. The obtained KEGG results suggest a regulation of migration, adhesion, proliferation, survival, and energy

TABLE 4 Top 20 up or downregulated ontologies

	Term	Count	Percentage	p value	FDR
Upregulated	GO:0005515 ~ protein binding	6,359	49.6409	9.96E-79	1.83E-75
	GO:0045944 ~ positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	751	5.86261	6.80E-14	1.39E-10
	GO:0035556 ~ intracellular signal transduction	329	2.56831	1.98E-12	4.05E-09
	GO:0006351 ~ transcription, DNA-templated	1,417	11.0617	1.86E-11	3.80E-08
	GO:0003700 ~ transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	722	5.63622	1.40E-10	2.57E-07
	GO:0000122 ~ negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	551	4.30133	2.20E-10	4.50E-07
	GO:0045893 ~ positive regulation of transcription, DNA-templated	404	3.15379	2.75E-10	5.64E-07
	GO:0007399 ~ nervous system development	235	1.8345	2.15E-09	4.41E-06
	GO:0003682 ~ chromatin binding	311	2.42779	2.44E-09	4.48E-06
	GO:0046872 ~ metal ion binding	1,480	11.5535	2.58E-09	4.73E-06
	GO:0008134 ~ transcription factor binding	232	1.81109	4.04E-09	7.43E-06
	GO:0042803 ~ protein homodimerization activity	548	4.27791	3.47E-08	6.38E-05
	GO:0005524 ~ ATP binding	1,078	8.4153	4.17E-08	7.66E-05
	GO:0044212 ~ transcription regulatory region DNA binding	176	1.37393	7.69E-08	1.41E-04
	GO:0007264 ~ small GTPase mediated signal transduction	200	1.56128	1.11E-07	2.27E-04
	GO:0006366 ~ transcription from RNA polymerase II promoter	392	3.06011	1.45E-07	2.96E-04
	GO:0001077 ~ transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding	192	1.49883	1.82E-07	3.34E-04
	GO:0008270 ~ zinc ion binding	849	6.62764	1.98E-07	3.65E-04
	GO:0004674 ~ protein serine/threonine kinase activity	293	2.28728	2.83E-07	5.20E-04
Downregulated	GO:0005515 ~ protein binding	7,667	48.0961	2.46E-99	4.56E-96
	GO:0005524 ~ ATP binding	1,325	8.3119	4.66E-16	8.22E-13
	GO:0035556 ~ intracellular signal transduction	373	2.33988	1.56E-10	3.22E-07
	GO:0008134 ~ transcription factor binding	267	1.67493	1.05E-09	1.95E-06
	GO:0046872 ~ metal ion binding	1776	11.1411	2.42E-09	4.50E-06
	GO:0006468 ~ protein phosphorylation	415	2.60335	6.61E-09	1.36E-05
	GO:0000122 ~ negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	640	4.01481	1.33E-08	2.73E-05
	GO:0006366 ~ transcription from RNA polymerase II promoter	462	2.89819	3.29E-08	6.78E-05
	GO:0042802 ~ identical protein binding	663	4.15909	3.62E-08	6.72E-05
	GO:0045944 ~ positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	859	5.38862	3.92E-08	8.08E-05
	GO:0004672 ~ protein kinase activity	328	2.05759	1.08E-07	2.01E-04
	GO:0045893 ~ positive regulation of transcription, DNA-templated	462	2.89819	1.15E-07	2.36E-04
	GO:0004674 ~ protein serine/threonine kinase activity	342	2.14541	1.94E-07	3.60E-04
	GO:0042803 ~ protein homodimerization activity	643	4.03362	3.46E-07	6.42E-04
	GO:0043547 ~ positive regulation of GTPase activity	503	3.15539	3.50E-07	7.22E-04
	GO:0003682 ~ chromatin binding	354	2.22069	4.09E-07	7.59E-04
	GO:0044212 ~ transcription regulatory region DNA binding	199	1.24835	7.93E-07	0.00147
	GO:0051056 ~ regulation of small GTPase-mediated signal transduction	129	0.80923	9.60E-07	0.00198

TABLE 5 Top 20 up or downregulated ontologies

	Term	Count	Percentage	p-value
Upregulated	hsa05200:Pathways in cancer	315	2.459016	2.19E-13
	hsa05205:Proteoglycans in cancer	170	1.327088	1.88E-11
	hsa05166:HTLV-I infection	205	1.600312	6.60E-09
	hsa04010:MAPK signaling pathway	203	1.584699	1.95E-08
	hsa04012:ErbB signaling pathway	79	0.616706	2.29E-08
	hsa04014:Ras signaling pathway	182	1.420765	2.38E-08
	hsa04144:Endocytosis	204	1.592506	4.89E-08
	hsa05100:Bacterial invasion of epithelial cells	71	0.554254	1.13E-07
	hsa05231:Choline metabolism in cancer	88	0.686963	2.74E-07
	hsa04390:Hippo signaling pathway	125	0.9758	2.97E-07
Downregulated	hsa04024:cAMP signaling pathway	88	1.540077	1.40E-06
	hsa04360:Axon guidance	61	1.067553	3.83E-06
	hsa04261:Adrenergic signaling in cardiomyocytes	66	1.155058	1.80E-05
	hsa04022:cGMP-PKG signaling pathway	73	1.277564	1.94E-05
	hsa04015:Rap1 signaling pathway	87	1.522576	4.42E-05
	hsa04921:Oxytocin signaling pathway	69	1.20756	4.44E-05
	hsa04141:Protein processing in endoplasmic reticulum	72	1.260063	7.79E-05
	hsa04152:AMPK signaling pathway	55	0.962548	1.09E-04
	hsa04520:Adherens junction	36	0.630032	1.37E-04
	hsa04911:Insulin secretion	41	0.717536	1.72E-04

TABLE 6 Top 20 protein on ePPI network (degree of connectivity ranked)

Protein	Degree	Betweenness centrality	Closeness centrality
JUN	95	0.1236976	0.5984456
SMAD4	93	0.12732904	0.60629921
SMAD3	85	0.09181425	0.59079284
FOS	67	0.06401947	0.55662651
SMAD2	67	0.04964846	0.53971963
TGFB1	62	0.06628416	0.55797101
EP300	55	0.02554333	0.53472222
TP53	53	0.031343	0.51333333
ATF2	52	0.058679	0.53846154
UBA52	47	0.01429755	0.51333333
RPS27A	47	0.01429755	0.51333333
MYC	47	0.0186852	0.51677852
UBB	47	0.01429755	0.51333333
UBC	47	0.01429755	0.51333333
MAPK1	46	0.02644022	0.53472222
CREBBP	44	0.01461196	0.51910112
RELA	43	0.01489413	0.49784483
MAPK3	41	0.02283714	0.52860412
MAPK14	41	0.00883738	0.47925311
VEGFA	39	0.01308142	0.48024948

Abbreviation: ePPI, expanded protein-protein interaction.

metabolism through the modulation of signaling pathways, widely needed in bone healing.⁵⁴ These results combined with the cluster analysis of ePPI network suggest the modulation of osteoblastic differentiation by miRNAs delivered by platelet MPs.

In conclusion, the results reported in this study suggest a potential use of platelet microparticles in bone healing, mainly because PRP-derived microparticles are loaded with miRNAs predicted to process osteogenic phenotype. Thus, this might be useful for new therapeutics approach on regenerative medicine, especially in bone.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (# 2014/22689-3; # 2018/05731-7) and CNPq.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no potential conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Marcel Rodrigues Ferreira  <https://orcid.org/0000-0002-3445-0945>
Willian Fernando Zambuzzi  <https://orcid.org/0000-0002-4149-5965>

REFERENCES

- van der Eerden BCJ, Teti A, Zambuzzi WF. Bone, a dynamic and integrating tissue. *Arch Biochem Biophys*. United States. 2014;561:1-2.
- Castro-Silva II, Zambuzzi WF, de Oliveira CL, Granjeiro JM. Periosteal-derived cells for bone bioengineering: a promising candidate. *Clin Oral Implants Res*; Denmark. 2012;23:1238-1242.
- Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol*; Netherlands. 2015;65:20-31.
- Sims NA, Walsh NC. Intercellular cross-talk among bone cells: new factors and pathways. *Curr Osteoporos Rep*; United States. 2012;10:109-117.
- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:292-304.
- Zhou S. From bone to brain: human skeletal stem cell therapy for stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. United Arab Emirates. 2011;11:157-163.
- Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ*. 2016;23:1128-1139.
- Seong JM, Kim B-C, Park J-H, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y-S. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2010;5:62001.
- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;561:64-73. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.011>
- Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007;8:70.
- Carreira ACO, 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*. 2015;99:293-322.
- Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;210:3-22.
- Weyrich AS, Schwartz H, Kraiss LW, Zimmerman GA. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7:241-246.
- Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993;7:52-62.
- Thushara RM, Hemshekhar M, Basappa, Kemparaju K, Rangappa KS, Girish KS. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd. 2015;93(3):149-158. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.002>.
- Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Kluter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31:615-619.
- Boilard E, Duchez AC, Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Curr Opin Hematol*. 2015;22:437-444.
- Burnouf T, Alphonse H, Chou M, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev* [Internet]. Elsevier Ltd. 2014;28:155-166. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.04.002>.
- Lazar S, Goldfinger LE, Ho Tang W, Uchida S, Kim J. Platelet microparticles and miRNA transfer in cancer progression: many targets, modes of action, and effects across cancer stages. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:1-6.
- Xia L, Zeng Z, Tang WH. The role of platelet microparticle associated microRNAs in cellular crosstalk. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 2018;5:29.
- Papadopoulos GL, Alexiou P, Maragkakis M, Reczko M, Hatzigeorgiou AG. DIANA-mirPath: integrating human and mouse microRNAs in pathways. *Bioinformatics*. 2009;25:1991-1993.
- Creighton CJ, Nagaraja AK, Hanash SM, Matzuk MM, Gunaratne PH. A bioinformatics tool for linking gene expression profiling results with public databases of microRNA target predictions. *RNA*. 2008;14:2290-2296.
- Jing D, Hao J, Shen Y, et al. The role of microRNAs in bone remodeling. *Int J Oral Sci*. 2015;7:131-143.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D362-D368.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13:2498-2504.
- Bader GD, Hogue CWV. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*. 2003;4:2.
- Pajak M, Simpson TI. miRNAatp: miRNAatp: microRNA Targets-Aggregated Predictions. 2016.
- Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37:495-500.
- Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D153-D159.
- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;4:1-38.
- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010;11:R90.
- Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D146-D152.
- Butts CT. 2016. sna: Tools for Social Network Analysis [Internet]. Available from: <https://cran.r-project.org/package=sna>

34. Butts Carter T. Network: a package for managing relational data in R. *J Stat Softw* [Internet]. 2008;24:1-36. <http://www.jstatsoft.org/v24/i02/paper>
35. Butts CT. 2015. Network: Classes for Relational Data [Internet]. Available from: <http://cran.r-project.org/package=network>
36. Briatte F. 2015. ggnet: Functions to plot networks with ggplot2 [Internet]. Available from: <https://github.com/briatte/ggnet>
37. Blake JA, Christie KR, Dolan ME, et al. Gene ontology consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D1049-D1056. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gku1179>.
38. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet*. Nature America Inc. 2000;25:25-29. <https://doi.org/10.1038/75556>.
39. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:D353-D361.
40. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, et al. Effects of platelet rich plasma (PRP) on human gingival fibroblast, osteoblast and periodontal ligament cell behaviour. *BMC Oral Health*. 2017;17:1-10.
41. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*. 2016;20:2353-2360.
42. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*. 2017;21:2619-2627.
43. Chen Y, Gao DY, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;81:128-141. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.009>.
44. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:1-60.
45. Michael JV, Wurtzel JGT, Mao GF, et al. Platelet microparticles infiltrating solid tumors transfer miRNAs that suppress tumor growth. *Blood*. 2017;130:567-580.
46. Lengerke C, Schmitt S, Bowman TV, et al. BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the cdx-Hox pathway. *Cell Stem Cell*. 2008;2:72-82.
47. da Silva RA, Fuhler GM, Janmaat VT, et al. HOXA cluster gene expression during osteoblast differentiation involves epigenetic control. *Bone*. 2019;125:74-86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.026>.
48. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2012;103:2096-2104.
49. Spyropoulos AC. *Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: pathophysiology, pharmacology, and therapeutics* [Internet]. Gresele P, Lopez JA, Kleiman NS, Page CP, eds. New York City: Springer; 2003. 1182-1183 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369215376972>
50. Ichinose A, Espling ES, Takamatsu J, et al. Two types of abnormal genes for plasminogen in families with a predisposition for thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:115-119.
51. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016;4:16009.
52. Meng Z, Moroishi T, Guan K. Mechanisms of hippo pathway regulation. *Genes Dev*. 2016;30:1-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26728553>.
53. Yang W, Han W, Qin A, Wang Z, Xu J, Qian Y. The emerging role of hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation. *J Cell Physiol*. 2018;233:4606-4617.
54. Rodriguez-Menocal L, Shareef S, Salgado M, Shabbir A, Van Badiavas E. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:1-11.

How to cite this article: Ferreira MR, Zambuzzi WF. Platelet microparticles load a repertoire of miRNAs programmed to drive osteogenic phenotype. *J Biomed Mater Res*. 2021;109:1502-1511. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37140>

Capítulo 3

Liofilizado de plasma-rico em plaquetas humano:
Obtenção e caracterização.

3.1 Resumo do capítulo

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, faz-se necessário intervenções que visem a diminuição de seu tempo de regeneração assim contribuindo para um aumento na qualidade de vida do paciente. Plasma-rico em plaquetas (PRP) vem sendo utilizado na regeneração tecidual de diferentes órgãos devido ao seu amplo conteúdo de biomoléculas, como fatores de crescimento, hormônios, miRNAs, íons, dentre outros, promovendo assim um tratamento autólogo. Uma vez que plaquetas são extremamente frágeis e com ciclo de vida de poucos dias, a liofilização do PRP vem sendo proposta como um método de aumentar seu tempo de armazenamento. Neste capítulo realizamos o processo de obtenção e liofilização do PRP. Utilizamos técnicas de caracterização físico-química para melhor compreendermos seu conteúdo e avaliamos seu impacto na performance de células pré-osteoblásticas. Nossos resultados demonstram um conteúdo altamente proteico, com presenças de citocinas importantes como IL1 β e TNF α . Os tratamentos com PRP e Liofilizado não apresentaram citotoxicidade e ambos modularam a expressão gênica relativa de diversos biomarcadores de processos biológicos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local protocolo número: 25841919.6.0000.5411. O sangue foi coletado através de punção venosa em tubos a vácuo (3,6 mL) contendo citrato de sódio (3,8 %). Os tubos foram homogeneizados suavemente, através de inversão do tubo, para evitar a lise das plaquetas. Em seguida os tubos foram mantidos em descanso em isopor por 30 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados a $300 \times g$ por 5 minutos, temperatura ambiente, em uma centrífuga IntraSpin (Intralock). Após a centrifugação, foi coletado todo o plasma (incluindo o buffy coat) e transferido para tubos falcons de 15 mL estéreis. Estes foram então centrifugados a $700 \times g$ por 15 minutos a 16°C, em uma centrífuga Universal 320 R (Hettich). Em seguida, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente e na posição vertical por mais um descanso de 40 minutos. Ao final, os $\frac{2}{3}$ superiores da solução foram considerados plasma pobre em plaquetas (PPP) e o $\frac{1}{3}$ inferior plasma rico em plaquetas (PRP). O volume de PRP foi então dividido em duas partes iguais. Uma foi mantida em agitação até a hora do uso e outra aliquoteada em volumes de 1 mL em tubos falcons de 15 mL e congeladas a -80°C por 1 hora. Após esse período, os tubos foram liofilizados em um equipamento L101 (LIOTOP) por 24 h. Após uso, PPP e PRP foram armazenados a -80°C . PRP liofilizado foi armazenado em geladeira.

3.2.2 Cultura de células

Células MC3T3-E1 foram cultivadas em meio de cultura alfa-MEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com soro fetal bovino (10 %), antibiótico e antimicótico, e mantidas em estufa úmida a 37 ° C e 5 % de CO₂. Meio osteoindutor foi produzido suplementado o meio de cultura com 50 µg/ml de fosfato de ácido L-ascórbico, 10 mM de β-glicerofostato e 100 nM de dexametasona.

3.2.3 Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado

Alfa-MEM (10% SFB) foi condicionado com PRP líquido e liofilizado por 24 h em estufa úmida a 37 ° C e 5 % de CO₂. Para o PRP líquido, 1 mL de PRP foi adicionado a 9 mL de meio. Já para o PRP liofilizado, 100 mg foram diluídas em 10 mL de meio. A ativação plaquetária foi realizada com adição de 20 mM de CaCl₂. Após o período de 24 h, foi observado a presença de um gel no meio de cultura em ambos os grupos. O gel foi coletado e armazenado a - 80 ° C. O meio condicionado foi coletado e utilizado nos seguintes experimentos: liberação de proteínas no meio, ELISA, viabilidade celular e expressão gênica relativa. Concentração de proteínas foi determinada utilizando o DC Protein Assay (BioRad).

3.2.4 Viabilidade celular: MTT

A viabilidade do meio condicionado com PRP e liofilizado foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. O meio condicionado (ver **Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado**) foi utilizado em sua concentração inicial e em oito diluições seriadas. Meio de cultura sem tratamento foi utilizado como controle. Células MC3T3-E1 foram semeadas a 5×10^4 células por mL em placas de 96 poços. Após 24 horas as células foram tratadas por adicionais 24 horas, quando o meio foi coletado e outro meio contendo o MTT foi adicionado. Após 4 horas, o meio contendo MTT foi retirado e o formazan formado foi diluído em DMSO, o qual foi medido em microleitor de placas a absorvância de 570 nm (Synergy HTX multi-mode, BioTek, EUA).

3.2.5 Liberação de proteínas pelo liofilizado

PRP liofilizado foi diluído em meio de cultura conforme o item anterior e mantido em estufa úmida a 37 ° C e 5 % de CO₂ por 24h. Após esse período e a formação do gel foi considerado o dia 0. O meio foi coletado nos tempos de 1, 2, 3, 8 e 35 dias e a concentração de proteínas foi determinada utilizando o DC Protein Assay (BioRad). Meio de cultura sem adição de PRP foi considerado controle.

3.2.6 Análise imunoenzimático do tipo ELISA

As concentrações das citocinas pró-inflamatórias, TNF α e IL-1 β no sobrenadante do meio de cultivo celular foram determinados utilizando os kits Human IL-1 beta/IL-1F2 (Ref.: HSLB00D) e Human TNF-alpha Quantikine HS ELISA (Ref.: HS200) (Quantikine® HS ELISA). Para isso o meio de cultivo condicionado por PRP e Liofilizado foi recolhido após 24 horas de condicionamento e armazenado a -80 ° C. Inicialmente foram adicionados 50 μ L de diluente de ensaio RD1-63 por poço, em seguida 100 μ L de cada amostra e da curva padrão foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente, protegidas da luz e agitação constante. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 4X com 400 μ L de tampão de lavagem (Wash Buffer) e então adicionados 200 μ L de conjugado anti IL-1 β e anti TNF α em cada poço e incubou-se por 1 hora em temperatura ambiente no agitador orbital. Após o período de incubação, as placas foram lavadas 4X com 400 μ L de tampão de lavagem (Wash Buffer), incubadas com 200 μ L de Estreptavidina Polímero-HRP (1X) para cada poço, novamente lavadas. Após 30 minutos de incubação com 200 μ L de solução de substrato (Substrate Solution) foram adicionados 50 μ L de solução de parada (Stop Solution) a cada poço a densidade óptica de cada poço foi determinada, usando leitor de microplaca definido para 450 nm com a correção do comprimento de onda de 540 nm.

3.2.7 Expressão gênica relativa: RT-qPCR

Células MC3T3 foram semeadas a 5×10^4 células por mL em placas de 6 poços. Após tratamento, as células foram coletadas, homogeneizadas em TRIzol® e armazenadas em biofreezer a -80 °C. Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs extraídos, realizada com kit SuperScript First Strand. As reações para o estudo do padrão de expressão dos possíveis genes foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (Primers) mostrados na Tabela 1. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimento independentes realizados em triplicatas e como o controle interno o gene GAPDH.

Tabela 3 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste trabalho.

Gene (ID)	Forward	Reverse
Cdk2 (12566)	TACCCAGTACTGCCATCCGA	CGGGTCACCATTTTCAGCAAA
Cdk4 (12567)	TCGATATGAACCCGTGGCTG	TTCTCACTCTGCGTCGCTTT
Cdk6 (12571)	TTCTCACTCTGCGTCGCTTT	CGCCGATCAGCAGTATGAGT
P21 (12575)	CGCCCGATCAGCAGTATGAGT	GCCGGGCTCTGGAACCTTTAT
Bmp2 (12156)	GGTCACAGATAAGGCCATTGC	GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG
Tnfa (21926)	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
Nfkb (18033)	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC
Il1r1 (16177)	ACCCCATATCAGCGGACCG	TTGCTTCCCCCGGAACGTAT
Myd88 (17874)	ATGGTGGTGGTTGTTTCTGACGA	GCAAGGGTTGGTATAGTCGCATAT A
Il6 (16193)	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAAC
Il18 (16173)	ACTTTGGCCCCGACTTCACTGT	GGGTTCACTGGCACTTTTGAT
Il33 (77125)	CCTTCTCGCTGATTTCGAAG	CCGTTACGGATATGGTGGTC
Nrlp3 (216799)	ATTACCCGCCCCGAGAAAGG	TCGCAGCAAAGATCCACACAG
Runx2 (12393)	GGACGAGGCAAGAGTTTCA	TGGTGCAGAGTTCAGGGAG
OPG (18383)	CAGAGACTAATAGATCAAAGGCAGG	ATGAAGTCTCACCTGAGAAGAACC
OTX (170574)	CCCTTCCCTCACTCATTTCC	CAACCGCCTTGGGCTTAT
OPN (20750)	TTTGCTTTTGCTGTTTGGC	CAGTCACTTTCACCGGGAGG
GAPDH (14433)	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
NOS1 (nNOS) (18125)	TACTCCATCAGCTCCTCTCCA	GGATGTCAAATTGTCGCTGTT
NOS2 (iNOS) (18126)	CAGCTGGGCTGTACAAACCT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG

3.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia no infravermelho utilizando um espectrômetro de FTIR, Nicolet Nexus 670 (Thermo, USA), 200 scans com resolução de 4 cm⁻¹ em modo de transmitância e as amostras foram preparadas na forma de pastilhas com 200 mg de KBr contendo 2% de amostra, para a coleta de espectro de infravermelho com o objetivo de identificar os grupos funcionais característicos do material. Bandas foram identificadas utilizando o handbook “Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts” (GEORGE SOCRATES, 2004).

3.2.9 Espectroscopia na região do ultravioleta

PRP liofilizado de quatro doadores distintos foram diluídos na proporção de 10 mg em 1 mL de água ultrapura, em seguida foram pipetados, em triplicata, 2 µL de cada diluição em uma placa Take3 (BioTek) e a leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas Synergy HTX multi-mode (BioTek), varrendo de 200 nm a 400 nm, com resolução de 1 nm.

3.2.10 Análise dos dados

Gráficos e testes estatísticos foram realizados nos programas Graphpad Prism7 e no ambiente R com pacotes base e tidyverse (R CORE TEAM, 2020; WICKHAM et al., 2019). Diferenças significativas entre os grupos estudados foram verificadas empregando-se a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a diferença estatística foi significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre os grupos estudados. Os valores significativos serão considerados para $P < 0,05$. Análise dos dados de FTIR foram realizadas integrando R e Python através do pacote reticulate (USHEY; ALLAIRE; TANG, 2021). Numpy e lmfit foram os pacotes utilizados para a manipulação e cálculos com Python (HARRIS et al., 2020; NEWVILLE, MATTHEW; STENSITZKI, TILL; ALLEN, DANIEL B.; INGARGIOLA, 2014) e o pacote spftir da linguagem R foi utilizado para leitura e manipulação dos espectros infravermelhos (VALENZUELA; RODRIGUEZ-LLAMAZARES, 2016).

3.2.11 Desenho experimental

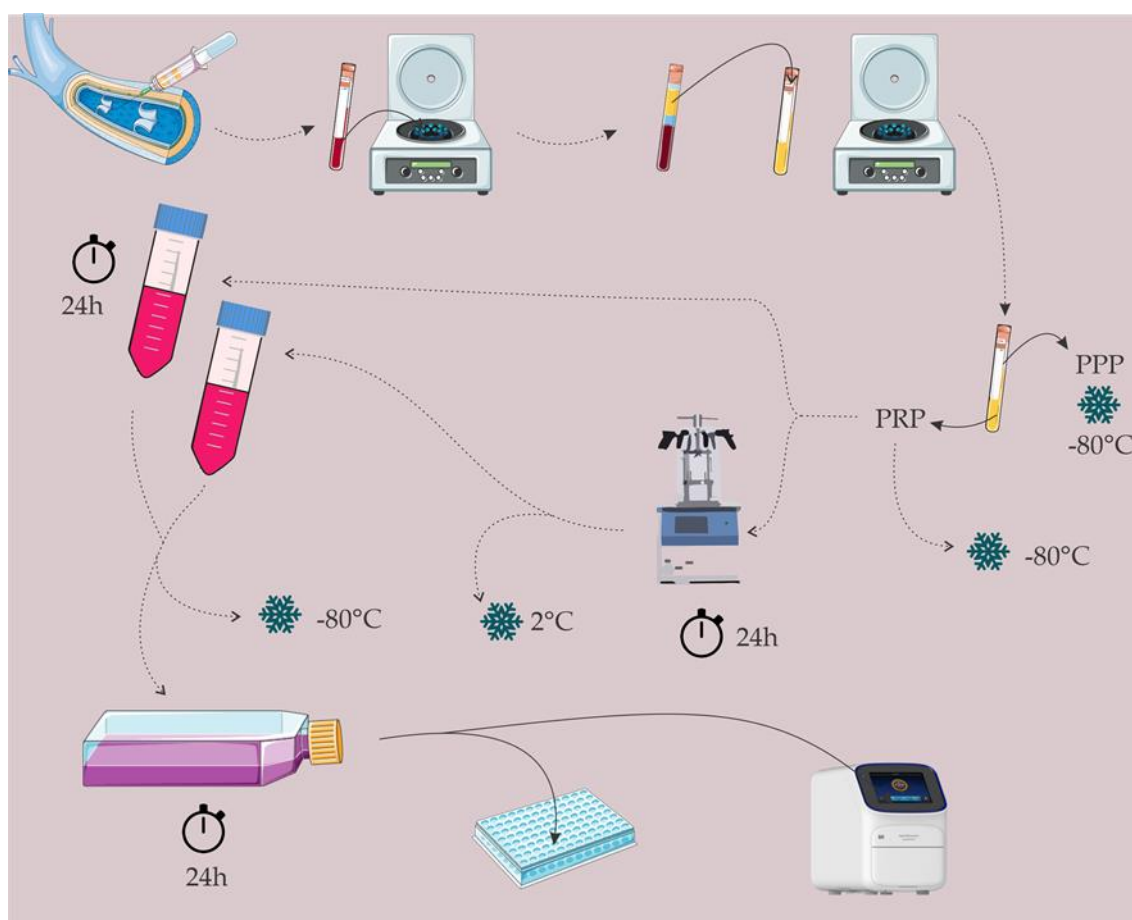


Figura 7 - Desenho experimental do capítulo 3.

3.3 Resultados

3.3.1 Coleta e liofilização de PRP

Foram coletados 16 tubos de 4 doadores com rendimento de aproximadamente 50 mL por doador. Após as duas centrifugações foram obtidos aproximadamente 6 mL de PRP por doador. Foram observados PRP de duas colorações uma mais clara, levemente amarelado, e outra avermelhado. Essas cores são dependentes da qualidade da separação das hemácias após a primeira centrifugação. A **Figura 8** contém alíquotas de PRP obtidos de um doador com a diferentes cores.

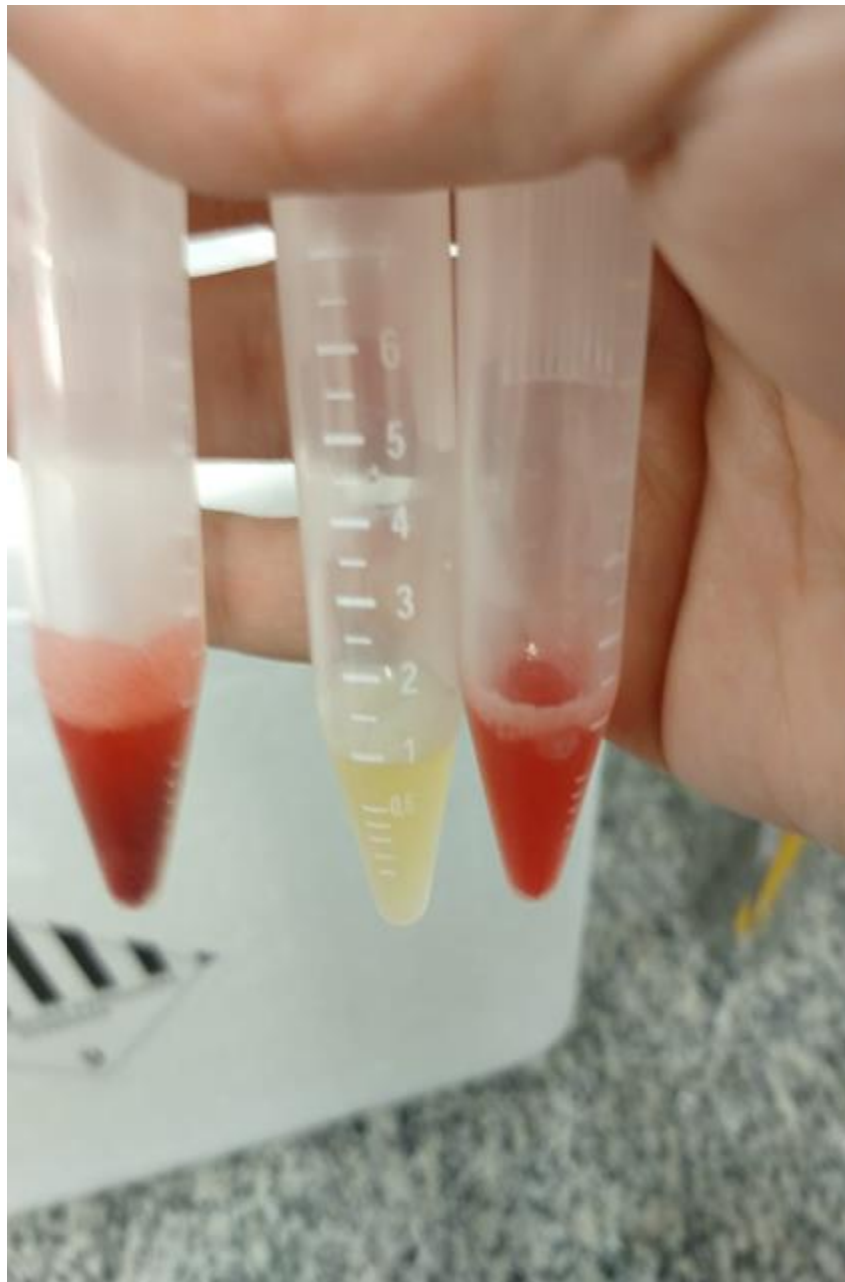


Figura 8 - Alíquotas de PRP do doador 1. A cor das alíquotas é dependente da precisão separação na primeira centrifugação.

Após a coleta do PRP o material foi dividido em duas partes iguais e uma delas foi alíquotada em volumes de 1 mL em tubos falcons de 15 mL e em seguida liofilizada por 24h. Após este período foi obtido um material em pó que mantém a cor do líquido (**Figura 9**). A **Tabela 4** contém os valores de massa para as alíquotas de PRP pesadas. Em média, foram obtidos $200,83 \pm 0,04$ mg de liofilizado por mL de PRP.



Figura 9 - Alíquotas liofilizadas de liofilizado de PRP.

Tabela 4 - Massa de liofilizado para 1 mL de PRP. Alíquotas obtidas dos doares 1, 2, 3 e 4.

Tubo	Doador	Tubo vazio (g)	Tubo + liofilizado (g)	liofilizado (g)
1	1	7.06	7.21	0.15
2	1	7.03	7.17	0.14
3	1	7.07	7.25	0.18
1	2	7.05	7.24	0.19
2	2	7.08	7.29	0.21
3	2	7.04	7.18	0.14
1	3	7.05	7.23	0.18
2	3	7.06	7.28	0.22
3	3	7.06	7.32	0.26
1	4	7.03	7.29	0.26
2	4	7.06	7.28	0.22
3	4	7.06	7.32	0.26

Foi avaliada a liberação de proteínas ao ser diluído em água. Para isso realizamos o seguinte ensaio: foram pesadas massas de liofilizados entre 0 e 40 mg e em seguidas estas foram

diluídas em 1 mL de água ultrapura e mantidos em agitação por 24 horas no interior de geladeira. Após esse período a concentração proteica foi determinada utilizando a técnica de Lowry. A razão da escolha desta amplitude de valores de massa foi devido a curva padrão de BSA ser realizada dentre esses valores (conforme instruções do fabricante).

Ao todo foram utilizados liofilizados de 4 doadores distintos em 7 experimentos distintos e cada experimento foi dividido em 3 amostras. Foi realizada a regressão linear nos utilizando a linguagem R com os pacotes *base* e *tidyverse*. A **Figura 10** contém o gráfico das amostras totais, enquanto a **Figura 11** contém os gráficos coloridos pelos doadores individualmente, e a

Tabela 5 contém os parâmetros de regressão linear.

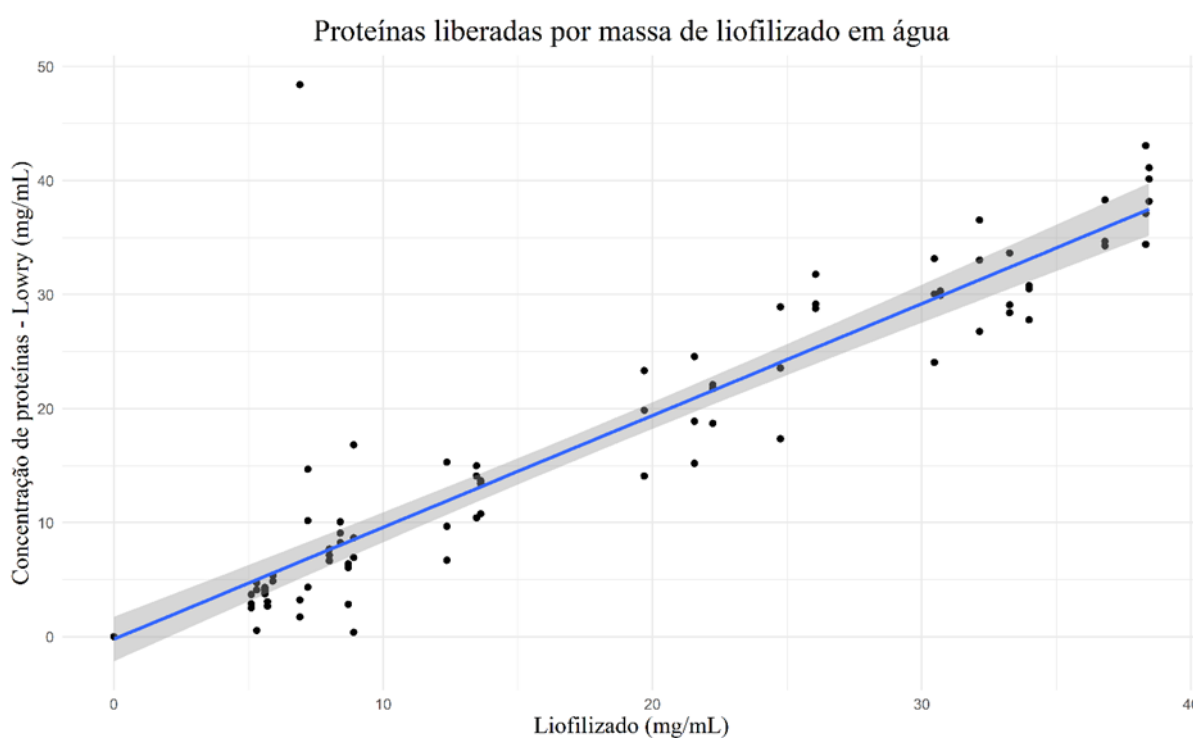


Figura 10 - Liberação de proteínas pelo liofilizado diluído em água.

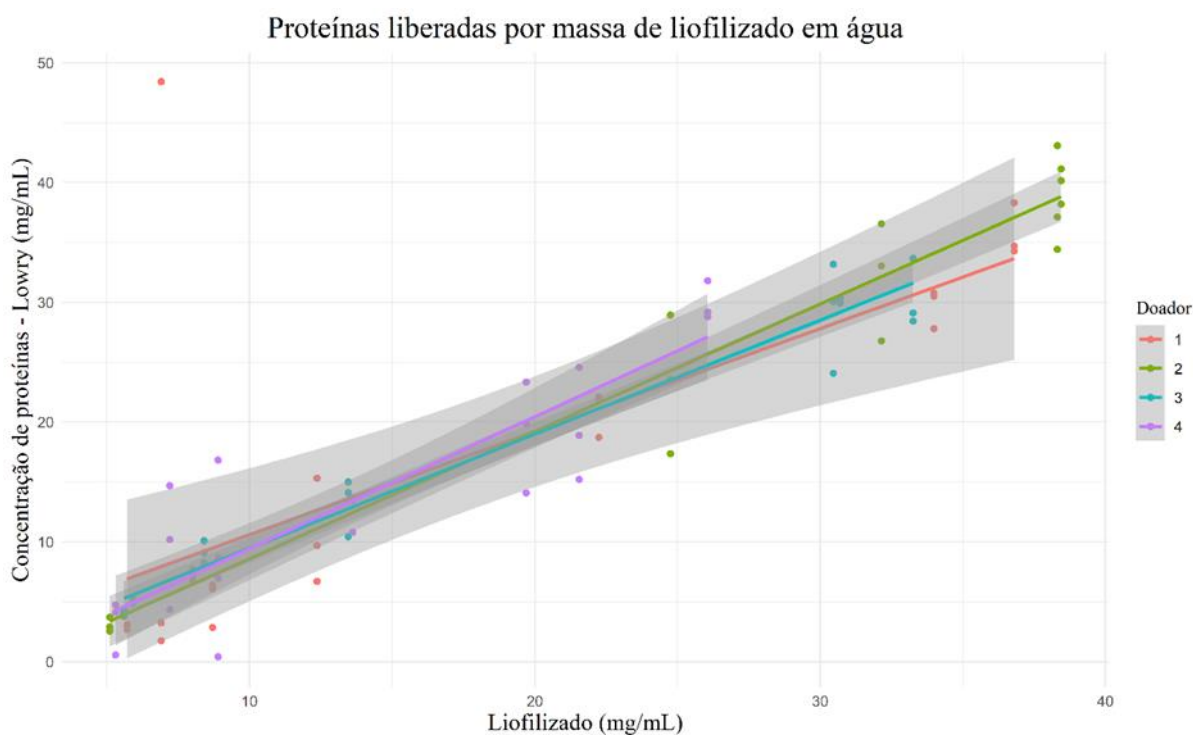


Figura 11 - Liberação de proteínas pelo liofilizado diluído em água, colorido pelos distintos doadores das amostras.

Tabela 5 - Parâmetros da regressão linear considerando cada doador individualmente ou o total.

	<i>Coefficiente angular (A)</i>	<i>Coefficiente linear (B)</i>	<i>R²</i>
<i>Doador 1</i>	0.942	-0.448	0.591
<i>Doador 2</i>	1.06	-2.05	0.965
<i>Doador 3</i>	0.952	-0.0577	0.967
<i>Doador 4</i>	1.13	-2.19	0.801
<i>Total</i>	0.98	-0.828	0.832

3.3.2 Espectroscopias nas regiões do infravermelho médio e ultravioleta

Para a leitura do espectro ultravioleta a massa de 10 mg de liofilizado de quatro doadores distintos foi diluída em 10 mL de água ultrapura. Foi lido o espectro de 200 nm a 400 nm. Foi observada um perfil similar no espectro para todos os doadores (**Figura 12**). Foram tabelados os valores de absorbância nas regiões de 230 nm e 280 nm, relacionados a presença de proteínas na amostra, e 260 nm, relacionado a presença de moléculas de RNA na amostra. A Tabela inserida na Figura 6 contém as razões de absorbância RNA (260 nm) por proteína (230 nm e 280 nm) demonstrando um maior predomínio do conteúdo proteico.

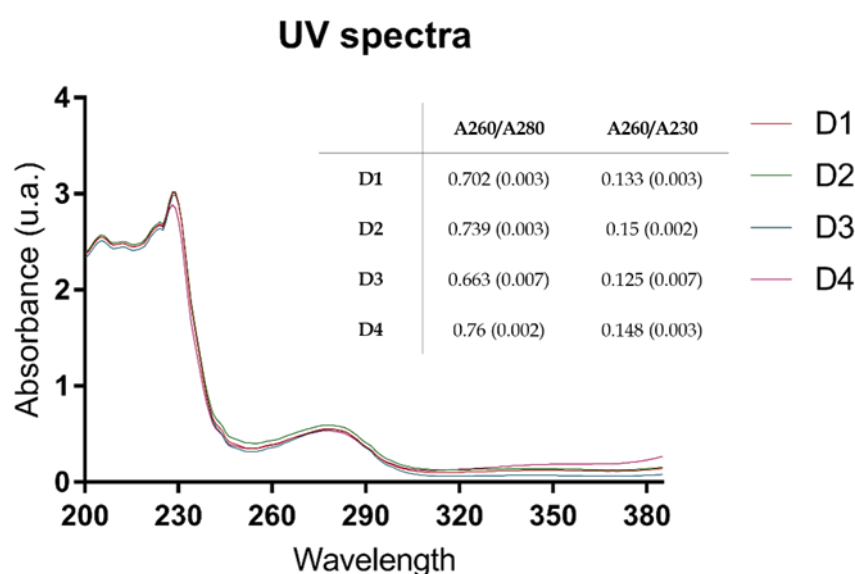


Figura 12 - Espectro ultravioleta dos PRP liofilizados diluídos em água.

Análises de FTIR foram realizadas para observar as características físico-químicas dos liofilizados de PRP obtidos a partir de quatro doadores humanos. A **Figura 13** contém o espectro infravermelho obtido. O perfil físico-químico se manteve similar entre os diferentes doadores. Na região do espectro de 2000 a 800 cm^{-1} foram observadas diversas bandas em comum aos grupos. Estas bandas foram identificadas utilizando R integrado com Python. A função *spsga* foi utilizada para a suavização dos espectros através do método de Savitzky-Golay (polinômio de ordem 2 e janela de 11 pontos), em seguida a função *spmbfp* foi utilizada para a correção da linha de base. A média dos valores de absorbância para os quatro diferentes espectros foi então calculada e em seguida normalizada para valores entre 0 e 1. O espectro foi convertido para um objeto Python onde o pacote *lmfit* foi utilizado para o cálculo do modelo não linear das bandas deconvoluídas utilizando um modelo compostos por funções de Voigt. Foram encontradas 13 diferentes bandas (**Tabela 6**).

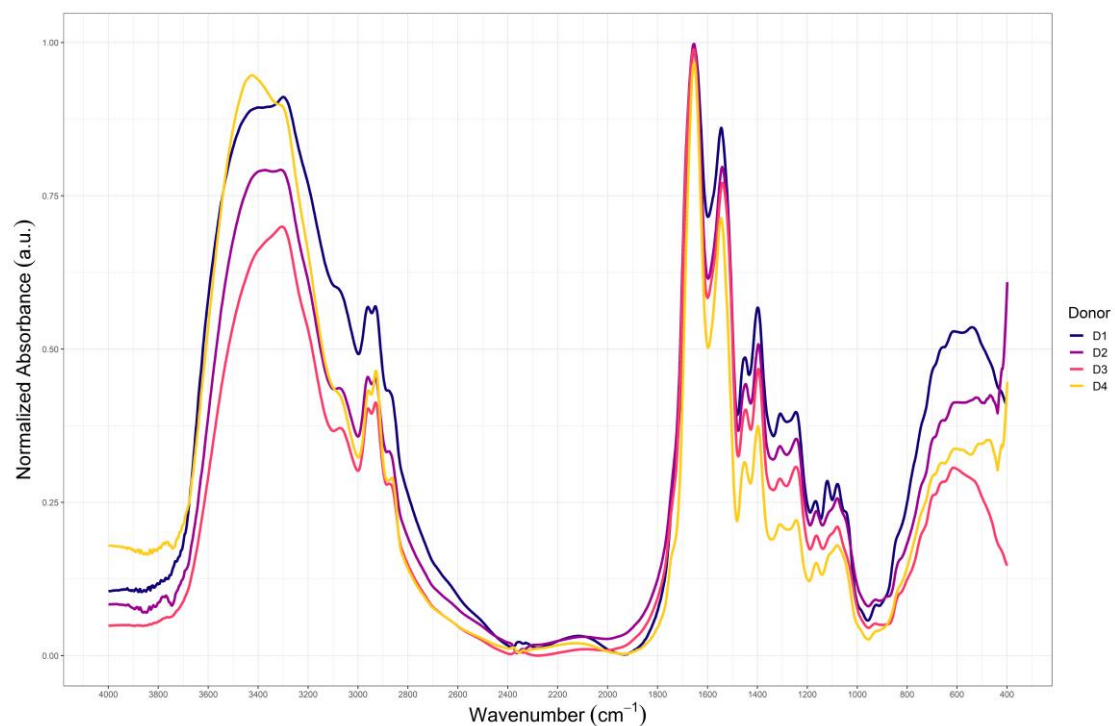


Figura 13 - Espectro infravermelho dos liofilizados dos diferentes doadores. Dados apresentados em absorbância normalizada entre 0 e 1.

Tabela 6– Bandas encontradas utilizando deconvolução.

<i>Banda</i>	<i>Centro (cm⁻¹)</i>	<i>Amplitude</i>	<i>sigma</i>	<i>gamma</i>
v01	1648.697	69.99608	18.69547	15
v02	1542.212	22.5	10.58821	9
v03	1444.927	3.585641	7.976932	7
v04	1396.136	11.40277	9.993366	8
v05	1242.705	14.89119	14.79161	18
v06	1159.425	12.64502	9.00896	30
v07	1073.196	7.936493	15.01546	10
v08	1301.708	9.999983	9.248063	30
v09	1516.347	8.999791	6.997941	5.6
v10	1683.369	20.72228	13.83107	9
v11	1573.928	14.97478	13.36088	11

v12	1035.794	9.629726	18.78754	10
v13	1105.28	9.70628	19.50508	10

A banda centrada em 1648 e 1683 cm^{-1} é relatada como referente a presença da função amidas primárias na amostra (N-H dobra). Já a banda em 1516, 1542, 1573 cm^{-1} se refere a presença de amidas secundárias (N-H dobra). O grupamento ácido carboxílico foi observado na amostra com a presença de uma banda na região de 1444 cm^{-1} (O-H dobra). Bandas relativas a aminas terciárias foram observados em 1242 e 1301 cm^{-1} (Flexão de N-H acoplada ao alongamento CN). Foram identificadas bandas em 1035, 1073 e 1105 cm^{-1} relativos ao grupo PO_4^{3-} . Bandas em 1396 cm^{-1} e em 1159 cm^{-1} também foram encontradas. Fora desta região destacada, há de se ressaltar a presença de uma banda presentes entre todos os liofilizados na região de 3000 a 2800 cm^{-1} , está relacionada a aldeídos (C-H estiramento) e/ou alcanos (H-C-H estiramento assimétrico e simétrico).



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%).

3.3.3 Liberação de proteínas no meio de cultura

Ao começarmos a trabalhar com PRP e Liofilizado em ensaios *in vitro* observamos a formação de um gel nas placas. Ao ser formado, este gel acabava por englobar o tapete celular e assim nas etapas de cultura celular que envolviam aspiração do meio acarretava a aspiração do gel junto ao tapete celular. Essas complicações técnicas fizeram com que tivéssemos um atraso no cronograma para superar essa etapa.

A fim de verificar o potencial uso do PRP e do Liofilizado em ensaios *in vitro*, meio de cultura Alfa-MEM foi condicionado por 24 horas utilizando PRP e Liofilizado. Após esse período foi observado a formação de géis no meio de cultura. A **Figura 15** contém um falcon com meio condicionado com PRP na qual o gel formado foi de característica que o falcon ser invertido o mesmo não foi escoado. A **Figura 16** contém os géis fora do falcon e seu formatado alongado (**Figura 16-a**) se deve ao formato do tubo falcon. Um ponto importante foi que o gel formado pelo Liofilizado (**Figura 16-b**) se mostrou mais frágil que o formado por PRP (**Figura 16-a**).



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 líquido não desce.

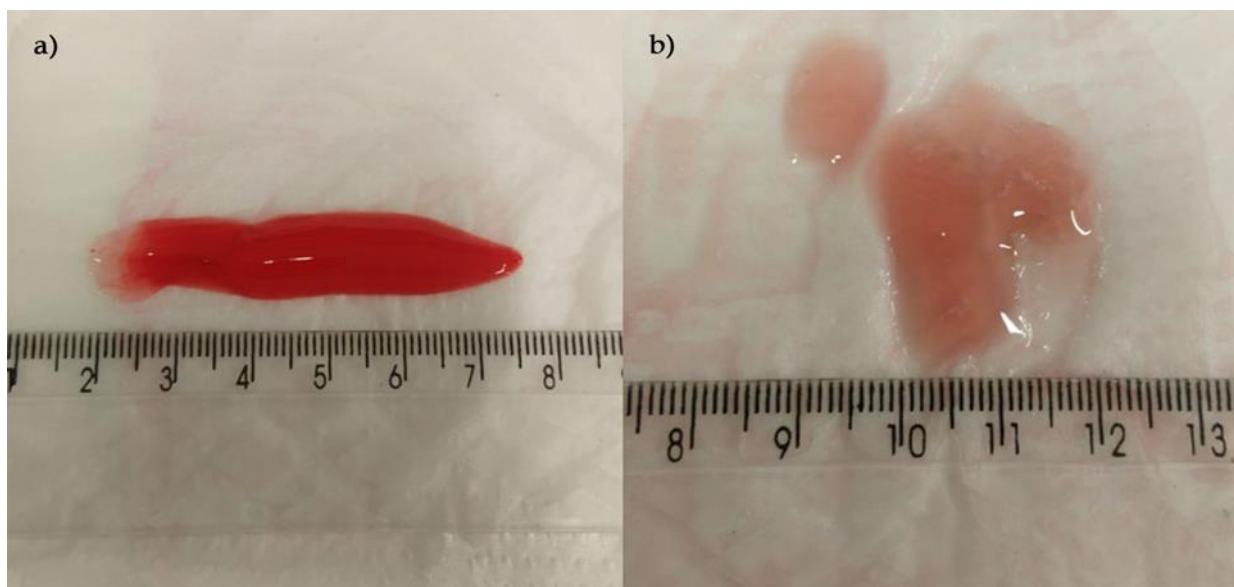


Figura 16 - Géis formados em meio de cultura condicionado por (a) PRP e (b) Liofilizado.

A cinética de liberação de proteínas foi avaliada ao longo de 35 dias. Nos dias, 0 (dia da formação do gel), 1, 2, 3, 8 e 35 foi coletado 1 mL do meio condicionado e a concentração de proteínas foi avaliada. A **Figura 17** mostra que após a formação do gel (Dia 0) a concentração de proteína encontra-se em um platô em aproximadamente 15 mg/mL. A **Tabela 7** contém os valores medidos da concentração de proteínas liberadas no meio de cultura.

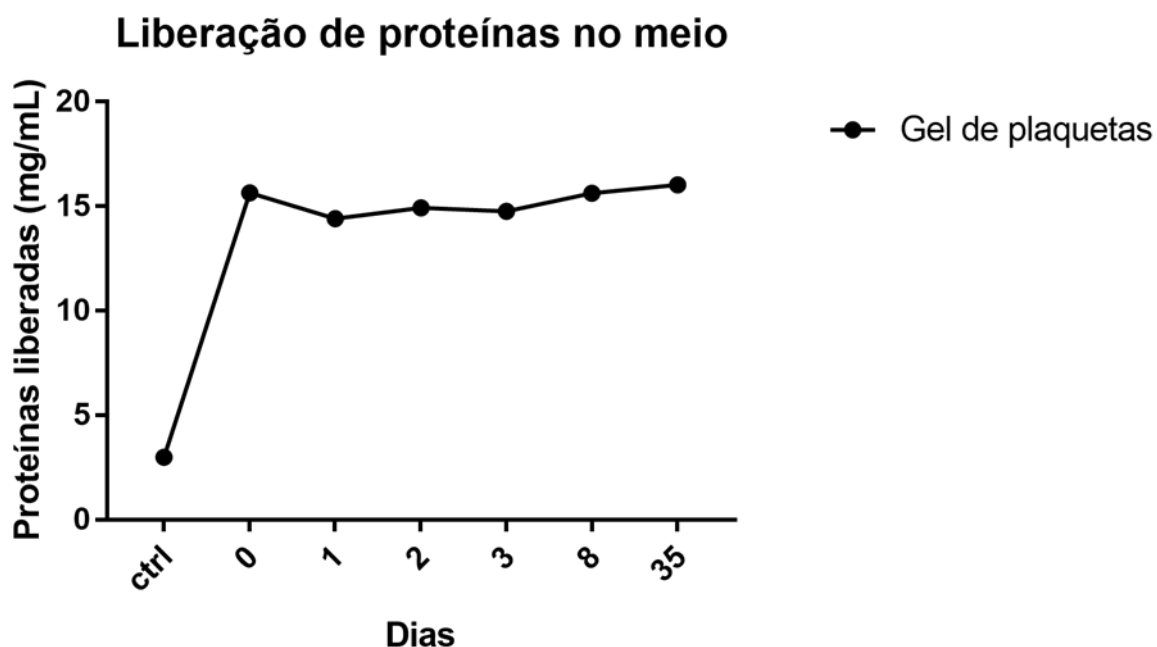


Figura 17- Liberação de proteínas em meios de cultura com 10% PRP ao longo de 35 dias. Note que houve um aumento na concentração de proteínas liberadas no início, a qual se manteve constante nos períodos subsequentes.

Tabela 7 - Concentração de proteínas liberadas no meio de cultura condicionado por PRP.

Grupo	Concentração de proteína no meio (mg/mL)
Ctrl	2.985
Dia 0	15.647
Dia 1	14.403
Dia 2	14.925
Dia 3	14.751
Dia 8	15.622
Dia 35	16.020

Por fim foi realizado o ensaio de ELISA para a concentração das citocinas $Il1\beta$ e $Tnf\alpha$ nos grupos meio condicionado por PRP e Liofilizado, meio alfa-MEM foi utilizado como controle. O grupo Liofilizado apresentou diferenças significativas nas concentrações de $Il1\beta$ e $Tnf\alpha$ quando comparado ao grupo PRP utilizando teste ANOVA ($P = 2,76 \times 10^{-5}$ para $Il1\beta$ e $P = 3,21 \times 10^{-6}$). A concentração de $Il1\beta$ foi de $5,63 \pm 0,32$ pg/mL para o grupo PRP e de $9,23 \pm 1,39$ pg/mL, teste de múltiplas comparações de média retornou um valor de **P-ajustado** = $4,08 \times 10^{-3}$. O grupo PRP apresentou concentração de $39,52 \pm 2,29$ pg/mL para $Tnf\alpha$ enquanto a concentração do grupo Liofilizado verificada foi de $61,78 \pm 6,19$ pg/mL. O teste de múltiplas comparações de média retornou um valor de **P-ajustado** = $9,16 \times 10^{-4}$. A

Figura 18 traz os gráficos do ensaio de ELISA.

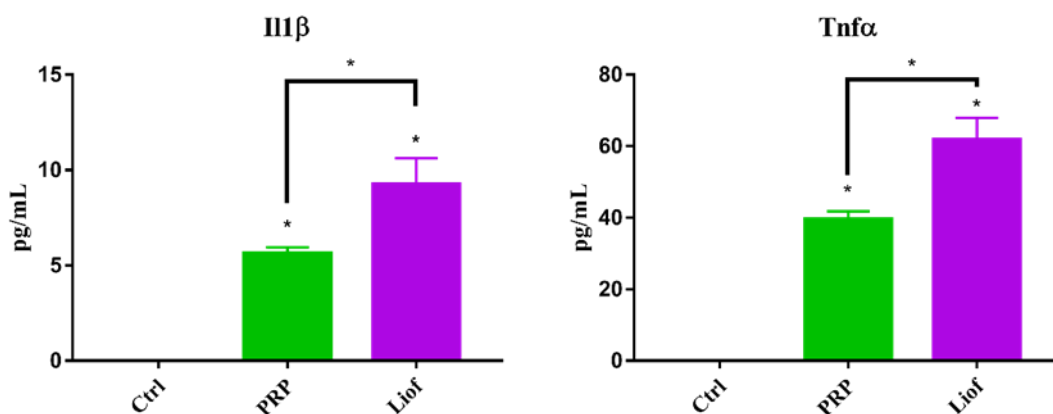


Figura 18 - Ensaio de ELISA para as citocinas Il1 β e Tnf α .

3.3.4 Viabilidade celular

A viabilidade de células pré-osteoblásticas tratadas com PRP e liofilizado foi investigada utilizando o ensaio de MTT, o qual analisa atividade mitocondrial através de desidrogenases. Para isso 1 mL de PRP foi adicionado a 9 mL de meio Alfa-MEM, e condicionado por 24 horas. Após este período foi observado a formação de gel nos grupos. O meio de cultura foi então coletado, sendo esta a concentração C₀. A partir de C₀ foram realizadas 8 diluições seriadas e o meio sem adição de PRP/Liofilizado foi considerado controle. Após 24 horas de tratamento nenhuma concentração reduziu a viabilidade celular. O meio condicionado em C₀ teve sua concentração de proteínas medida utilizando método de Lowry. A concentração de proteínas em C₀ do grupo tratado com PRP foi de 8,69 mg/mL e para o grupo tratado com o Liofilizado foi de 12,51 mg/mL. A **Figura 19** contém gráficos de MTT para C₀ e suas diferentes diluições (A) e para os valores de concentração de proteínas calculados a partir de C₀ (B).

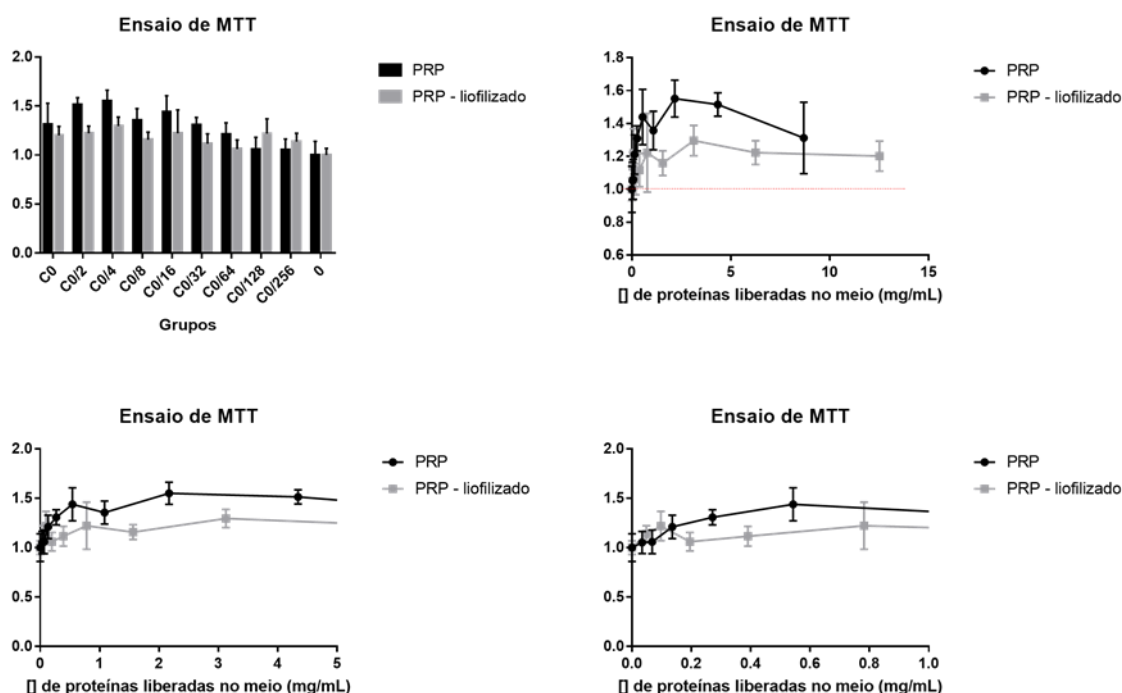


Figura 19- Ensaio de MTT para células MC3T3-E1 submetidas a diferentes concentrações de PRP e Liofilizado.

3.3.5 Expressão gênica relativa

A expressão gênica relativa de diversos biomarcadores foi avaliada para células com o tratamento de PRP e liofilizado, por 24 horas. Tratamento com meio osteogênico (M.O.) também foi avaliado, aqui considerado um controle positivo das culturas. Para avaliar a modulação do ciclo celular frente aos tratamentos foram utilizados quatros biomarcadores: *Quinase dependente de ciclina 2 (Cdk2)*, *Quinase dependente de ciclina 4 (Cdk4)*, *Quinase dependente de ciclina 6 (Cdk6)* e *Inibidor da cinase dependente de ciclina 1 (P21)*. *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh)* foi utilizado com controle endógeno (housekeeping gene).

Resultados demonstram que *Cdk2* não apresentou variação nos grupos tratados. A expressão relativa de *Cdk4* apresentou variações estatísticas para o teste de ANOVA ($P = 7,88 \times 10^{-6}$). Foi observada uma redução da expressão gênica relativa ao compararmos os grupos tratados com o controle e utilizando o teste de Tukey foram observadas diferenças estatísticas (**M.O.:** $P = 3,48 \times 10^{-4}$; **PRP:** $P = 6,92 \times 10^{-6}$; **Liofilizado:** $P = 3,21 \times 10^{-5}$). Os tratamentos influenciaram significativamente a expressão relativa de *Cdk6* ($P = 1,64 \times 10^{-3}$). Novamente os três tratamentos apresentaram redução na expressão relativa e diferenças significativas em comparação ao controle (**M.O.:** $P = 3,48 \times 10^{-4}$; **PRP:** $P = 6,92 \times 10^{-6}$; **Liofilizado:** $P = 3,21 \times 10^{-5}$). A expressão relativa de *P21* foi sensível aos tratamentos ($P = 1,34 \times 10^{-2}$) porém apenas o tratamento com **PRP** apresentou uma redução significativa ao comparado com o grupo controle ($P = 9,78 \times 10^{-3}$). A **Figura 20** contém os gráficos para os biomarcadores de ciclo celular.

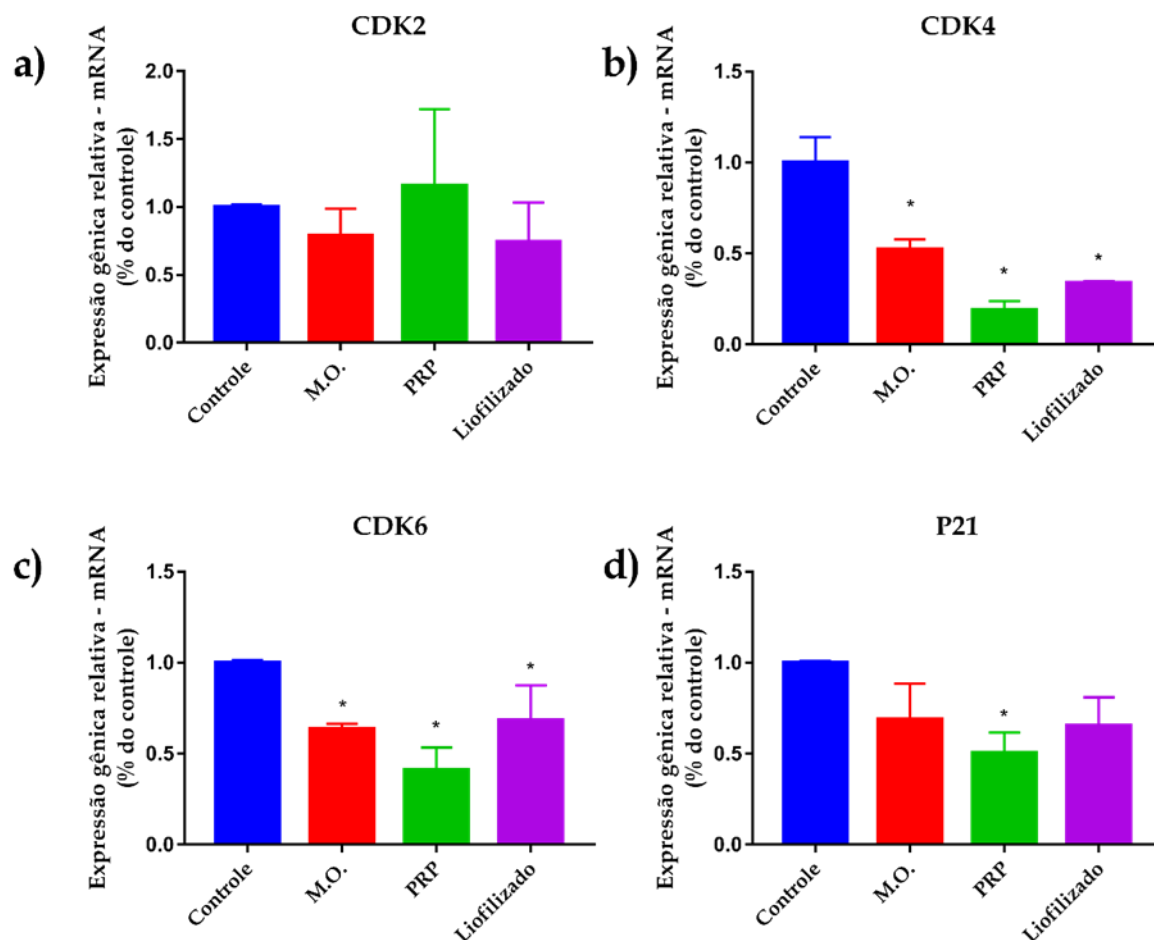


Figura 20 - Expressão gênica relativa para biomarcadores de viabilidade celular.

Para as mesmas condições experimentais foram avaliados biomarcadores relacionados ao processo de diferenciação osteoblástica, o que poderia estar em envolvimento em etapas iniciais de diferenciação. Foram eles: *Proteína morfogenética óssea 2 (Bmp2)*, *Fator de transcrição relacionado a runt 2 (Runx2)*, *Fator de transcrição Sp7* também conhecido por *Osterix (OTX)*, *Osteopontina (OPN)* e *Osteonectina (OTC)*. A expressão gênica relativa de *Bmp2* foi impactada estatisticamente pelos tratamentos ($P = 8,40 \times 10^{-4}$), porém apenas o tratamento com o **Liofilizado** apresentou diferença estatística ($P = 1,30 \times 10^{-3}$). O teste de Tukey detectou também a diferença significativa na expressão gênica relativa quando comparados os tratamentos com **PRP** e **Liofilizado** ($P = 1,78 \times 10^{-3}$).

Para *Runx2* foi observada diferença significativa para a expressão gênica relativa utilizando ANOVA ($P = 1,07 \times 10^{-2}$), porém o teste de Tukey não detectou diferenças entre os tratamentos e o grupo controle (Apenas foram observadas diferenças significativas entre os grupos **PRP** e **Liofilizado** com o grupo **M.O.**). *OTX* não teve sua expressão relativa impactada pelos tratamentos ($P = 7,17 \times 10^{-2}$). ANOVA detectou diferença significativa na expressão relativa

de *OPN*. O grupo tratado com **PRP** apresentou uma redução significativa comparado ao controle ($P = 3,83 \times 10^{-3}$). Por fim, expressão relativa de *OTC* foi modulada pelos tratamentos ($P = 2,47 \times 10^{-2}$), porém nenhum grupo apresentou diferença quando comparado ao controle (Apenas quando comparados os tratamentos **M.O.** e **Liofilizado**). A **Figura 21** contém os gráficos para os marcadores osteogênicos avaliados neste trabalho.

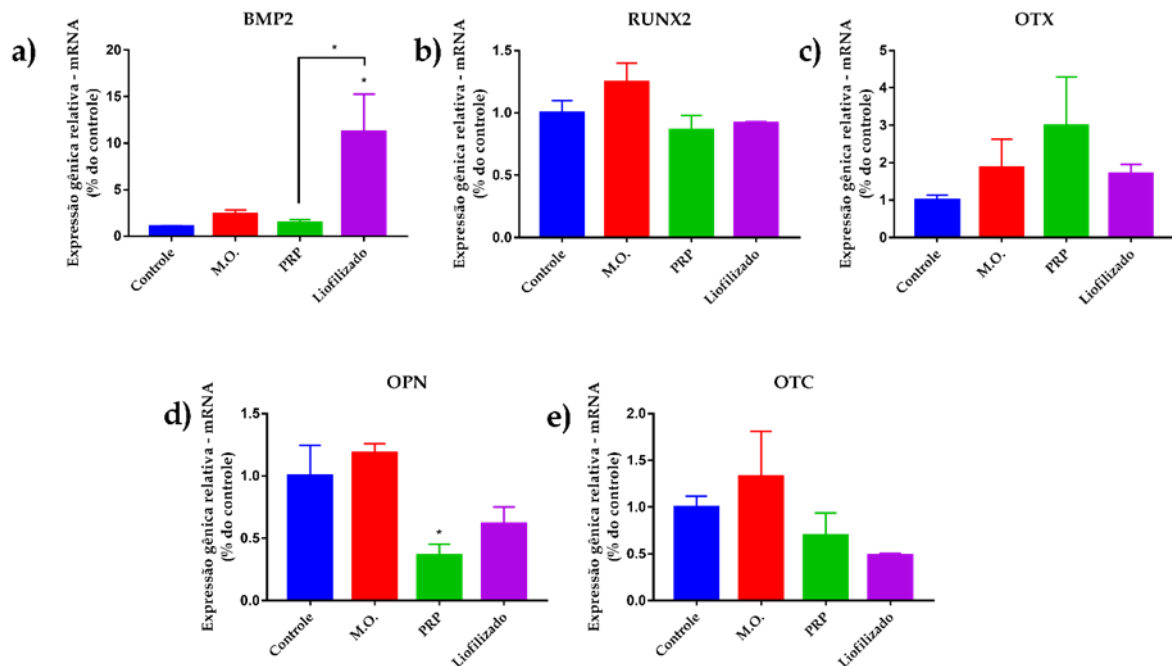


Figura 21 - Expressão gênica relativa para biomarcadores osteogênicos.

O último conjunto de biomarcadores avaliados foi para inflamação. Os biomarcadores avaliados foram: *Receptor de interleucina-1 tipo 1 (Il1r1)*, *Interleucina 6 (Il6)*, *Interleucina 18 (Il18)*, *Interleucina 33 (Il33)*, *Fator de necrose tumoral alfa (Tnfa)*, *Óxido nítrico sintase induzível (iNOS)*, *Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide (MyD88)*, *Fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (Nfkb)*, *Óxido nítrico síntase (nNOS)* e *Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD (Nlrp3)*. A expressão gênica relativa de *Il1r1* foi modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 1,13 \times 10^{-2}$). Apenas o tratamento com **PRP** apresentou diferença significativa comparado ao controle ($P = 7,35 \times 10^{-3}$). *Il6* apresentou sua expressão relativa modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 8,09 \times 10^{-6}$), com os grupos **PRP** e **Liofilizado** apresentando diferenças significativas comparados ao controle (**PRP**: $P = 2,16 \times 10^{-5}$; **Liofilizado**: $P = 9,12 \times 10^{-4}$), e a diferença ao comparar os grupos **PRP** e **Liofilizado** também foi detectada ($P = 9,71 \times 10^{-3}$).

A expressão relativa de *Il18* foi modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 1,77 \times 10^{-6}$), com os grupos **M.O.** e **PRP** apresentando diferenças significativas comparados ao controle

(**M.O.**: $P = 3,72 \times 10^{-4}$; **PRP**: $P = 1,12 \times 10^{-4}$). Os grupos **PRP** e **Liofilizado** apresentaram diferença significativa ao serem comparados ($P = 1,75 \times 10^{-3}$). *Il33* teve sua expressão modulada pelos tratamentos ($P = 1,10 \times 10^{-7}$), com os três tratamentos apresentando diferenças estatísticas (**M.O.**: $P = 6,02 \times 10^{-3}$; **PRP**: $P = 1,88 \times 10^{-6}$; **Liofilizado**: $P = 8,89 \times 10^{-6}$). *Tnf α* não teve sua expressão modulada. A expressão de *iNOS* foi encontrada modulada pelos tratamentos ($P = 1,49 \times 10^{-3}$), porém nenhum tratamento apresentou diferença significativa ao ser comparado ao controle, porém foi detectada diferença significativa entre os grupos **PRP** e **Liofilizado** ($P = 7,85 \times 10^{-3}$).

MyD88 teve sua expressão modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 3,07 \times 10^{-2}$), com o grupo **PRP** apresentando diferença significativa ($P = 3,29 \times 10^{-2}$). A expressão de *Nfkb* foi modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 8,90 \times 10^{-3}$), com os tratamentos com **PRP** e **Liofilizado** apresentando diferenças significativas ao serem comparados com o controle (**PRP**: $P = 6,27 \times 10^{-3}$; **Liofilizado**: $P = 4,51 \times 10^{-2}$). *nNOS* teve sua expressão modulada negativamente pelos tratamentos ($P = 1,39 \times 10^{-2}$). Os tratamentos com **PRP** e **Liofilizado** apresentaram diferenças significativas ao comparados com o grupo controle (**PRP**: $P = 1,55 \times 10^{-2}$; **Liofilizado**: $P = 2,54 \times 10^{-2}$).

Por fim, os tratamentos modularam a expressão de *Nlrp3* negativamente ($P = 3,52 \times 10^{-5}$), com os grupos tratados com **PRP** e **Liofilizado** apresentando diferenças significativas ao serem comparados com o grupo controle (**PRP**: $P = 5,11 \times 10^{-4}$; **Liofilizado**: $P = 2,20 \times 10^{-3}$). A **Figura 22** contém os gráficos dos biomarcadores do processo inflamatório avaliados neste trabalho. De um modo geral, pareceu-nos o **PRP** diminuir respostas inflamatórias em células ósseas.

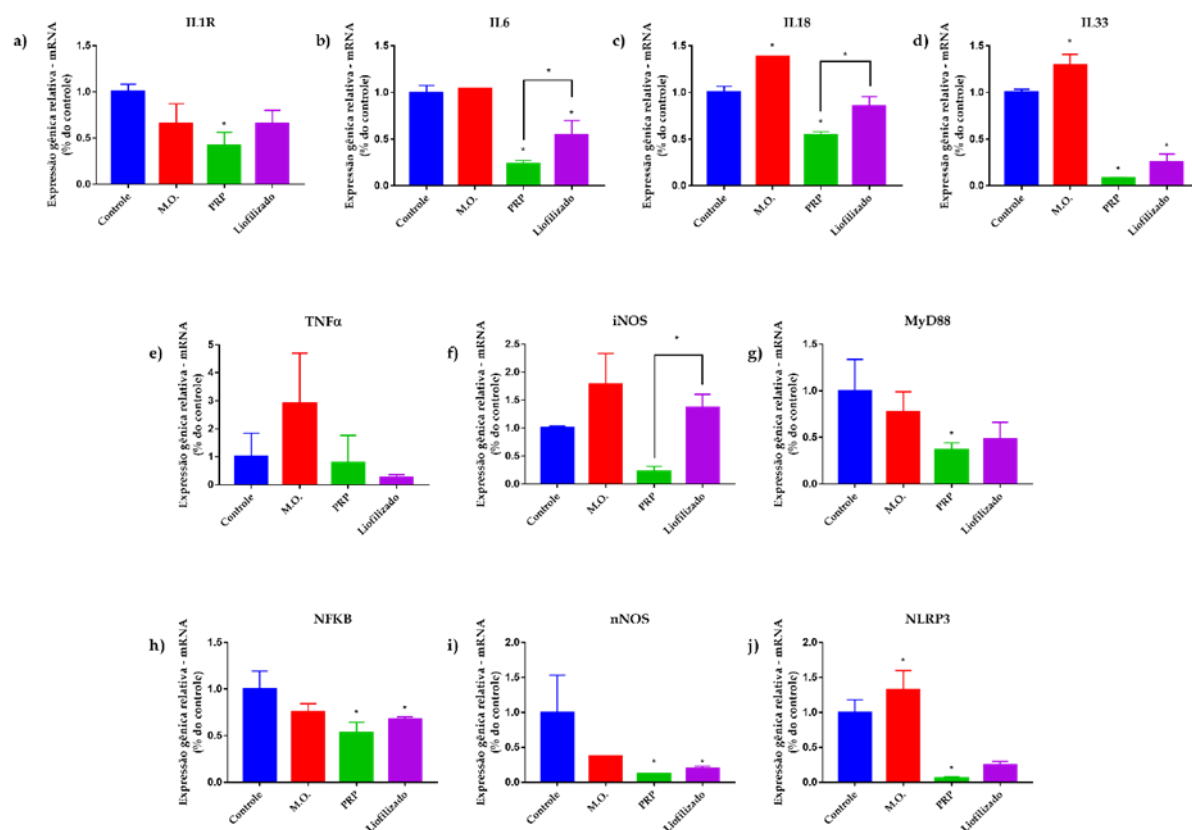


Figura 22 - Expressão gênica relativa para biomarcadores da inflamação.

3.4 Discussão

A regeneração do tecido ósseo é um dos grandes desafios da medicina e odontologia atualmente. Neste cenário, o uso de plasma rico em plaquetas vem atraindo atenção devido ao fato de plaquetas conterem grandes concentrações de fatores de crescimento em seus grânulos internos (XIE et al., 2020a); contudo, não há consenso quanto o seu efeito molecular em diferentes células que compõem o tecido ósseo. Fatores de crescimento impactam diretamente em diversos eventos celulares e moleculares, como o processo inflamatório, este sendo cada vez mais reconhecido como um componente crucial do processo de regeneração óssea (VISHWAKARMA et al., 2016; XIE et al., 2020a). Neste capítulo iniciamos a produção de PRP e seu liofilizado em nosso laboratório, iniciamos sua caracterização físico-química e testamos a resposta celular ao tratamento com estas duas condições.

Historicamente diversos métodos para obtenção de PRP têm sido propostos. Dhurat e Sukesh realizaram uma revisão sobre estes e fatores que impactam na obtenção do PRP (DHURAT; SUKESH, 2014). Basicamente os métodos se baseiam em duas centrifugações com velocidades distintas: a primeira centrifugação tem como objetivo a separação das células do sangue (Células vermelhas, brancas e plaquetas) e a segunda necessária para concentração das

plaquetas. Para nosso trabalho optamos pelo método otimizado pelo grupo do nosso colaborador prof. Dr. José Mauro Granjeiro (AMABLE et al., 2013), na qual a primeira centrifugação é realizada a $300 \times g$ por 5 minutos, as células vermelhas são descartadas, e a segunda centrifugação ocorre a $700 \times g$ por 15 minutos. Este método foi considerado o melhor método de preparo pela revisão de Dhurat e Sukesh (DHURAT; SUKESH, 2014).

É importante ressaltar que após a primeira centrifugação são observadas três fases no sangue: células vermelhas, “*buffy coat*” e plasma. As plaquetas estão, fisicamente, no plasma, porém próximas ao “*buffy coat*”. Por isso é recomendado a coleta do “*buffy coat*” para o melhor rendimento da coleta de plaquetas. Em processos manuais isso pode acarretar transferir uma pequena quantidade de hemácias para a segunda centrifugação. E isto acarreta uma tonalidade avermelhada no PRP. O controle de temperatura é crucial para o preparo. Manter plaquetas em temperaturas entre 12 e 16 °C ajuda a evitar a agregação e ativação plaquetária (AMABLE et al., 2013; DHURAT; SUKESH, 2014).

Foram coletados PRP de quatro doadores e em seguida estes foram separados em duas porções de mesmos volumes e uma delas foi liofilizada por 24 horas. A liofilização é uma etapa que visa otimizar a padronização da produção e utilização de PRP, além de promover um produto capaz de ser armazenado por maiores períodos, uma vez que plaquetas são extremamente frágeis e com ciclo de vida entre 7 e 11 dias (DA SILVA et al., 2018; XIE et al., 2020a). Estudos vem demonstrando inclusive que ao ser reidratado, muitas plaquetas presentes no liofilizado mantem características de plaquetas que não passaram por este processo (XIE et al., 2020a). Os liofilizados tiveram massas similares entre os três tubos de cada doador. Porém com poucos indivíduos coletados não é possível afirmar ser uma tendência. Os liofilizados foram então levados para análise de FTIR para a caracterização físico-química. Os espectros infravermelhos foram similares entre todos os doadores, apresentando grupamentos orgânicos indicando a presença de proteínas no material, como aminas primárias, secundárias e terciárias, além do ácido carboxílico.

Foi observado também a presença da banda em 1075 cm^{-1} indicando a presença de do grupo fosfato no material. Ishii et al. demonstraram em seu trabalho que o pico de fosfato ($1062\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$) está relacionado com a fosforilação de proteínas (ISHII et al., 2004). Este resultado pode indicar que além da presença de proteínas na amostra do liofilizado, estas podem estar fosforiladas.

Em seguida começamos a trabalhar com os efeitos de PRP e de seu liofilizado em cultura de células. Iniciamos os experimentos realizando a diluição do PRP e liofilizado diretamente no meio de cultura utilizado no tratamento, porém nos deparamos com a formação de gel no meio de cultura. Este gel, em alguns experimentos colorimétricos (como no MTT por exemplo), envolvia o tapete celular e nas etapas de aspiração do meio acabava por ser aspirado e levar consigo as

células, assim acarretando a perda do experimento. O processo de formação de géis de PRP é conhecido como um efeito da ativação das plaquetas. Este processo é desejado para diversos protocolos, sendo induzido com aplicação de cálcio e trombina (AMABLE et al., 2013; ESCOBAR et al., 2018; LANG; LOIBL; HERRMANN, 2018). Outros protocolos utilizam diferentes agonistas como epinefrina, ADP e colágeno (DA SILVA et al., 2018). Ao ser ativado o PRP começa a formar uma rede de fibrina dando forma ao um gel mole (DHURAT; SUKESH, 2014; LANG; LOIBL; HERRMANN, 2018). Os meios de cultura utilizados neste trabalho (Alfa-MEM e DMEM) contém 0,2 g/L de CaCl_2 em sua composição. Esta concentração do meio de cultura equivale a cerca 9 % da encontrada no método de ativação por cálcio (20 mM de CaCl_2 equivalem a 2,22 g/L).

O resultado encontrado pela diluição do liofilizado em água demonstra uma linearidade entre a quantidade de massa de liofilizado diluída em água e a concentração proteica ($R^2 = 0,832$). Observando individualmente cada doador a linearidade também foi observada, a não ser para o doador 1 que teve um R^2 baixo. Esse resultado é interessante pois indica que o liofilizado possui uma composição altamente proteica. Importante também notar que esses resultados corroboram com o ensaio de espectroscopia ultravioleta e com os valores de concentração de proteína medidos nos ensaios que tratamos células com liofilizado diluído em meio de cultura. Utilizamos 100 mg para 10 mL de meio, ou seja, 10 mg/mL e foi medida a concentração de 12,51 mg/mL (Ver item **Viabilidade celular**).

Por fim avaliamos processos biológicos importantes como viabilidade, diferenciação osteoblástica e inflamação através da expressão gênica relativa. Para avaliação da viabilidade celular foram analisadas as ciclinas *Cdk2*, *Cdk4* e *Cdk6* além da inibidora de ciclinas *P21*. Ciclinas atuam na regulação de processos biológicos como divisão celular, proliferação celular, apoptose, dentre outros. *Cdk4* e *Cdk6* tiveram sua expressão gênica relativa modulada negativamente pelos tratamentos com PRP e liofilizado. O tratamento com PRP também modulou negativamente *P21*. Classicamente *P21* atua inibindo *Cdk4* e *Cdk6*, de modo a impedir que a célula transite da fase G1 para a fase S do ciclo celular (DA COSTA FERNANDES et al., 2018a; VILGELM et al., 2019). A modulação negativa encontrada tanto na expressão das ciclinas *Cdk4* e *Cdk6* quanto no seu inibidor *P21* sugere uma fina modulação do ciclo celular, que poderia estar preparando a célula para um estágio de diferenciação onde o ciclo sofre um freio para expressar genes envolvidos com o comprometimento do tecido.

O processo osteogênico foi pouco modulado pelos tratamentos em 24 horas. O tratamento com o liofilizado resultou numa alta da expressão relativa de *Bmp2*. *Bmp2* é uma proteína extracelular, membra da família do fator de crescimento transformador beta (*TGF β*), que se liga em receptores extracelulares ativando uma série de vias de sinalização e processos biológicos

como diferenciação celular, migração celular, resposta inflamatória. No tecido ósseo é relacionada com a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, proliferação de osteoblastos e ao processo de mineralização.

A expressão de *Bmp2* apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos (PRP - Liofilizado). *OPN* teve sua expressão relativa modulada negativamente pelo tratamento com PRP. *OPN* é uma proteína constituinte da parte orgânica da matriz óssea atuando em diversos processos patológicos e fisiológicos como remodelação da matriz óssea, calcificação do tecido, apoptose, cicatrização, metástase tumoral, dentre outras (DE FUSCO et al., 2017; SINGH et al., 2018). *OPN* pode agir como citocina pro-inflamatória, ajudando na recuperação do organismo após infecções ou lesões (DE FUSCO et al., 2017). *Runx2*, *OTC* e *OTX* não apresentaram diferenças entre os tratamentos. *Runx2* e *OTX* são fatores de transcrição relacionados ao processo inicial de diferenciação de osteoblástica, Enquanto *OTC* é uma glicoproteína componente da matriz orgânica do tecido ósseo responsável pela ligação de cálcio (matriz inorgânica) as fibras de colágeno do tipo 1 (DA SILVA et al., 2019a; ROSSET; BRADSHAW, 2016; WANG; LIAO; CAO, 2016). A expressão desses genes será novamente verificada em tempos superiores a 24 horas, e mostradas no próximo capítulo. Parece-nos que o PRP liofilizado dispara a via de sinalização envolvida com a expressão de *Bmp2*, que por sua vez poderá atuar de modo autócrino para modular a diferenciação dessas células em osteoblastos maduros e comprometidos com o tecido ósseo.

Por fim biomarcadores do processo inflamatório apresentaram sua expressão modulada. Foram avaliadas as expressões relativas das interleucinas *Il6*, *Il18* e *Il33* além do receptor *Il1r*. Estas interleucinas têm atividade pró-inflamatória e tiveram sua expressão modulada negativamente pelos tratamentos com PRP e liofilizado. Para *Il6* e *Il18* houve diferença significativa entre os tratamentos. O receptor *Il1r* apresentou modulação negativa de sua expressão no grupo tratado com PRP. *Tnfa*, *MyD88*, *Nfkb* e *Nlrp3* participam do complexo inflamassômico e tiveram sua expressão avaliadas (RANJAN; PATHAK, 2016; SHARMA; KANNEGANTI, 2016; WANG et al., 2017a). *Tnfa* não apresentou diferença entre os grupos. O tratamento com PRP diminui a expressão de *MyD88*. E as expressões de *Nfkb* e *Nlrp3* foram moduladas negativamente para ambos os tratamentos. *Nfkb* é um fator de transcrição pleiotrópico que atua em diversos processos biológicos (BAUERNEFEIND et al., 2009; LEMMERS et al., 2007). *Nlrp3* é um componente do inflamassoma respondendo a processos inflamatórios decorrentes de patologias (GREBE; HOSS; LATZ, 2018; KELLEY et al., 2019). Por fim, a expressão de *iNOS* e *nNOS* foram avaliadas, estas são proteínas presentes no citosol responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) (ZHANG, 2017). NO é uma importante molécula mensageira em diversos processos biológicos como angiogênese, vaso dilatação, neurotransmissor, ação bactericida e tumoricida, regeneração de fraturas, dentre outros. *nNOS* teve sua expressão

modulada negativamente em ambos os tratamentos, já *iNOS* não apresentou modulação quando comparada ao controle, porém as respostas aos tratamentos apresentaram diferença significativa.

3.5 Constatações

1. O Liofilizado se mostrou com o mesmo perfil físico-química dentre os diferentes doadores (humano);
2. Ensaio *in vitro* com PRP e Liofilizado requerem a prévia ativação das plaquetas para evitar a formação de gel no tapete celular;
3. Os tratamentos com PRP e Liofilizado não apresentaram citotoxicidade *in vitro*;
4. O liofilizado de PRP tem composição altamente proteica;
5. PRP e Liofilizado modularam a expressão gênica relativa de diversos biomarcadores de processos biológicos;
6. Liofilizado manteve as propriedades do PRP e estimulou a expressão significativa de *Bmp2*.

Capítulo 4

Modelo de diferenciação de células tronco
mesenquimais submetidas ao tratamento com PRP e
Liofilizado em períodos iniciais

4.1 Resumo do capítulo

Plasma-rico em plaquetas (PRP) vem sendo proposto como alternativa no tratamento de lesões ósseas devido ao diverso conteúdo de biomoléculas ativas como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, miRNAs, hormônios e íons. Múltiplos estudos clínicos foram desenvolvidos demonstrando eficácia do tratamento utilizando PRP, porém há uma falta de estudos que demonstrem seu efeito na maquinaria molecular das células durante eventos biológicos de interesse como a diferenciação osteoblástica. Neste trabalho utilizamos meio condicionado com PRP e Liofilizado para tratar células tronco mesenquimais por 24 horas e 7 dias. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo da osteodiferenciação. Após estes períodos foram coletadas amostras para expressão gênica de marcadores de interesse como diferenciação, adesão, ciclo celular e receptores tirosina quinase. Análises de componentes principais (PCA) e de redes de correlação foram feitas a partir dos valores de expressão obtidos. Ao todos foram avaliados 48 genes e através de anova two-way foram obtidos os efeitos do tempo e dos tratamentos para a expressão. A **Figura 23** contém um mapa molecular das vias estudadas. Marcadores de adesão, proliferação e viabilidade foram encontrados modulados pelos tratamentos com PRP e Liofilizado, com destaque para ciclinas, Src, receptores de FGF e PI3K. Já os marcadores da diferenciação RUNX2, SP7 e ALP apresentaram menor expressão que o grupo tratados com meio osteoindutor. Resultados de PCA e da rede de correlação evidenciam uma resposta distintas dos tratamentos com PRP e Liofilizado quando comparados com o meio osteoindutor. Ao todo nossos dados indicam um potencial no aumento da proliferação celular decorrente do efeito de PRP e Liofilizado em células tronco mesenquimas, contudo uma diminuição do potencial osteoindutor destes tratamentos nas mesmas.

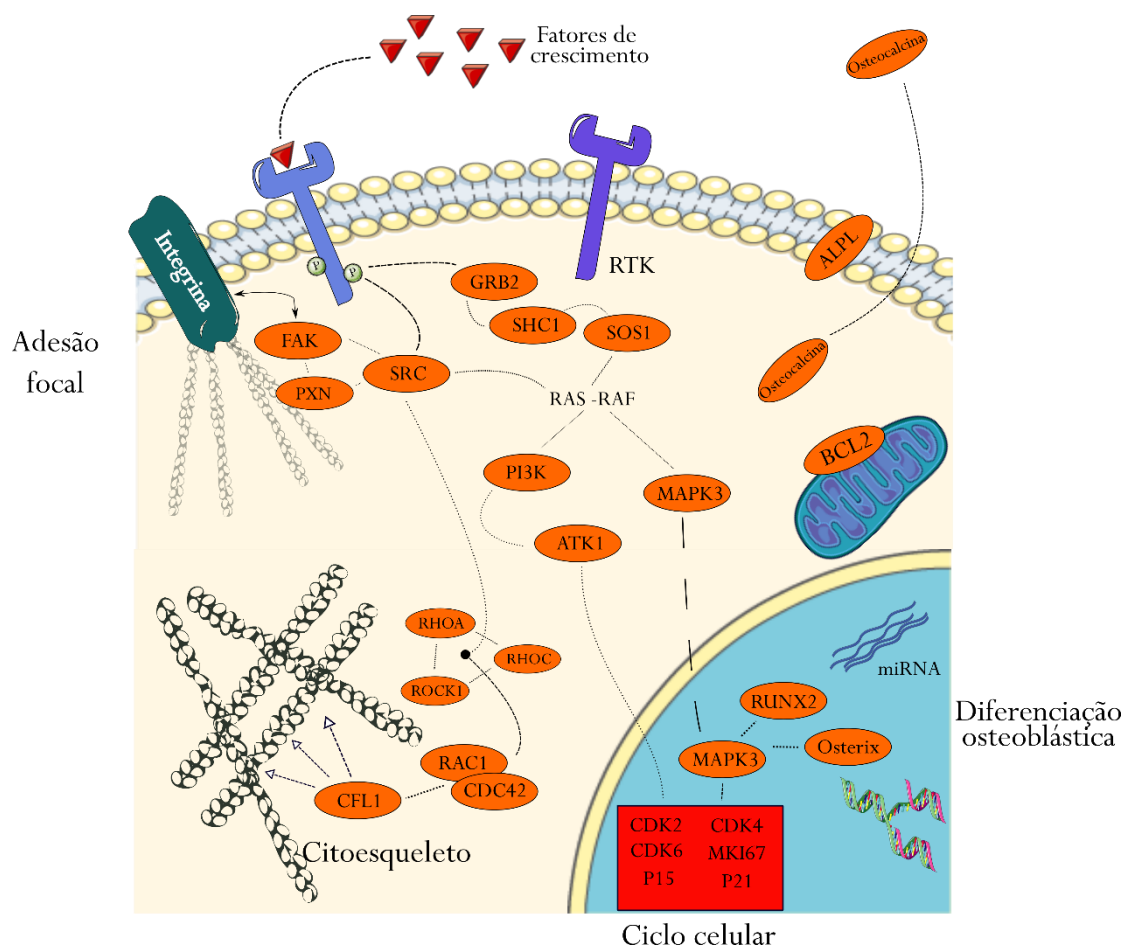


Figura 23 – Mapa dos genes avaliados neste capítulo. Elementos gráficos foram obtidos no site <https://smart.servier.com/>

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado

Ver item 3.2.1 **Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado.**

4.2.2 Cultura de células

As células tronco mesenquimal obtida de polpa de dente decíduo (MS) foram cultivadas em meio de cultura específico, suplementado com soro fetal bovino (10 %), antibiótico e antimicótico, e mantidas em estufa úmida a 37 ° C e 5 % de CO₂. Meio osteoindutor foi produzido suplementado o meio de cultura com 50 µg/ml de fosfato de ácido L-ascórbico, 10 mM de β-glicerofostato e 100 nM de dexametasona.

4.2.3 Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado

Ver item **3.2.3 Condicionamento do meio de cultura com PRP e liofilizado**. A única alteração foi a utilização de meio DMEM (Vitrocell, Campinas), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1 % antibiótico e antimicótico.

4.2.4 Viabilidade celular: MTT

Ver item **3.2.4 Viabilidade celular: MTT**.

4.2.5 Expressão gênica relativa: RT-qPCR

Células MS foram semeadas a 5×10^4 células por mL em placas de 6 poços. Após tratamento, as células foram coletadas, homogeneizadas em TRIzol® e armazenadas em *biofreezer* a -80°C . Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs extraídos, realizada com kit SuperScript First Strand. As reações para o estudo do padrão de expressão dos possíveis genes foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (Primers) mostrados na tabela 1. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimento independentes realizados em duplicata e como os controles internos, os genes GAPDH e β -ACTINA.

Tabela 8 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste capítulos.

Gene	Forward	Reverse
IGF1R (3480)	CAAGCCTGAGCAAGATGATTC	GAAGTTATTGGCGTTGAGGTATG
PDGFR (5159)	CAGCTCTGGCCCTCAAAGG	CCAGAAAAGCCACGTTGGTG
TGFBR2 (7048)	CTCCTGTGCAGCTTCCCTC	CTGCACCGTTGTTGTCAGTG
EGFR1 (1956)	GACAGGCCACCTCGTCG	TGCGTGAGCTTGTACTCGT
HGFR (c-MET) (3082)	CGACAGCTGACTTGCTGAGA	CTGGATGGGAGTCCAGGAGA

ErbB2 (2064)	CATTGGGACCGGAGAAACCA	AGGGGTGGTATTGTTACAGC
ErbB3 (2065)	CATCGTGAGGGACCGAGATG	TGTTGCTCGAGTCCACAGTC
ErbB4 (2066)	GACAGGACTTTGGGTCTGGG	GCAACGTCCACATCCTGAAC
GRB2 (2885)	AATGCTTAGCAAACAGCGGC	TTAGACGTTCCGGTTCACGG
SHC1 (6464)	GAGGTCCAACCAGGCTAAGG	GGGTCCCATGACTTTGTCGT
SOS1 (6654)	CTCCACGGCTGGTACCTGTG	TGTCAGCACACATTGCCACT
BMPR2 (659)	CATATTAGGCGTGTGCCAAAAA	GCTTGTGCTTGCTGTCGTTT
BMPR1B (658)	ATTTGCAGCACAGACGGATATT	GACACTGAAAATCTGAGCCTTCT
VEGFR1 (2321)	CAGGCCCAGTTTCTGCCATT	TTCCAGCTCAGCGTGGTCGTA
VEGFR2 (3791)	CCAGCAAAGCAGGGAGTCTGT	TGTCTGTGTCATCGGAGTGATATCC
FGFR1 (2260)	CTGGGTAGCAACGTGGAGTT	ACCATGCAGGAGATGAGGAA
FGFR2 (2263)	GGAAAAGAACGGCAGTAAAT	GTAGTCTGGGGAAGCTGTAAA
FGFR3 (2261)	GGGCTTCTTCCTGTTCATCC	AGGGACACCTGTCGCTTGA
FGFR4 (2264)	AGATGCTCAAAGACAACGCCT	CGCACTCCACGATCACGTA
IL1R1 (3554)	AATGCACTTCCTAGGCTTTCTG	GGAACAGGATGTGGTGACAA
IL18R (8809)	GACCACAGGATTTAACCATTACAGC	AGCAGGACCTAGTGTTGATGATG
ACTB (60)	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	GCGGCGATATCATCATCC
GADPH (2597)	GACTCATGACCACAGTCCATGC	AGAGGCAGGGATGATGTTCTG
CDK2 (1017)	CTTTGCTGAGATGGTGACTCG	GCCTCCCAGATTCTCATGC
CDK4 (1019)	CTCTCTAGCTTGCGGCCTG	GCAGGGATACATCTCGAGGC

CDK6 (1021)	CTGCAGGGAAAGAAAAGTGCAA	CAAGACTTCGGGTGCTCTGT
AKT1 (207)	CAGCGCGGCCCCGAAGGAC	GACGCTACAGCGCTCCTCTC
PI3K (5290)	ACTCTCAGCAGGCAAAGACC	ATTCAGTTCAATTGCAGAAGGAG
BCL2 (596)	AAGAGCAGACGGCTGGAAAAAGG	GGGCAAAGAAATGCAAGTGAATG
P21 (1026)	GCTGCCGAAGTCAGTTCCTT	ATCTGTCATGCTGGTCTGCC
P15 (1030)	TACAGGAGTCTCCGTTGGC	GTGAGAGTGGCAGGGTCTG
FAK (5747)	CCGGGTTCTCTTTGACTGCT	AACTGATGCCTTCTTCCGGG
SRC (6714)	TGGATGTCAGAGAGGGAGACT	GGCTTGAGGGTTTGTATGGC
CFL1 (1072)	ATACTAAACGGAAGGGGCCG	GTTGCGTCATAGAGGGCGTA
ITGB1 (3688)	GCCGCGCGGAAAAGATGAA	TGCTGTTCTTTGCTACGGT
ERK (4214)	AACAGGCTCTGGCCACCCAT	GCAGCGCCTCCCTTGCTAGA
MKI67 (4288)	AAGCCCTCCAGCTCCTAGTC	TCCCGAAGCACCATTCTTCT
RUNX2 (860)	CCGTCCATCCACTCTACCAC	ATGAAATGCTTGGAAGTGC
BGLAP (632)	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC
SP7 (121340)	CCAGGCAACACTCCTACTCC	GCCTTGCCATACACCTTGC
ALPL (249)	CGGGCACCATGAAGGAAA	GGCCAGACCAAAGATAGAGTT
hsa-miR-7	GTTGGCCTAGTTCTGTGTGGA	GGCAGACTGTGATTTGTTGTCG
hsa-miR-128	GTTGGATTCTGGGGCCGTAG	AAGCAGCTGAAAAAGAGACCG
hsa-miR-361	GAGCTTATCAGAATCTCCAGGG	GAAGCAAATCAGAATCACACCTG
RAC1 (5879)	AGGATATAACCTCCAGGGGCA	GCCGAGCACTCCAGGTATTT

ROCK1 (6093)	GAAGCTCGAGAGAAGGCTGA	TTGTCTGCCTCAAATGCTTG
RHOA (387)	AAGGACCAGTTCAGAGGT	TTCTGGGGTCCACTTTTCTG
RHOC (389)	GAGAGCTGGCCAAGATGAAG	TTGGGGATCTCAGAGAATGG
CDC42 (998)	GCTGGGTGCTAAGAACTCG	CATAAAGCCACTTCCCTCCA
PXN (5829)	AACTGGTTGAAGGGTGTTC	AGGTTCAAGTGGGTTACAGG
RNU6 (26826)	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

4.2.6 Análise de bioinformática

Análise de componentes principais (PCA) foi realizada utilizando os pacotes *base* e *factoextra* do R (KASSAMBARA; MUNDT, 2020). Os genes foram considerados as variáveis e o grupos foram considerados as observações. Correlação entre os valores de expressão gênica relativa foram calculadas utilizando o pacote *corr* do R (KUHN; JACKSON; CIMENTADA, 2020). As análises de rede de correlação foram realizadas com o pacote *igraph* do R e com o programa Cytoscape (SHANNON, 2003). O aplicativo MCODE do Cytoscape foi utilizado para a detecção de cluster na rede (BADER; HOGUE, 2003). O Banco de Dados para Anotação, Visualização e Descoberta Integrada (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) foi escolhido para realizar a análise de ontologias gênicas com *Gene Ontology*, e vias de sinalização com *KEGG Pathways* (BLAKE et al., 2015; KANEHISA et al., 2017).

4.2.7 Análise dos dados

Gráficos e testes estatísticos foram realizados nos programas Graphpad Prism7 e no ambiente R com pacotes *base* e *tidyverse*. Diferenças significativas entre os grupos estudados foram verificadas empregando-se a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a diferença estatística foi significativa, o teste de *Tukey* foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre os grupos estudados. Os valores significativos serão considerados para $P < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Viabilidade celular

No capítulo 3, relatamos a formação de géis referentes a ativação plaquetária para os grupos com maiores concentrações de **PRP** ou **liofilizado** no poço de 96 no momento do

tratamento para o ensaio de MTT. Relembrando nosso experimento, o grupo **PRP** era feito adicionando 1 mL de PRP em 9 mL de meio de cultura, enquanto eram diluídos 100 mg de PRP liofilizado em 10 mL de meio para o grupo **liofilizado**. Devido ao meio de cultura conter CaCl_2 (Em meio DMEM, por exemplo, a concentração de CaCl_2 é de 1,80 mM) observamos a ativação e gelificação sem nenhum aditivo. Em nosso protocolo deixávamos em estufa a 37° e 5 % de CO_2 por 24 para a total ativação das plaquetas. Porém em um de nossos ensaios não foi observada a gelificação por somente o meio de cultura. E ao realizarmos a etapa do tratamento no ensaio de MTT houve formação de géis em poços da placa de 96, prejudicando o ensaio. Para contornar esse problema adicionamos uma etapa de ativação das plaquetas com CaCl_2 20 mM.

Desta forma foram observados géis nos grupos **PRP** e **liofilizado** e o ensaio de MTT prosseguiu normalmente. A concentração inicial (C_0) de proteína foi determinada utilizando ensaio de Lowry. O meio condicionado com **PRP** teve C_0 igual a 10,72 mg/mL e o condicionado com **liofilizado** teve C_0 igual a 13,01 mg/mL. Em seguida foi realizada uma diluição seriada de ambos os grupos, totalizando 9 concentrações distintas, além do grupo controle. A **Figura 24** contém o gráfico da viabilidade celular, em % do controle (células sem tratamento), de células MS submetidas ao tratamento com **PRP** ou **liofilizado** por 24 horas, nela é possível observarmos que não há citotoxicidade em nenhuma das concentrações analisadas.

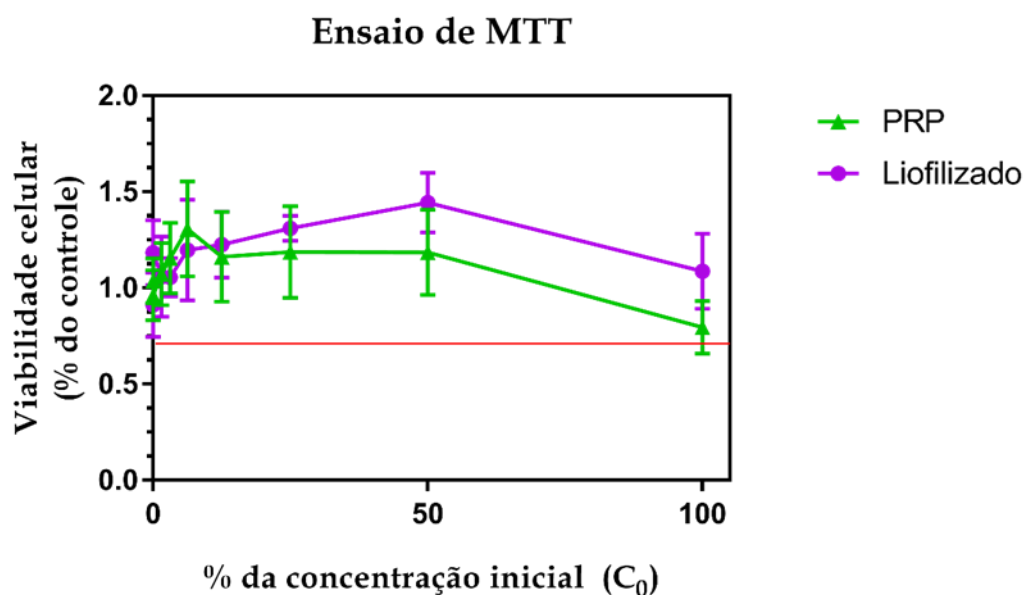


Figura 24 -MTT de células MS submetidas a PRP e Liofilizado.

4.3.2 Expressão gênica relativa de células tronco mesenquimais (MS) submetidas a tratamento com PRP ou seu liofilizado

Foi realizado o RT-qPCR de células MS submetidas ao tratamento com plasma-rico em plaquetas (**PRP**) ou o Liofilizado de PRP (**Liof**). Meio Osteoindutor (**MO**) foi utilizado como um controle positivo do processo de diferenciação osteogênica. Foram avaliados genes referentes a processos biológicos de interesse, como diferenciação osteoblástica (ou osteogênese), viabilidade celular, proliferação celular, adesão celular, receptores do tipo tirosina quinase (ou RTKs) além de miRNA's de interesse no processo. A lista completa de *primers* utilizados se encontra na seção de materiais e métodos. As amostras de RNA foram coletadas em 24 horas e 7 dias, e a análise estatística foi realizada utilizando ANOVA de fatores (Two way), sendo estes tratamento e tempo, e o teste de Tukey foi utilizado para calcular as múltiplas comparações. 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.

O primeiro conjunto de genes avaliados foi focado no processo de diferenciação osteoblástica e utilizou para isso os genes *fosfatase alcalina* (**ALPL**), *osteocalcina* (**BGLAP**), *fator de transcrição relacionada ao fator Runt 2* (**RUNX2**) e *osterix* (**SP7**). Para a expressão de **ALPL** ambos os fatores (**Tempo**: $P = 3,35 \times 10^{-10}$ / **Tratamento**: $P = 7,35 \times 10^{-11}$), bem como sua interação ($P = 5,20 \times 10^{-11}$), foram considerados significativos. **MO** apresentou diferença entre os tempos de 24 h e 7 dias ($P = 4,10 \times 10^{-12}$). Em 7 dias, **MO** apresentou diferença para o grupo controle ($P = 6,30 \times 10^{-12}$) e para os grupos **PRP** ($P = 1,25 \times 10^{-11}$) e **Liof** ($2,26 \times 10^{-11}$).

BGLAP teve sua expressão modulada pelos tratamentos e sua interação (**Tempo**: $P = 2,05 \times 10^{-8}$ / **Tratamento**: $P = 2,12 \times 10^{-8}$ / **Interação**: $P = 3,09 \times 10^{-8}$). A expressão relativa dos grupos **MO** e **PRP** foi aumentada entre os tempos 24 h e 7 dias (**MO**: $P = 2,66 \times 10^{-3}$ / **PRP**: $P = 1,87 \times 10^{-9}$). Em 7 dias, **MO** e **PRP** apresentaram diferenças ao grupo controle (**MO**: $P = 9,11 \times 10^{-3}$ / **PRP**: $P = 3,52 \times 10^{-9}$), a expressão entre **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças ao grupo **MO**, sendo **PRP** aumentada e **Liof** diminuída (**PRP**: $P = 6,24 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 1,21 \times 10^{-3}$), os grupos **PRP** e **Liof** tiveram diferenças entre suas expressões ($P = 1,21 \times 10^{-9}$).

RUNX2 teve sua expressão relativa modulada pelos fatores estudados e sua interação (**Tempo**: $P = 3,14 \times 10^{-11}$ / **Tratamento**: $P = 5 \times 10^{-15}$ / **Interação**: $P = 2,9 \times 10^{-14}$). Em 24 h, grupos **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças significativas com o grupo controle (**PRP**: $P = 1,54 \times 10^{-4}$ / **Liof**: $P = 2,20 \times 10^{-3}$) e o grupo **PRP** apresentou diferenças com o grupo **MO** ($P = 3,31 \times 10^{-2}$).

Entre 24 h e 7 dias o grupo **MO** apresentou um aumento significativo ($P = 2,80 \times 10^{-14}$). Em 7 dias, grupos **MO**, **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças para o grupo controle (**MO**: $P = 3,6 \times 10^{-14}$ / **PRP**: $P = 5,47 \times 10^{-6}$ / **Liof**: $P = 4,41 \times 10^{-4}$). Grupos **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças com o grupo **MO** (**PRP**: $P = 2,60 \times 10^{-14}$ / **Liof**: $P = 2,70 \times 10^{-14}$), mas não entre si.

SP7 teve sua expressão relativa modulada pelo tempo ($P = 7,28 \times 10^{-11}$) e diferentes tratamentos ($P = 2,85 \times 10^{-9}$), bem como sua interação ($P = 2,85 \times 10^{-9}$). No período de 24 h a 7 dias os grupos **MO** ($P = 5,35 \times 10^{-11}$), **PRP** ($P = 4,40 \times 10^{-2}$) e **Liof** ($P = 2,09 \times 10^{-5}$) tiveram sua expressão modulada positivamente. Em 7 dias, grupos **MO** ($P = 1,03 \times 10^{-10}$) e **Liof** ($P = 2,62 \times 10^{-4}$) tiveram diferença significativa comparados ao grupo controle. Os tratamentos com **PRP** ($4,62 \times 10^{-10}$) e **Liof** ($5,95 \times 10^{-8}$), comparados ao grupo **MO**, apresentaram diferença significativa. Também foi observada diferença significativa na compara entre os tratamentos com **PRP** e **Liof** ($P = 6,13 \times 10^{-3}$). A **Figura 25** contém os gráficos dos genes osteogênicos.

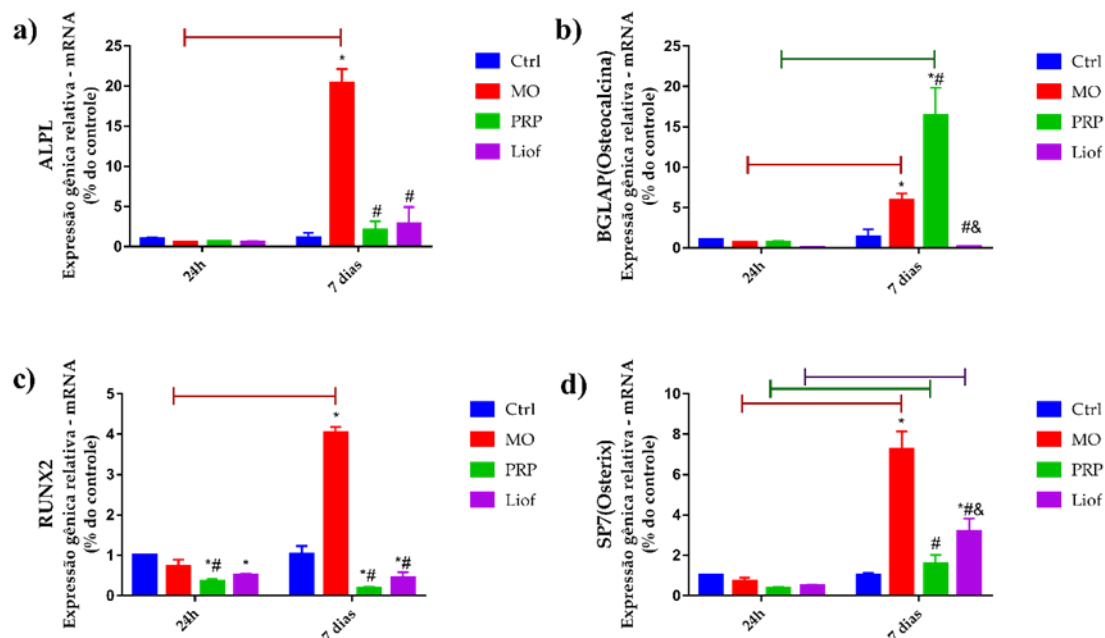


Figura 25 - Expressão gênica relativa de marcadores da osteogênese em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados ALPL (a), BGLAP (b), RUNX2 (c) e SP7 (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplicação 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.

Em seguida foram avaliados um conjunto de genes relacionados a sobrevivência e viabilidade celulares. *AKT Serina/Treonina quinase 1 (AKT1)*, *BCL2 Apoptosis Regulator*

(**BCL2**), *Proteína mitogênica-ativada 3* (**MAPK3**) e *Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa* (**PI3K**), foram os genes avaliados:

AKT1 teve modulação na expressão relativa para os fatores avaliados. (**Tempo:** $P = 6,40 \times 10^{-12}$ / **Tratamento:** $P = 1,94 \times 10^{-11}$ / **Interação:** $P = 2,37 \times 10^{-11}$). Observou-se uma modulação positiva na expressão dos grupos **MO** ($P = 2,98 \times 10^{-3}$), **PRP** ($P = 2,55 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($7,00 \times 10^{-13}$) na comparação dos períodos 24 h e 7 dias. Já em 7 dias, **MO** ($P = 4,42 \times 10^{-3}$), **PRP** ($P = 5,21 \times 10^{-4}$) e **Liof** ($P = 6,00 \times 10^{-13}$) apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. O grupo **Liof** apresentou diferenças quando comparado aos grupos **MO** ($P = 1,38 \times 10^{-11}$) e **PRP** ($P = 2,90 \times 10^{-11}$).

A expressão de **BCL2** não apresentou modulação pelo fator tempo, porém para o fator tratamento e a interação entre os fatores foi observada diferença (**Tratamento:** $P = 2,03 \times 10^{-5}$ / **Interação:** $P = 1,47 \times 10^{-4}$). Em 24 h, os grupos **PRP** e **Liof** apresentaram modulação positiva com os grupos controle (**PRP:** $P = 1,72 \times 10^{-2}$ / **Liof:** $P = 3,16 \times 10^{-4}$) e **MO** (**PRP:** $P = 1,54 \times 10^{-3}$ / **Liof:** $P = 3,56 \times 10^{-5}$). Na comparação entre os períodos de 24 h e 7 dias, apenas o grupo **Liof** teve modulação em sua expressão ($P = 2,07 \times 10^{-3}$), nesse caso negativa. Já em 7 dias, foi observada diferença entre os grupos **MO** e controle ($P = 1,05 \times 10^{-2}$).

Ambos os fatores, bem como sua interação, modularam a expressão relativa de **MAPK3** (**Tempo:** $P = 7,10 \times 10^{-8}$ / **Tratamento:** $P = 8,68 \times 10^{-8}$ / **Interação:** $P = 5,05 \times 10^{-8}$). Na comparação entre os períodos de 24 h e 7 dias, as expressões dos grupos **MO** ($P = 3,20 \times 10^{-9}$) e **PRP** ($P = 3,87 \times 10^{-2}$) foram encontradas positivamente reguladas. Em 7 dias, **MO** apresentou diferença quando comparado ao controle ($P = 1,84 \times 10^{-8}$). Já os tratamentos com **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças com o grupo **MO** (**PRP:** $P = 1,95 \times 10^{-7}$ / **Liof:** $P = 3,40 \times 10^{-9}$), e entre si ($P = 4,55 \times 10^{-2}$).

Por fim, a expressão de **PI3K** foi modulada pelos fatores e sua interação (**Tempo:** $P = 2,21 \times 10^{-11}$ / **Tratamento:** $P = 2,14 \times 10^{-8}$ / **Interação:** $P = 1,61 \times 10^{-8}$). Ao comparar os períodos de 24 h e 7 dias, todos os grupos tratados tiveram sua expressão modulada positivamente (**MO:** $P = 4,49 \times 10^{-5}$ / **PRP:** $P = 1,89 \times 10^{-10}$ / **Liof:** $P = 5,49 \times 10^{-6}$). Em 7 dias todos os tratamentos apresentaram diferença significativa com o grupo controle (**MO:** $P = 4,75 \times 10^{-5}$ / **PRP:** $P = 1,61 \times 10^{-10}$ / **Liof:** $P = 9,39 \times 10^{-6}$), **PRP** teve um aumento na expressão ao comparar com **MO** ($P = 4,03 \times 10^{-7}$) e foi observada uma diferença entre **PRP** e **Liof** ($P = 1,61 \times 10^{-6}$). A **Figura 26** contém os gráficos dos genes avaliados para o processo de viabilidade celular.

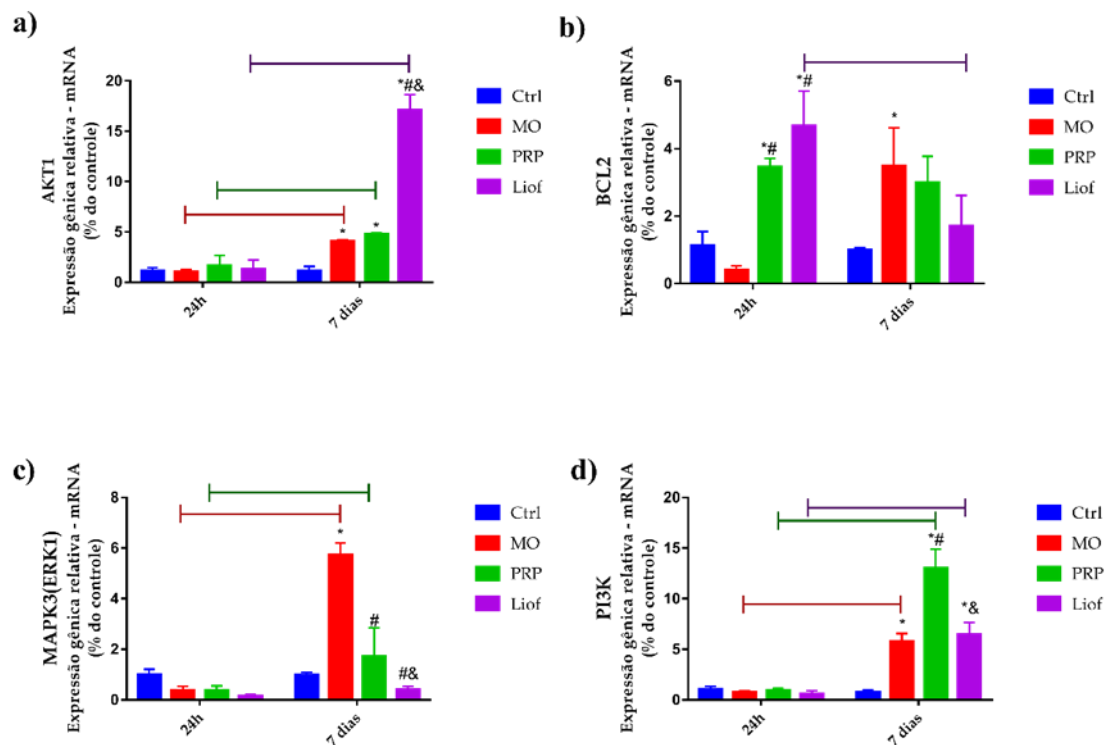


Figura 26 - Expressão gênica relativa de marcadores da viabilidade celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados AKT1 (a), BCL2 (b), MAPK3 (c) e PI3K (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de múltipla comparação 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.

O próximo conjunto de genes avaliados foi relacionado a proliferação celular. Os genes estudados foram: *Quinase dependente de ciclina 2 (CDK2)*, *Quinase dependente de ciclina 4 (CDK4)*, *Quinase dependente de ciclina 6 (CDK6)*, *Marcador de proliferação KI-67 (MKI67)*, *Inibidor de quinase dependente de ciclina 2B (CDKN2B ou P15)* e *Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A (CDKN1A ou P21)*.

A expressão relativa de **CDK2** foi modulada por ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 1,00 \times 10^{-15}$ / **Tratamento**: $P = 2,68 \times 10^{-12}$ / **Interação**: $P = 2,26 \times 10^{-12}$). Ao compararmos os períodos 24 h e 7 dias, todos os tratamentos apresentaram modulação positiva na expressão gênica (**MO**: $P = 3,84 \times 10^{-9}$ / **PRP**: $P = 3,00 \times 10^{-14}$ / **Liof**: $P = 1,29 \times 10^{-9}$). Em 7 dias foram observadas modulações positivas para todos os tratamentos em comparação ao grupo controle (**MO**: $P = 5,94 \times 10^{-9}$ / **PRP**: $P = 3,10 \times 10^{-14}$ / **Liof**: $P = 3,34 \times 10^{-9}$). Também foi observada diferença entre os grupos **PRP** e **Liof** ($P = 1,81 \times 10^{-10}$).

Ambos os fatores e sua interação modularam a expressão de **CDK4** (**Tempo**: $P = 1,03 \times 10^{-10}$ / **Tratamento**: $P = 4,84 \times 10^{-6}$ / **Interação**: $P = 1,28 \times 10^{-6}$). Entre 24 h e 7 dias todos os grupos tratados tiveram sua expressão aumentada de modo significativo (**MO**: $P = 7,67 \times 10^{-5}$ / **PRP**: $P = 5,89 \times 10^{-8}$ / **Liof**: $P = 2,69 \times 10^{-7}$). Todos os tratamentos apresentaram expressão diferencial comparados ao grupo controle em 7 dias (**MO**: $P = 2,32 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 1,16 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 6,88 \times 10^{-7}$). Foi observada também a diferença na expressão entre os grupos **PRP** ($P = 2,55 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 3,46 \times 10^{-2}$) e o grupo **MO**.

CDK6 teve sua expressão modulada por ambos os tratamentos e sua interação (**Tempo**: $P = 4,88 \times 10^{-9}$ / **Tratamento**: $P = 1,50 \times 10^{-12}$ / **Interação**: $P = 4,41 \times 10^{-9}$). Comparando os períodos de 24 h e 7 dias (**MO**: $P = 6,77 \times 10^{-7}$ / **PRP**: $P = 3,58 \times 10^{-11}$ / **Liof**: $P = 1,35 \times 10^{-6}$). Já em 7 dias, foi observado que os grupos **MO** ($P = 9,96 \times 10^{-7}$), **PRP** ($P = 3,78 \times 10^{-11}$) e **Liof** ($P = 3,82 \times 10^{-6}$) apresentaram diferenças significativas em comparação com o grupo controle, **PRP** apresentou diferença com **MO** ($P = 1,01 \times 10^{-6}$) e com **Liof** ($P = 2,87 \times 10^{-7}$).

A expressão de **MKI67** apresentou diferença significativa em resposta a ambos os tratamentos e sua interação (**Tempo**: $P = 1,38 \times 10^{-9}$ / **Tratamento**: $P = 9,63 \times 10^{-6}$ / **Interação**: $P = 5,65 \times 10^{-6}$). A comparação entre 24 h e 7 dias apresentou modulação positiva na expressão gênica em todos os grupos tratados (**MO**: $P = 2,71 \times 10^{-3}$ / **PRP**: $P = 1,88 \times 10^{-6}$ / **Liof**: $P = 3,36 \times 10^{-7}$). Grupos **MO** ($P = 3,39 \times 10^{-3}$), **PRP** ($P = 1,96 \times 10^{-6}$) e **Liof** ($P = 5,40 \times 10^{-7}$) apresentaram diferença significativa em comparação ao grupo controle. **MO** apresentou diferenças em comparação aos grupos **PRP** ($P = 9,10 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 1,56 \times 10^{-3}$).

A expressão relativa de **P15** foi modulada por ambos os fatores (**Tempo**: $P = 4,77 \times 10^{-8}$ / **Tratamento**: $P = 1,25 \times 10^{-11}$ / **Interação**: $P = 2,36 \times 10^{-7}$). Os grupos tratados apresentaram modulação positiva na comparação do período de 24 h com 7 dias (**MO**: $P = 2,01 \times 10^{-6}$ / **PRP**: $P = 4,33 \times 10^{-10}$ / **Liof**: $P = 8,85 \times 10^{-6}$). Em 7 dias, foram observadas diferenças na expressão entre todos os grupos tratados ao compararmos com o controle (**MO**: $P = 1,86 \times 10^{-6}$ / **PRP**: $P = 1,17 \times 10^{-9}$ / **Liof**: $P = 4,00 \times 10^{-5}$), e diferenças entre o grupo **PRP** com os grupos **MO** ($P = 2,73 \times 10^{-4}$) e **Liof** ($P = 9,85 \times 10^{-6}$).

Por último, foram observadas modulações na expressão relativa de **P21** causadas pelo fator tempo ($P = 6,71 \times 10^{-10}$), fator tratamento ($P = 4,33 \times 10^{-6}$) e sua interação ($P = 1,34 \times 10^{-6}$). Comparando os períodos 24 h e 7 dias, foi observada aumento na expressão gênica entre todos os grupos tratados (**MO**: $P = 2,10 \times 10^{-5}$ / **PRP**: $P = 1,95 \times 10^{-8}$ / **Liof**: $P = 1,06 \times 10^{-3}$). Em 7 dias, os grupos **MO** ($P = 5,21 \times 10^{-5}$), **PRP** ($P = 5,76 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 2,31 \times 10^{-2}$) apresentaram modulação positiva em comparação ao controle. O grupo **PRP** apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos **MO** ($P = 4,40 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 1,27 \times 10^{-5}$). A **Figura 27** contém os gráficos de expressão gênica relativa dos genes relacionados a proliferação celular.

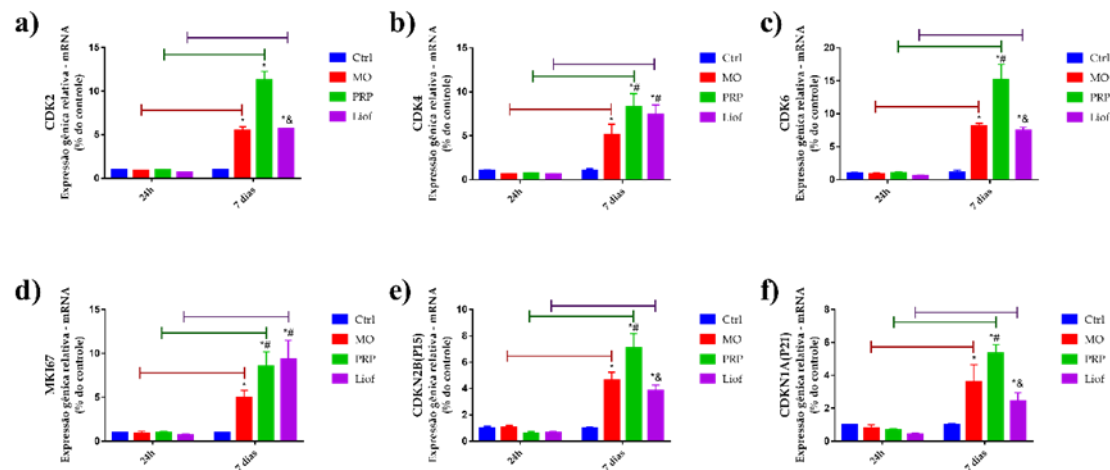


Figura 27 - Expressão gênica relativa de marcadores de proliferação celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados CDK2 (a), CDK4 (b), CDK6 (c), MIK67 (d), P15 (e) e P21 (f). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de múltipla comparação 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.

Na sequência, avaliamos um conjunto de genes relacionados a adesão celular, sendo estes: *Integrina subunidade beta 1 (ITGB1)*, *Proteína tirosina quinase de adesão focal (FAK ou PTK2)*, *Proteína tirosina quinase SRC (SRC)*, *Cofilina 1 (CFL1)*, *Paxilina (PXN)*, *Rac GTPase 1 (RAC1)*, *Proteína efetora pequena CDC 42 (CDC42)*, *Proteína transformadora RhoA (RHOA)*, *Proteína de ligação a GTP relacionada a Rho (RHOC)* e *Proteína quinase 1 associada a Rho (ROCK1)*:

ITGB1 teve sua expressão relativa modulada pelo ambos os fatores (**Tempo**: $P = 1,34 \times 10^{-4}$ / **Tratamento**: $P = 1,35 \times 10^{-6}$) bem como sua interação ($P = 8,08 \times 10^{-7}$). Na comparação de 24 h e 7 dias o grupo **MO** apresentou uma modulação positiva ($P = 2,43 \times 10^{-7}$). Em 7 dias foram observadas diferenças entre o grupo **MO** com os demais grupos (**Controle**: $P = 1,38 \times 10^{-6}$ / **PRP**: $P = 1,05 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 2,00 \times 10^{-7}$).

A expressão de **PTK2** não foi modulada pelos tratamentos, porém tempo ($P = 3,14 \times 10^{-4}$) e a interação dos fatores ($P = 2,56 \times 10^{-2}$) causaram diferenças no padrão de expressão. Foi observada diferença apenas na comparação dos períodos de 24 h e 7 dias no grupo **PRP** ($P = 5,36 \times 10^{-3}$). Ambos os tratamentos (**Tempo**: $P = 2,12 \times 10^{-9}$ / **Tratamento**: $P = 1,51 \times 10^{-5}$) e sua interação ($P = 4,88 \times 10^{-6}$) modularam a expressão de **SRC**. Todos os grupos tratados apresentaram modulação positiva na comparação entre 24 h e 7 dias (**MO**: $P = 1,45 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 6,87 \times 10^{-8}$ / **Liof**: $P = 6,82 \times 10^{-4}$). Em 7 dias foram observadas diferenças entre os grupos

tratados e o controle (**MO**: $P = 3,99 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 1,38 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 3,51 \times 10^{-3}$), grupos **MO** ($P = 1,88 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 2,21 \times 10^{-4}$) apresentaram diferenças significativas na expressão comparados a **PRP**.

CFL1 teve modulada sua expressão gênica relativa por ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 2,13 \times 10^{-8}$ / **Tratamento**: $P = 5,12 \times 10^{-3}$ / **Interação**: $P = 2,83 \times 10^{-4}$). Comparados os períodos de 24 h e 7 dias, os grupos **MO** ($P = 4,33 \times 10^{-4}$), **PRP** ($P = 1,63 \times 10^{-5}$) e **Liof** ($P = 1,68 \times 10^{-4}$) apresentaram modulação positiva significativa. Todos os demais grupos tiveram diferença significativa observada em comparação ao grupo controle em 7 dias (**MO**: $P = 2,57 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 9,19 \times 10^{-5}$ / **Liof**: $P = 1,89 \times 10^{-3}$).

A expressão de **PXN** foi modulada com efeito do tempo ($P = 1,98 \times 10^{-5}$) e da interação entre os fatores ($P = 9,28 \times 10^{-6}$), porém o tratamento não teve efeito detectado. Em 24 h foi observada diferença significativa no padrão de expressão entre **MO** e os grupos **PRP** ($P = 3,72 \times 10^{-2}$) e **Liof** ($9,92 \times 10^{-4}$), que também apresentou diferenças com o grupo controle ($P = 1,56 \times 10^{-2}$). Entre os períodos de 24 h e 7 dias **PRP** ($P = 1,71 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 7,77 \times 10^{-6}$) tiveram sua expressão reduzidas significativamente. Em 7 dias **Liof** apresentou diferenças significativas em comparação aos grupos controle ($P = 7,35 \times 10^{-3}$) e **MO** ($P = 1,37 \times 10^{-2}$).

RAC1 teve sua expressão modulada por ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 2,15 \times 10^{-4}$ / **Tratamento**: $P = 2,15 \times 10^{-6}$ / **Interação**: $P = 2,97 \times 10^{-6}$). **MO** teve um aumento na expressão na comparação entre os períodos de 24 h e 7 dias ($P = 7,87 \times 10^{-7}$). Em 7 dias **PRP** ($P = 6,20 \times 10^{-7}$) e **Liof** ($P = 3,03 \times 10^{-7}$) apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo **MO**. O grupo **MO** também teve diferença observada em relação ao grupo controle ($4,46 \times 10^{-5}$). Ambos os fatores e sua interação causaram efeitos na expressão de **RHOA** (**Tempo**: $P = 5,20 \times 10^{-3}$ / **Tratamento**: $P = 4,82 \times 10^{-7}$ / **Interação**: $P = 5,40 \times 10^{-12}$). Em 24 h **MO** ($P = 1,47 \times 10^{-3}$) e **PRP** ($P = 5,70 \times 10^{-8}$) apresentaram diferenças em comparação ao grupo controle. O grupo **MO** também apresentou diferenças em relação aos grupos **PRP** ($P = 2,23 \times 10^{-10}$) e **Liof** ($P = 1,19 \times 10^{-2}$). Também foi detectada diferenças entre os grupos **PRP** e **Liof** ($P = 1,63 \times 10^{-8}$). Na comparação entre os períodos 24 h e 7 dias todos os grupos tratados apresentaram modulação na expressão com **MO** aumentando ($P = 1,98 \times 10^{-8}$) e **PRP** ($P = 3,08 \times 10^{-10}$) e **Liof** ($P = 5,70 \times 10^{-3}$) diminuindo. Em 7 dias os demais grupos apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (**MO**: $P = 1,40 \times 10^{-3}$ / **PRP**: $P = 5,54 \times 10^{-5}$ / **Liof**: $P = 1,65 \times 10^{-5}$). **MO** também apresentou diferenças significativas em relação aos grupos **PRP** ($P = 2,97 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 1,30 \times 10^{-8}$).

A expressão relativa de **RHOC** foi modulada por efeito de ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 1,00 \times 10^{-15}$ / **Tratamento**: $P = 1,00 \times 10^{-15}$ / **Interação**: $P = 1,00 \times 10^{-15}$). Em 24 h todos os grupos tratados apresentaram diferenças com o grupo controle (**MO**: $P = 1,39$

$\times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 3,37 \times 10^{-4}$ / **Liof**: $P = 3,52 \times 10^{-5}$). Os grupos **MO** ($P = 2,60 \times 10^{-14}$) e **PRP** ($P = 1,31 \times 10^{-2}$) tiveram sua expressão aumentada na comparação entre 24 h e 7 dias. Em 7 dias **MO** apresentou diferenças significativas em comparação aos demais grupos (**Controle**: $P = 2,60 \times 10^{-14}$ / **PRP**: $P = 2,60 \times 10^{-14}$ / **Liof**: $P = 2,60 \times 10^{-14}$). Também foi observada diferenças entre o grupo **Liof** e os grupos controle ($P = 1,60 \times 10^{-4}$) e **PRP** ($P = 3,46 \times 10^{-3}$).

ROCK1 teve sua expressão modulada pelos fatores avaliados e sua interação (**Tempo**: $P = 1,74 \times 10^{-3}$ / **Tratamento**: $P = 6,92 \times 10^{-5}$ / **Interação**: $P = 1,38 \times 10^{-4}$). Na comparação dos períodos de 24 h e 7 dias o grupo **MO** apresentou um aumento na expressão gênica relativa ($P = 3,86 \times 10^{-5}$). Já em 7 dias foi observada diferença em o grupo **MO** e os demais (**Controle**: $P = 3,65 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 9,64 \times 10^{-6}$ / **Liof**: $P = 4,80 \times 10^{-5}$).

Finalmente, o tratamento foi o único fator que modulou a expressão de **CDC42** ($P = 3,71 \times 10^{-7}$). O grupo **Liof** apresentou diferenças na expressão com os demais grupos em 24 h (**Controle**: $P = 3,64 \times 10^{-4}$ / **MO**: $P = 1,20 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 2,79 \times 10^{-3}$) e 7 dias (**Controle**: $P = 5,62 \times 10^{-4}$ / **MO**: $P = 3,85 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 7,17 \times 10^{-3}$). A **Figura 28** contém os gráficos para os genes de adesão celular analisados.

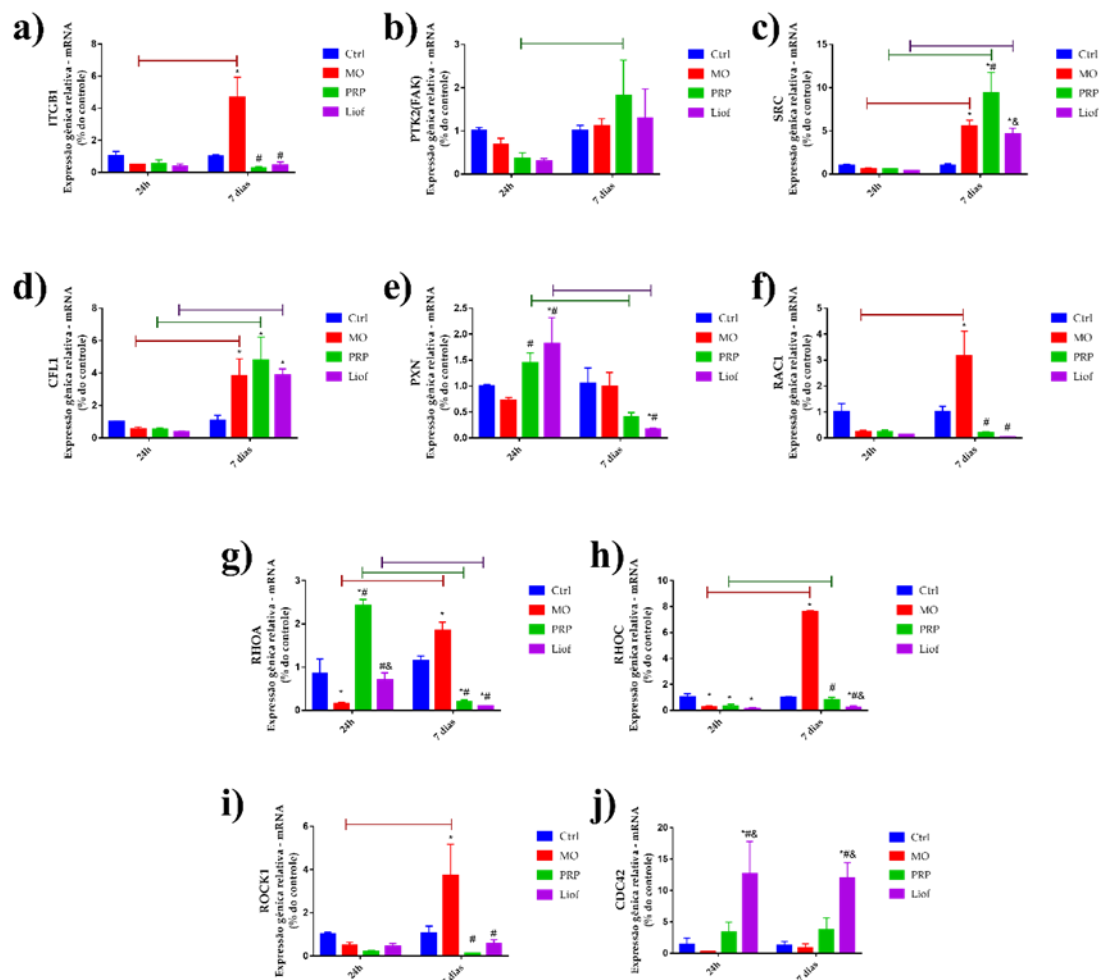


Figura 28 - Expressão gênica relativa de marcadores da adesão celular em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados ITGB1 (a), PTK2 (b), SRC (c), CFL1 (d), PXN (e), RAC1 (f), RHOA (g), RHOC (h), ROCK1 (i) e CDC42 (j). As diferenças estatísticas 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.

Foi observada na sequência a expressão relativa de genes de receptores do tipo tirosina quinase. Os resultados deste foram divididos em 3 conjuntos. O primeiro conjunto, mais abrangente, contém os seguintes genes: *Receptor da proteína morfogênica óssea do tipo 1 (BMPR1)*, *Receptor da proteína morfogênica óssea do tipo 2 (BMPR2)*, *Receptor tirosina quinase proto-oncogene MET (HGFR ou c-MET)*, *Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFR1)*, *Receptor de interleucina 1 do tipo 1 (IL1R1)*, *Receptor de interleucina 18 do tipo 1 (IL18R1)*, *Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas do tipo beta (PDGFRB)*, *Receptor 1 do fator de crescimento transformador (TGFB1)*, *Receptor tirosina quinase 1 Relacionado a Fms (VEGFR1 ou FLT1)* e *Receptor de domínio de inserção de quinase (VEGFR2 ou KDR)*.

BMPR1 teve sua expressão modulada por ambos os fatores, bem como sua interação (**Tempo:** $P = 1,32 \times 10^{-3}$ / **Tratamento:** $P = 3,28 \times 10^{-3}$ / **Interação:** $P = 3,31 \times 10^{-4}$). O grupo **MO** apresentou aumento na expressão na comparação dos períodos 24 h e 7 dias ($P = 7,61 \times 10^{-5}$). Em 7 dias foram observadas diferenças significativas em o grupo **MO** e os demais (**Controle:** $P = 9,62 \times 10^{-5}$ / **PRP:** $P = 1,80 \times 10^{-3}$ / **Liof:** $P = 1,20 \times 10^{-3}$).

A expressão de **BMPR2** foi modulada por todos os fatores avaliados (**Tempo:** $P = 1,56 \times 10^{-5}$ / **Tratamento:** $P = 8,99 \times 10^{-7}$ / **Interação:** $P = 4,80 \times 10^{-6}$). Foi observada um aumento na expressão de **MO** entre os períodos de 24 h a 7 dias ($P = 7,74 \times 10^{-7}$). Já em 7 dias, **MO** apresentou diferenças com os demais grupos analisados (**Controle:** $P = 5,67 \times 10^{-7}$ / **PRP:** $P = 9,72 \times 10^{-8}$ / **Liof:** $P = 1,56 \times 10^{-5}$). Foi observada também uma diferença no perfil dos grupos **PRP** e **Liof** ($P = 4,11 \times 10^{-2}$).

odos os fatores modularam a expressão de **HGFR** (**Tempo:** $P = 4,81 \times 10^{-7}$ / **Tratamento:** $P = 5,90 \times 10^{-8}$ / **Interação:** $P = 1,35 \times 10^{-3}$). Em 24 h o grupo **PRP** apresentou diferenças significativas com os demais (**Controle:** $P = 1,76 \times 10^{-4}$ / **MO:** $P = 9,64 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 4,56 \times 10^{-4}$). O grupo **Liof** apresentou um aumento na expressão entre os períodos 24 h e 7 dias ($P = 4,05 \times 10^{-4}$). Em 7 dias os grupos **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças para os grupos controle (**PRP:** $P = 4,97 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 1,15 \times 10^{-4}$) e **MO** (**PRP:** $P = 5,07 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 1,18 \times 10^{-4}$).

IGFR1 teve sua expressão impactada por ambos os fatores analisados e sua interação (**Tempo:** $P = 1,86 \times 10^{-5}$ / **Tratamento:** $P = 3,51 \times 10^{-4}$ / **Interação:** $P = 1,87 \times 10^{-5}$). Em 24 h o grupo **PRP** apresentou diferença para os demais avaliados (**Controle:** $P = 9,62 \times 10^{-6}$ / **MO:** $P = 1,32 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 3,67 \times 10^{-6}$). Entre os períodos de 24 h e 7 dias os grupos **PRP** ($P = 3,08 \times 10^{-6}$) e **Liof** ($P = 4,67 \times 10^{-2}$) apresentaram redução no perfil de expressão relativa.

IL1R1 apresentou modulações na expressão detectadas para os fatores estudados (**Tempo:** $P = 1,98 \times 10^{-8}$ / **Tratamento:** $P = 3,96 \times 10^{-5}$ / **Interação:** $P = 3,89 \times 10^{-7}$). Entre 24 e 7 dias, grupos **MO** ($P = 7,48 \times 10^{-3}$), **PRP** ($P = 1,81 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 8,06 \times 10^{-3}$). Em 7 dias foi observada diferenças significativas em o grupo **PRP** e os demais (**Controle:** $P = 6,53 \times 10^{-8}$ / **MO:** $P = 2,39 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 2,10 \times 10^{-5}$). Grupos **MO** ($P = 1,34 \times 10^{-2}$) e **Liof** ($P = 1,55 \times 10^{-2}$) também apresentam diferenças em relação ao grupo controle.

Os fatores analisados e sua interação apresentaram efeitos significativos na expressão relativa de **IL18R1** (**Tempo:** $P = 1,00 \times 10^{-15}$ / **Tratamento:** $P = 3,40 \times 10^{-14}$ / **Interação:** $P = 2,40 \times 10^{-14}$). Entre 24 h e 7 dias os grupos **MO** ($P = 2,70 \times 10^{-14}$), e **PRP** ($P = 3,22 \times 10^{-11}$) tiveram aumento na sua expressão relativa. Em 7 dias o grupo **PRP** apresentou diferenças significativas em relação a todos os grupos (**Controle:** $P = 3,66 \times 10^{-11}$ / **MO:** $P = 7,05 \times 10^{-11}$ / **Liof:** $P = 6,91 \times 10^{-10}$). Foi observada também a diferença entre **MO** e os grupo controle ($P = 2,70 \times 10^{-14}$) e **Liof** ($P = 2,70 \times 10^{-14}$).

PDGFRB teve sua expressão relativa afetada pelos fatores analisados (**Tempo:** $P = 3,62 \times 10^{-7}$ / **Tratamento:** $P = 1,11 \times 10^{-5}$ / **Interação:** $P = 1,26 \times 10^{-5}$). **MO** ($P = 4,19 \times 10^{-5}$) e **PRP** ($P = 4,73 \times 10^{-6}$) tiveram sua expressão aumentada ao compararmos os períodos 24 h e 7 dias. Em 7 dias os grupos **MO** ($P = 5,15 \times 10^{-5}$) e **PRP** ($6,25 \times 10^{-6}$) tiveram detectadas diferenças no perfil de expressão relativa comparados ao grupo controle. Também foi detectada a diferença significativa de **Liof** em relação aos grupos **MO** ($P = 7,83 \times 10^{-5}$) e **PRP** ($P = 9,15 \times 10^{-6}$).

Ambos os fatores estudados modularam a expressão relativa de **TGFBR1** (**Tempo:** $P = 4,64 \times 10^{-6}$ / **Tratamento:** $P = 8,70 \times 10^{-4}$ / **Interação:** $P = 4,29 \times 10^{-4}$). Grupos **PRP** ($P = 2,38 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 5,21 \times 10^{-5}$) tiveram aumento na expressão entre 24 h e 7 dias. Em 7 dias os grupos **PRP** e **Liof** tiveram diferenças detectadas em comparação aos grupos controle (**PRP:** $P = 1,92 \times 10^{-2}$ / **Liof:** $P = 1,19 \times 10^{-4}$) e **MO** (**PRP:** $P = 4,70 \times 10^{-2}$ / **Liof:** $P = 2,77 \times 10^{-4}$).

A expressão de **VEGFR1** foi modulada pelo efeito do tratamento ($P = 1,33 \times 10^{-5}$) e da interação dos fatores ($P = 1,71 \times 10^{-5}$), porém o tempo não teve detectada a significância. **MO** teve sua expressão aumentada entre os períodos de 24 h a 7 dias ($P = 7,30 \times 10^{-5}$). Em 7 dias foi observado que o grupo **MO** apresentou diferenças significativas para os demais grupos (**Controle:** $P = 9,03 \times 10^{-5}$ / **MO:** $P = 1,12 \times 10^{-6}$ / **Liof:** $P = 5,02 \times 10^{-6}$).

Por fim, **VEGFR2** teve sua expressão relativa modulada por ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 6,21 \times 10^{-11}$ / **Tratamento**: $P = 1,54 \times 10^{-9}$ / **Interação**: $P = 2,86 \times 10^{-9}$). Entre 24 h e 7 dias os grupos **MO** ($P = 4,14 \times 10^{-11}$), **PRP** ($6,39 \times 10^{-4}$) e **Liof** ($1,03 \times 10^{-3}$) tiveram sua expressão aumentada. Em 7 dias o grupo MO apresentou diferenças significativas para os demais (**Controle**: $P = 5,42 \times 10^{-11}$ / **PRP**: $P = 2,02 \times 10^{-9}$ / **Liof**: $P = 2,15 \times 10^{-9}$). Grupos **PRP** ($P = 1,97 \times 10^{-2}$) e **Liof** ($P = 1,74 \times 10^{-2}$) tiveram detectadas diferenças em relação ao grupo controle. A **Figura 29** contém os gráficos para os receptores de tirosina quinase estudados.

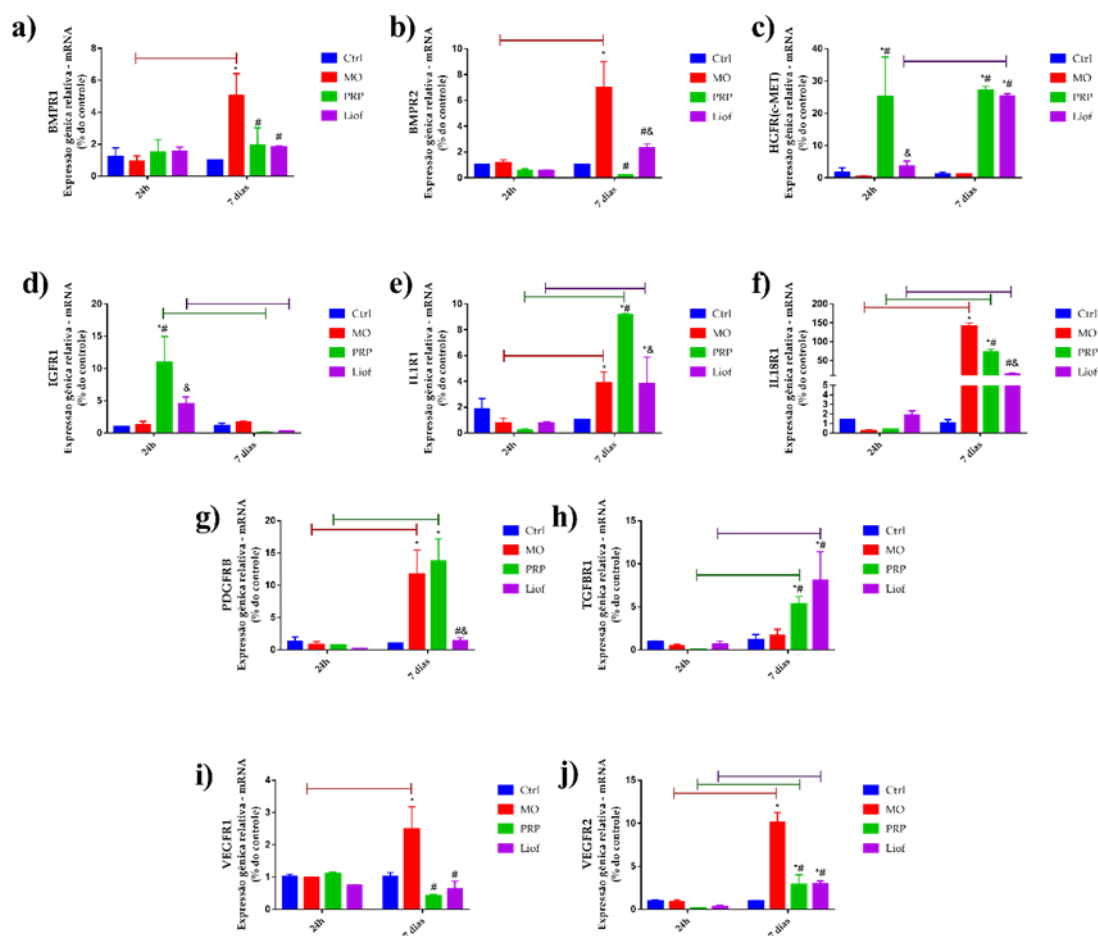


Figura 29 - Expressão gênica relativa de receptores do tipo tirosina quinase em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados BMPR1 (a), BMPR2 (b), c-MET (c), IGFR1 (d), IL1R1 (e), IL18R1 (f), PDGFRB (g), TGFBR1 (h), VEGFR1 (i) e VEGFR2 (j). As 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.

Também foram analisados 4 diferentes *receptores de fator de crescimento de fibroblasto* (FGF), foram eles: **FGFR1**, **FGFR2**, **FGFR3** e **FGFR4**:

FGFR1 teve sua expressão modulada por todos os fatores e sua interação (**Tempo:** $P = 7,41 \times 10^{-8}$ / **Tratamento:** $P = 8,17 \times 10^{-5}$ / **Interação:** $P = 2,52 \times 10^{-5}$). Grupos **MO** ($P = 1,32 \times 10^{-2}$), **PRP** ($4,91 \times 10^{-7}$) e **Liof** ($P = 9,93 \times 10^{-3}$) tiveram sua expressão aumentada entre os períodos de 24 h e 7 dias. Em 7 dias o grupo **PRP** apresentou diferenças para os demais grupos (**Controle:** $P = 9,03 \times 10^{-5}$ / **MO:** $P = 1,12 \times 10^{-6}$ / **Liof:** $P = 5,02 \times 10^{-6}$). Foram observadas diferenças entre os grupos **MO** ($P = 2,41 \times 10^{-2}$) e **Liof** ($P = 3,01 \times 10^{-2}$) com o grupo controle.

A expressão de **FGFR2** foi modulada pelo efeito de ambos os fatores (**Tempo:** $P = 7,18 \times 10^{-11}$ / **Tratamento:** $P = 2,78 \times 10^{-6}$ / **Interação:** $P = 1,62 \times 10^{-6}$). Entre os períodos de 24 h a 7 dias foi observada um aumento na expressão de todos os grupos tratados (**MO:** $P = 1,68 \times 10^{-6}$ / **PRP:** $P = 3,76 \times 10^{-8}$ / **Liof:** $P = 5,40 \times 10^{-6}$). Grupos **MO** ($P = 2,20 \times 10^{-6}$), **PRP** ($P = 5,49 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 1,17 \times 10^{-5}$) apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Também foi observada diferenças entre os grupos **PRP** e **Liof** ($P = 2,36 \times 10^{-2}$).

Os fatores avaliados apresentaram efeitos na expressão de **FGFR3** (**Tempo:** $P = 1,53 \times 10^{-8}$ / **Tratamento:** $P = 1,84 \times 10^{-6}$ / **Interação:** $P = 3,42 \times 10^{-6}$). Foi observado um aumento na expressão entre os períodos de 24 h e 7 dias nos grupos **MO** ($P = 3,81 \times 10^{-2}$), **PRP** ($P = 7,28 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 6,64 \times 10^{-4}$). Aos 7 dias foram observadas diferenças entre **PRP** e os demais grupos (**Controle:** $P = 4,16 \times 10^{-8}$ / **MO:** $P = 1,14 \times 10^{-5}$ / **Liof:** $P = 1,63 \times 10^{-4}$), e entre os grupos **MO** e **Liof** em relação ao grupo controle (**MO:** $P = 1,56 \times 10^{-2}$ / **Liof:** $P = 7,49 \times 10^{-4}$).

Finalmente, **FGFR4** teve sua expressão modulada pelos diferentes fatores avaliados (**Tempo:** $P = 1,57 \times 10^{-8}$ / **Tratamento:** $P = 1,18 \times 10^{-5}$ / **Interação:** $P = 6,67 \times 10^{-5}$). **MO** ($P = 5,33 \times 10^{-3}$), **PRP** ($P = 4,81 \times 10^{-6}$) e **Liof** ($P = 2,35 \times 10^{-5}$) tiveram sua expressão aumentada entre os períodos de 24 h e 7 dias. **MO** apresentou diferenças para os demais grupos avaliados (**Controle:** $P = 5,33 \times 10^{-3}$ / **PRP:** $P = 5,47 \times 10^{-3}$ / **Liof:** $P = 4,36 \times 10^{-2}$), e grupos **PRP** e **Liof** apresentaram diferenças em comparação ao grupo controle (**PRP:** $P = 5,47 \times 10^{-3}$ / **Liof:** $P = 4,36 \times 10^{-2}$), em 7 dias. A **Figura 30** contém os gráficos de expressão para os FGFs avaliados.

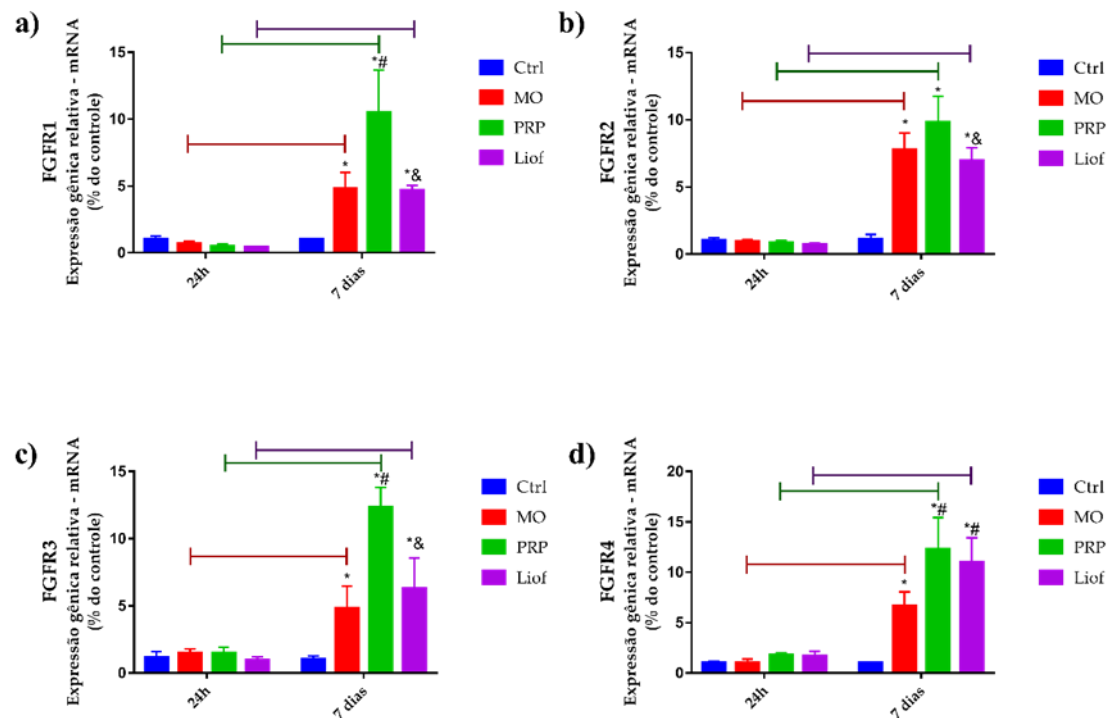


Figura 30 - Expressão gênica relativa de receptores de FGF em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados FGFR1 (a), FGFR2 (b), FGFR3 (c) e FGFR4 (d). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de múltipla comparação 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.

Outra via de sinalização estudada foi a das ERBBs que contém 4 receptores como o *receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR1 ou ERBB1)*, *receptor tirosina quinase Erb-B2 tipo 2 (ERBB2)*, *receptor tirosina quinase Erb-B2 tipo 3 (ERBB3)* e *receptor tirosina quinase Erb-B2 tipo 4 (ERBB4)*, e as proteínas adaptadoras *proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (GRB2)*, *proteína adaptadora SHC 1 (SHC1)* e *fator de troca de nucleotídeo guanina SOS Ras / Rac (SOS1)*.

Todos os fatores estudados modularam a expressão de **EGFR1** (**Tempo:** $P = 1,17 \times 10^{-9}$ / **Tratamento:** $P = 3,20 \times 10^{-12}$ / **Interação:** $P = 9,79 \times 10^{-11}$). Em 24 horas os grupos **MO** ($P = 2,39 \times 10^{-3}$) e **PRP** ($P = 1,26 \times 10^{-2}$) apresentaram diferenças em relação ao grupo controle. Entre os períodos de 24 h e 7 dias o grupo **Liof** teve um aumento na sua expressão ($P = 8,70 \times 10^{-12}$). Em 7 dias o grupo **Liof** apresentou diferenças significativas em relação aos demais (**Controle:** $P = 1,81 \times 10^{-11}$ / **MO:** $P = 2,50 \times 10^{-12}$ / **PRP:** $P = 2,40 \times 10^{-12}$).

ERBB2 teve sua expressão relativa modulada apenas pelo fator **tratamento** ($P = 4,99 \times 10^{-5}$). O grupo **Liof** apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle em 24 h ($P = 4,60 \times 10^{-3}$) e 7 dias ($P = 3,33 \times 10^{-3}$).

A expressão relativa de **ERBB3** foi modulada por ambos os fatores bem como sua interação (**Tempo**: $P = 2,10 \times 10^{-6}$ / **Tratamento**: $P = 7,27 \times 10^{-7}$ / **Interação**: $P = 3,28 \times 10^{-6}$). Entre os períodos de 24 h e 7 dias o grupo **Liof** apresentou um aumento em sua expressão relativa ($P = 2,03 \times 10^{-7}$). **Liof** apresentou diferenças significativas em relação aos demais grupos em 7 dias (**Controle**: $P = 1,40 \times 10^{-6}$ / **MO**: $P = 4,85 \times 10^{-6}$ / **PRP**: $P = 1,82 \times 10^{-5}$).

ERBB4 teve sua expressão moduladas pelos fatores avaliados e sua interação (**Tempo**: $P = 3,93 \times 10^{-8}$ / **Tratamento**: $P = 8,49 \times 10^{-9}$ / **Interação**: $P = 4,87 \times 10^{-7}$). Os grupos **PRP** ($P = 5,16 \times 10^{-4}$) e **Liof** ($P = 2,61 \times 10^{-8}$) apresentaram aumento em sua expressão entre os períodos 24 h e 7 dias. Foi observada uma diferença entre os grupos **PRP** e **Liof** em relação aos grupos controle (**PRP**: $P = 2,86 \times 10^{-4}$ / **Liof**: $P = 2,79 \times 10^{-9}$) e **MO** (**PRP**: $P = 2,36 \times 10^{-3}$ / **Liof**: $P = 9,17 \times 10^{-9}$), e entre os grupos **PRP** e **Liof** ($P = 6,44 \times 10^{-6}$), em 7 dias.

A expressão de **GRB2** foi modulada por efeito de ambos os fatores (**Tempo**: $P = 5,83 \times 10^{-8}$ / **Tratamento**: $P = 3,71 \times 10^{-3}$ / **Interação**: $P = 1,09 \times 10^{-4}$). Todos os grupos tratados tiveram aumento em sua expressão relativa (**MO**: $P = 1,40 \times 10^{-6}$ / **PRP**: $P = 4,85 \times 10^{-6}$ / **Liof**: $P = 1,82 \times 10^{-5}$). Em 7 dias foi observada diferenças significativas entre o grupo controle e os demais (**MO**: $P = 2,54 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 7,73 \times 10^{-5}$ / **Liof**: $P = 4,78 \times 10^{-2}$).

SHC1 teve sua expressão modulada pelo efeito de ambos os fatores (**Tempo**: $P = 6,42 \times 10^{-9}$ / **Tratamento**: $P = 1,02 \times 10^{-5}$ / **Interação**: $P = 8,97 \times 10^{-7}$). Entre os períodos de 24 h e 7 dias, grupos **MO** ($P = 1,50 \times 10^{-4}$), **PRP** ($P = 2,65 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 3,95 \times 10^{-2}$) apresentaram aumento em sua expressão relativa. Em 7 dias foram observadas diferenças entre o grupo **MO** e os demais (**Controle**: $P = 1,48 \times 10^{-4}$ / **PRP**: $P = 2,85 \times 10^{-3}$ / **Liof**: $P = 3,21 \times 10^{-2}$), e entre o grupo **PRP** e os grupos controle ($P = 9,10 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 4,54 \times 10^{-6}$).

Por fim, a expressão relativa de **SOS1** não foi modulada por efeito do tempo, porém sofreu efeitos do tratamento e da interação entre os fatores (**Tratamento**: $P = 1,21 \times 10^{-5}$ / **Interação**: $P = 3,02 \times 10^{-4}$). **MO** teve aumento em sua expressão relativa detectada entre os períodos de 24 h e 7 dias ($P = 6,84 \times 10^{-4}$). Em 7 dias foram detectadas diferenças entre **MO** e os demais (**Controle**: $P = 2,75 \times 10^{-5}$ / **PRP**: $P = 7,88 \times 10^{-6}$ / **Liof**: $P = 3,73 \times 10^{-5}$). A **Figura 31** contém os gráficos para os genes da via de ERBB.

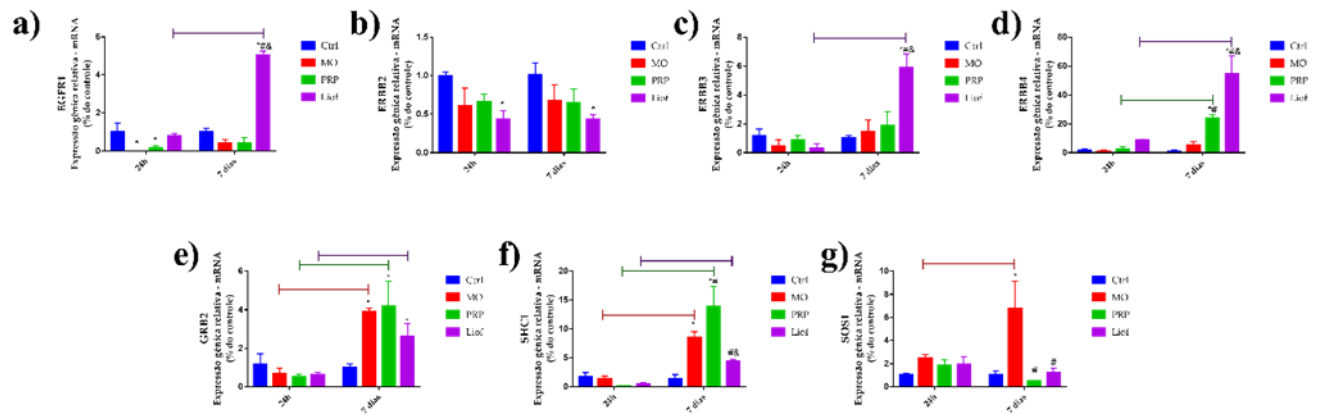


Figura 31 - Expressão gênica relativa de marcadores da via de ERBB em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados EGFR1 (a), ERBB2 (b), ERBB3 (c), ERBB4 (d), GRB2 (e), SHC1 (f) e SOS1 (g). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multiplicação 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 horizontal 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.

O último conjunto avaliado foi de miRNA de interesse. Os miRNAs foram selecionados a partir do trabalho apresentado no capítulo 2 na qual utilizando ferramentas de bioinformática determinamos miRNA presentes em plaquetas com potencial de regulação da osteogênese (FERREIRA; ZAMBUZZI, 2021). É importante destacar que estes miRNA tiveram sua expressão analisada em células MS (como os demais) e não em plaquetas (ou suas microp rticulas). Dentre os miRNAs detectados **hsa-miR-361-5p** (29 alvos dentre os genes analisados neste capítulo), **hsa-miR-361-3p** (29 alvos dentre os genes analisados neste capítulo), **hsa-miR-128** (17 alvos dentre os genes analisados neste capítulo) e **hsa-miR-7-5p** (41 alvos dentre os genes analisados neste capítulo). O primer desenhado para **hsa-miR-361**   referente as duas formas maduras (**3p** e **5p**):

hsa-miR-7-5p teve sua expressão relativa modulada por ambos os fatores e sua interação (**Tempo**: $P = 9,80 \times 10^{-11}$ / **Tratamento**: $P = 6,14 \times 10^{-6}$ / **Interação**: $P = 1,93 \times 10^{-6}$). Entre os períodos de 24 h e 7 dias todos os grupos tratados tiveram aumento em sua expressão relativa (**MO**: $P = 1,59 \times 10^{-5}$ / **PRP**: $P = 8,91 \times 10^{-8}$ / **Liof**: $P = 4,98 \times 10^{-7}$). Em 7 dias foram observadas diferenças entre o grupo controle e os demais (**MO**: $P = 1,88 \times 10^{-5}$ / **PRP**: $P = 1,41 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 1,37 \times 10^{-6}$).

Ambos os fatores, e sua interação, afetaram a expressão de **hsa-miR-128** (**Tempo**: $P = 1,09 \times 10^{-11}$ / **Tratamento**: $P = 7,53 \times 10^{-8}$ / **Interação**: $P = 2,40 \times 10^{-8}$). Entre 24 h e 7 dias os grupos **MO** ($P = 5,45 \times 10^{-4}$), **PRP** ($P = 3,88 \times 10^{-10}$) e **Liof** ($P = 8,46 \times 10^{-8}$) apresentaram um aumento na expressão relativa. Em 7 dias foram observadas diferenças significativas entre **PRP**

e os demais grupos (**Controle**: $P = 9,50 \times 10^{-10}$ / **MO**: $P = 3,22 \times 10^{-7}$ / **Liof**: $P = 3,68 \times 10^{-3}$), entre **MO** ($P = 1,94 \times 10^{-3}$) e **Liof** ($P = 2,08 \times 10^{-7}$) em relação ao grupo controle, e na comparação entre os grupos **MO** e **Liof** ($P = 3,68 \times 10^{-3}$).

Por último, a expressão relativa de **hsa-miR-361** foi impactada pelos fatores avaliados (**Tempo**: $P = 1,04 \times 10^{-11}$ / **Tratamento**: $P = 2,48 \times 10^{-8}$ / **Interação**: $P = 7,86 \times 10^{-9}$). Os grupos **MO** ($P = 2,52 \times 10^{-9}$), **PRP** ($P = 1,26 \times 10^{-9}$) e **Liof** ($P = 1,54 \times 10^{-2}$) tiveram sua expressão aumentada entre os períodos de 24 h a 7 dias. Em 7 dias o grupo **PRP** apresentou diferenças significativas em relação aos grupos controle ($P = 2,11 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 7,36 \times 10^{-8}$). Também foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle ($P = 1,05 \times 10^{-8}$) e **Liof** ($P = 3,48 \times 10^{-8}$) em relação ao grupo **MO**. A **Figura 32** contém os gráficos dos miRNAs avaliados neste capítulo.

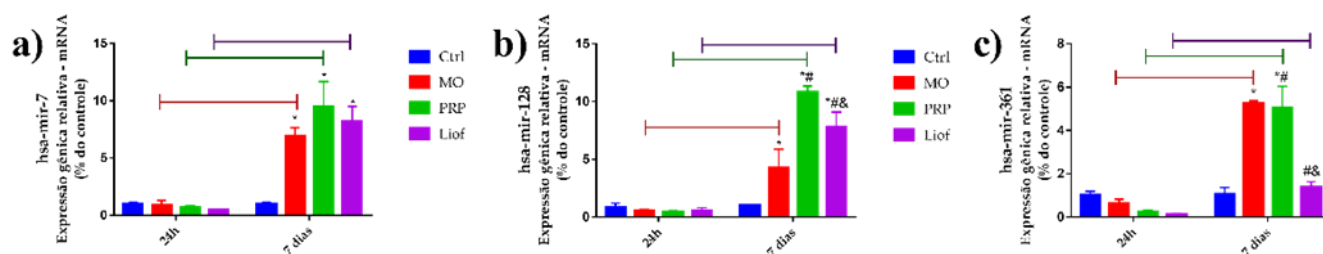


Figura 32 - Expressão gênica relativa de miRNAs de interesse em células MS submetidas ao tratamento com PRP ou Liofilizado durante 24 horas e 7 dias. Foram avaliados hsa-miR-7 (a), hsa-miR-128 (b) e hsa-miR-361 (c). As diferenças estatísticas foram medidas utilizando ANOVA two-way e o teste de multipcomparação 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.

4.3.3 Análise de componentes principais

Para um melhor entendimento do complexo mapa molecular obtido com os resultados de RT-qPCR optamos por realizar uma análise de componentes principais (PCA), muitas vezes conhecida por análise multivariada. PCA é capaz de transladar dados com grandes quantidades de variáveis em representações com menos variáveis (conhecida como redução de dimensionalidade), normalmente 2 variáveis/ dimensões ou, como são mais conhecidos, componentes principais. Através deste procedimento PCA são muito uteis em análises de agrupamentos (*clusters*), observação de tendências e *outliers*, ou mesmo compactação de *datasets*. Para a realização de nossa PCA utilizando a ferramenta R, sendo a análise realizada com o pacote base e a representação visual com o pacote *factoextra* (KASSAMBARA; MUNDT, 2020). Cada gene avaliado por RT-qPCR foi considerado uma dimensão e cada grupo uma

observação. Os valores de expressão foram escalonados (Transformados em valores entre 0 e 1) e centralizados (Tiveram a média subtraída) antes de realizar a PCA.

A **Figura 33** contém o *scree plot* da PCA, nele temos o número de dimensões no eixo X pela porcentagem de variância explicada. Foi possível observar que as duas primeiras dimensões explicam juntas 73,9 % da variância dos dados (A 1ª 49,8% e a 2ª 24,1%), então foi possível representar os grupos utilizando apenas 2 componentes principais (PCs) como visto na **Figura 34**. Os todos os grupos em 24 horas e o grupo controle em 7 dias se agruparam sob o PC1 ou eixo x levemente deslocados no sentido negativo do eixo. Já os grupos **MO**, **PRP** e **Liof** em 7 dias se encontram deslocados no sentido positivo do eixo x e com uma variação no sentido do eixo y ou PC2, com **PRP** e **Liof** no sentido positivo e **MO** no sentido negativo. Essa representação dos grupos em PC1 e PC2 nos fez interpretar PC1, que explica a maior parte da variância dos dados, como o efeito temporal nos tratamentos, uma vez que todos os grupos em 24 horas se mantiveram altamente agrupados sob o eixo.

Já o PC2, em nossa interpretação, contém o efeito dos tratamentos na célula. Isso demonstraria, que para os genes avaliados neste capítulo, os tratamentos entre **PRP** e **Liof** resultariam em um perfil de expressão gênica distinto ao perfil obtido com **MO**. A **Figura 35** contém uma representação da PCA conhecido por *biplot* onde os grupos são representados como pontos e as variáveis são representadas como setas. Nesta representação o ângulo de uma variável com o eixo indica a correlação deste com o PC em questão. O mesmo pode se dizer de um ângulo entre duas variáveis. A correlação pode ser calculada através do cosseno do ângulo, sendo máxima para um ângulo de 0°, nula para 90° e mínima em 180°. Devido a poluição gerada na imagem do *biplot*, devido à alta quantidade de variáveis estudadas, geramos gráficos de barras para a contribuição de cada variável para os PC1 (**Figura 36**) e PC2 (**Figura 37**), nelas a linha tracejada horizontal indica o limiar de uma distribuição aleatória. Observando as contribuições para PC2 temos **RUNX2**, **ALPL** e **SP7** (OTX), que neste trabalho foram utilizados como marcadores da osteogênese (O único que não apresentou alta contribuição foi **BGLAP/Osteocalcina**), aparecem com alta contribuição, corroborando com a interpretação de **PRP** e **Liof** apresentarem um perfil osteogênico distinto de **MO**. Para PC1 nos chamou a atenção a alta contribuição de genes de proliferação estudados, corroborando com a hipótese de PC1 ser relacionado a um efeito temporal em nossas amostras.

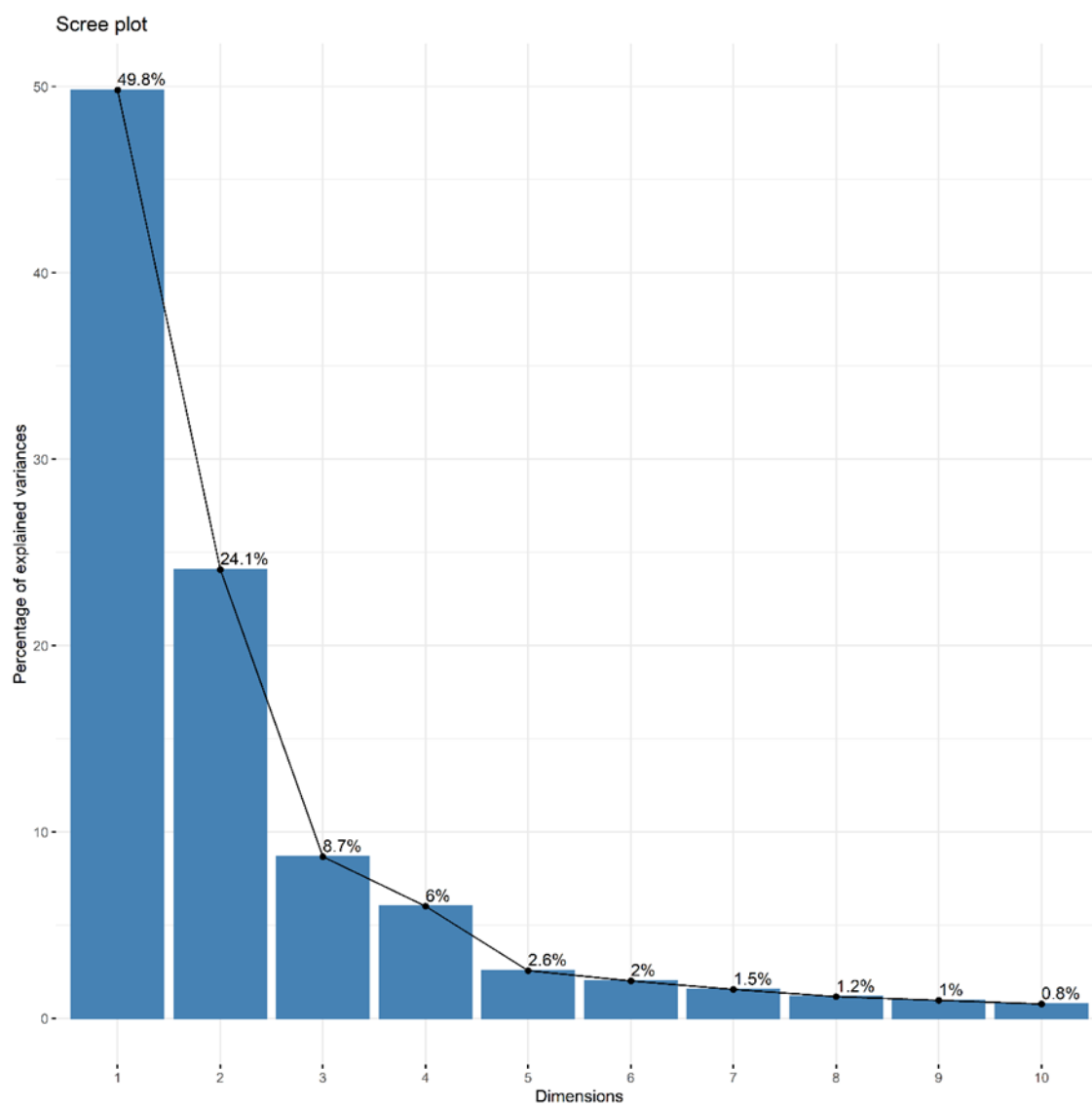


Figura 33 - Scree plot da PCA para a expressão gênica relativa de células MS.

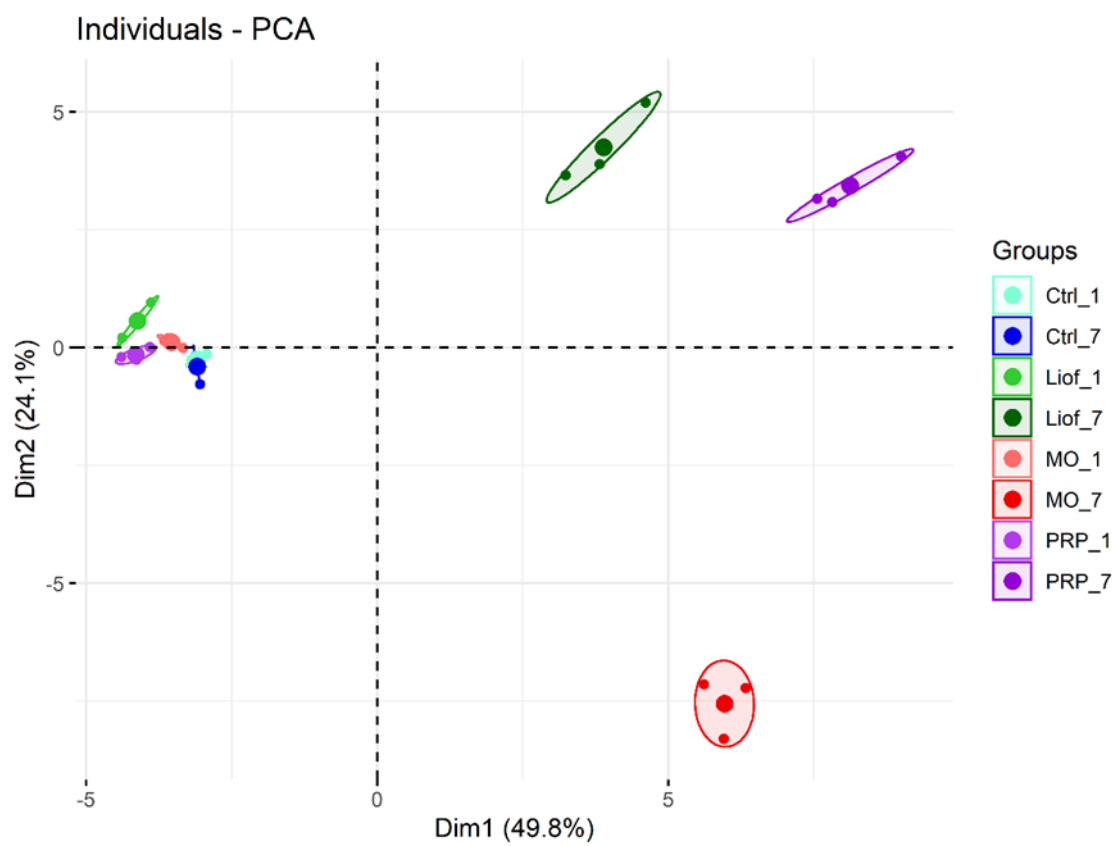


Figura 34 - PCA - Gráfico da representação dos grupos individuais.

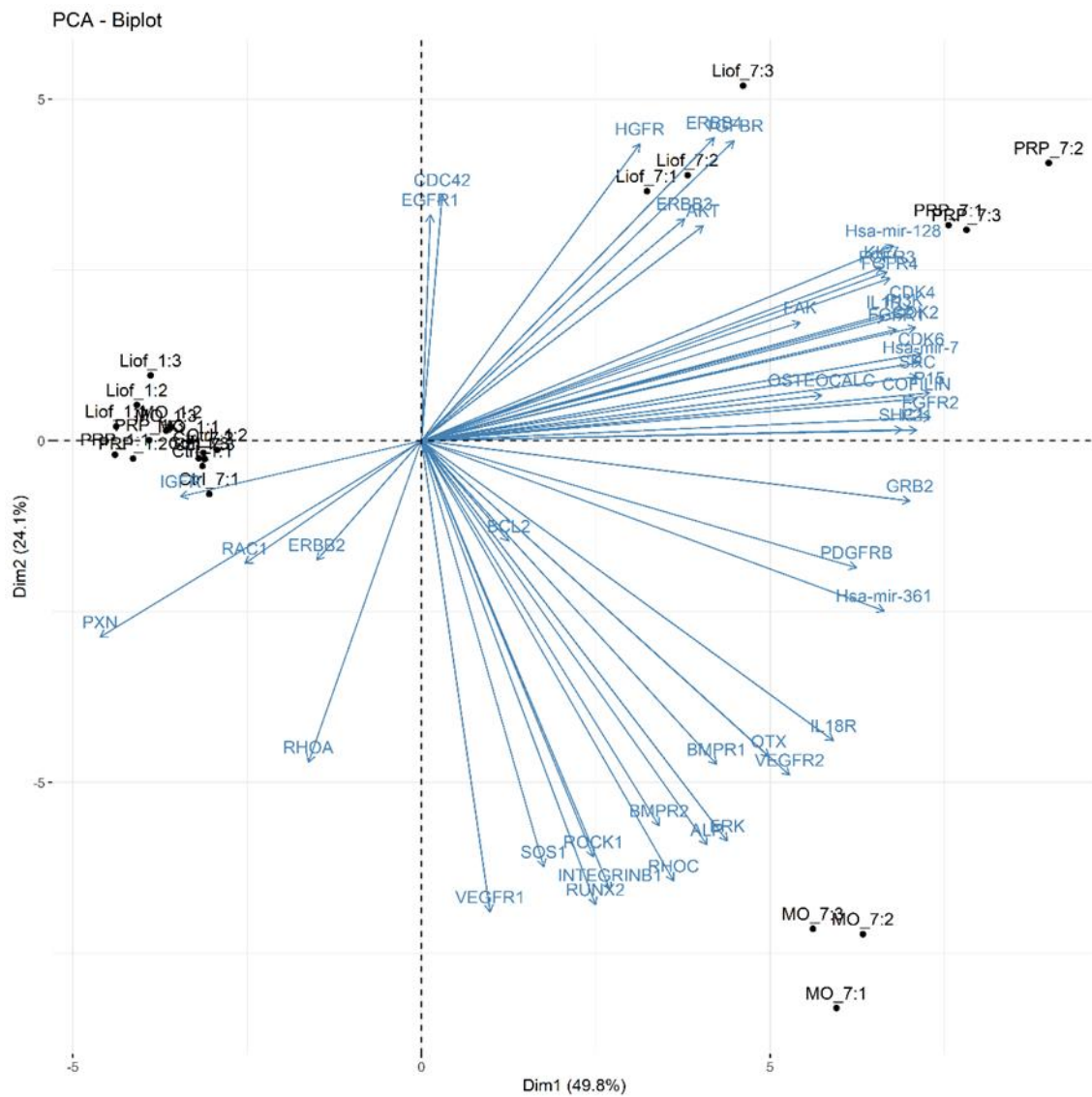


Figura 35 - Biplot da PCA grupos individuais representados como pontos e variáveis representadas como setas.

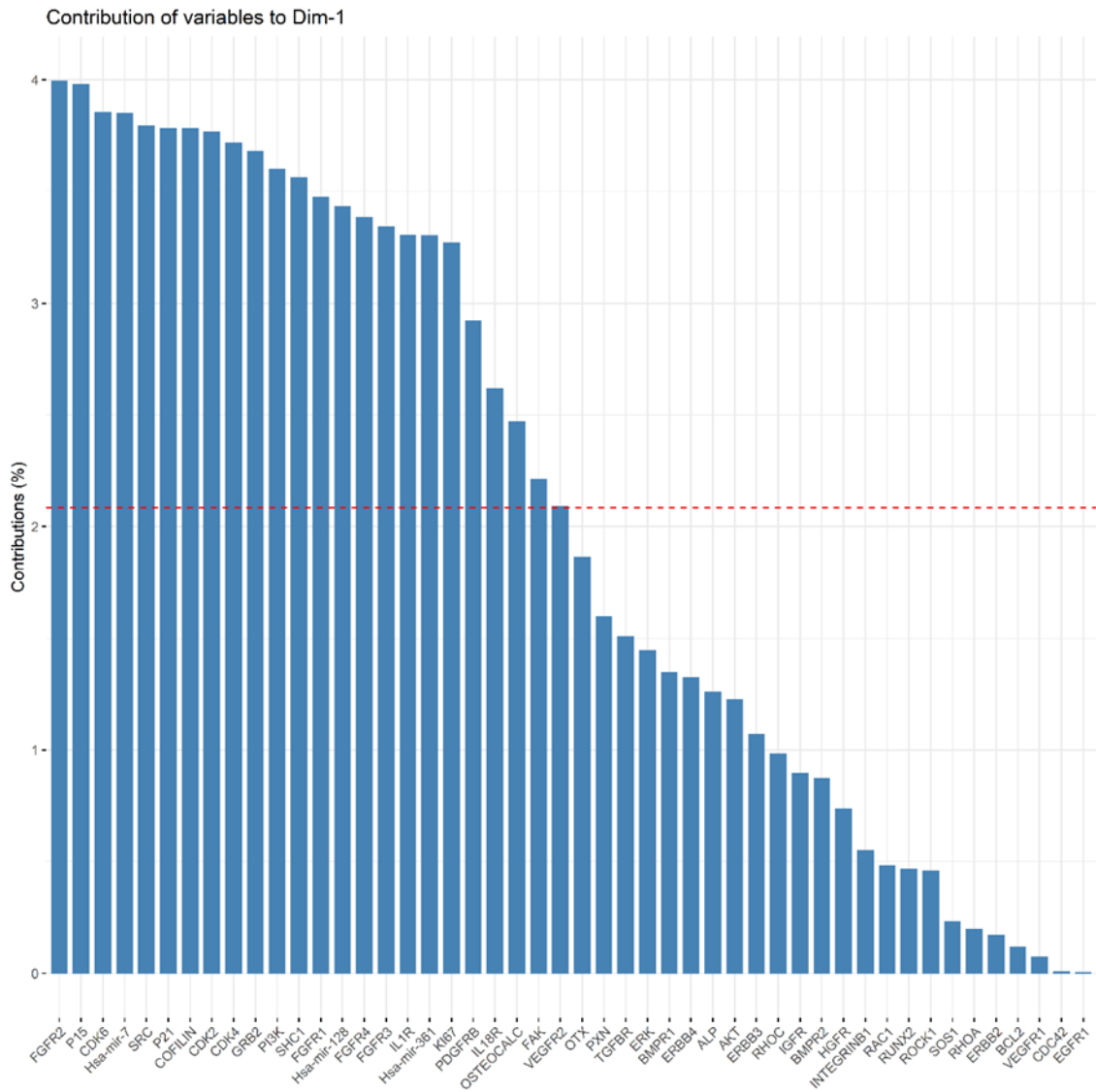


Figura 36 - Gráfico de contribuição das variáveis para a PC1.

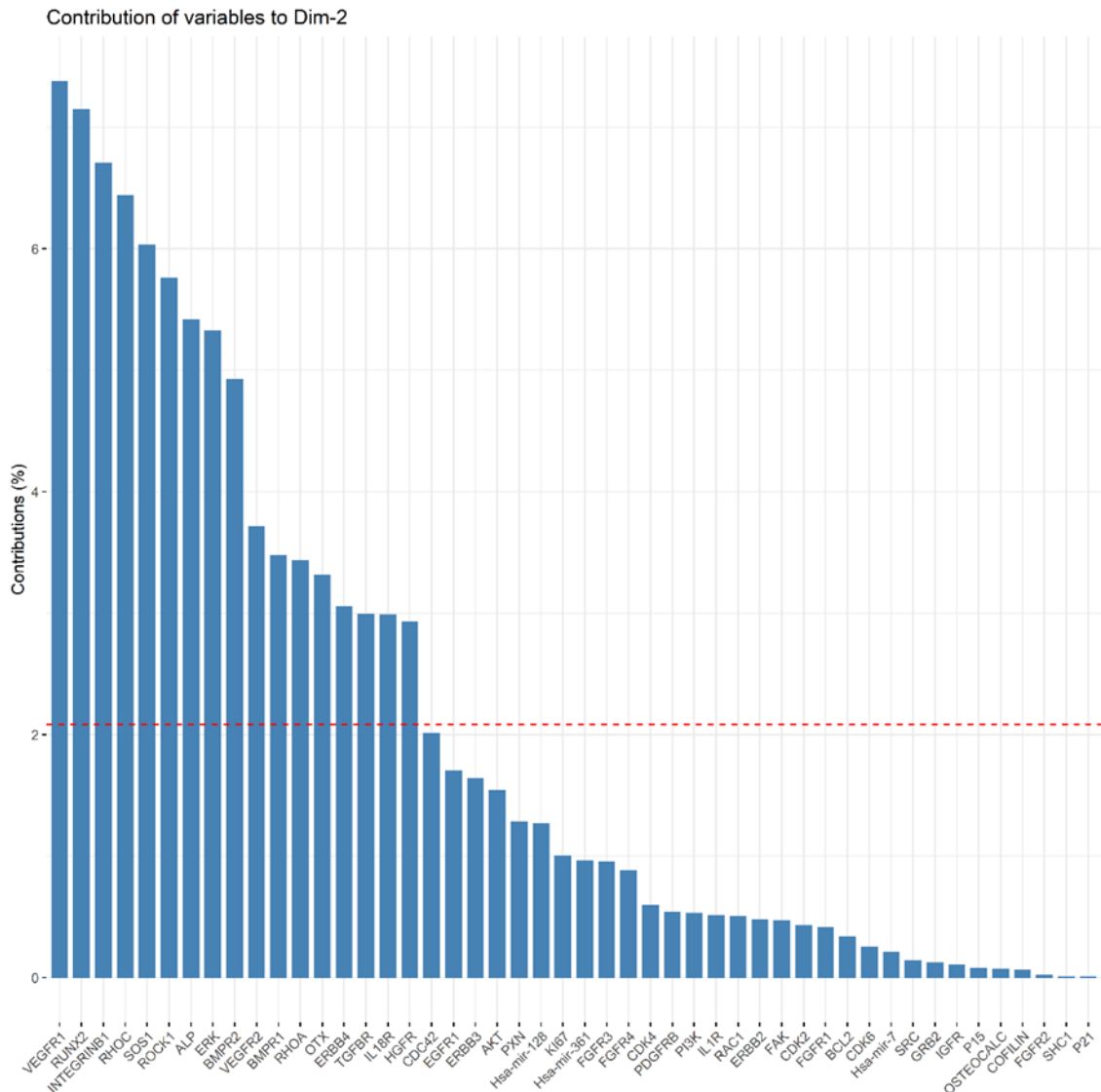


Figura 37 - Gráfico de contribuição das variáveis para a PC2.

4.3.4 Análises de redes de correlação

Na sequência utilizamos a correlação da expressão gênica relativa dentre todas as amostras para a construção de uma rede de interação. Para isso utilizamos a correlação de *Pearson* entre os genes avaliados para a construção de uma matriz de adjacência. Matrizes de adjacência são matrizes numéricas quadradas em que suas linhas e colunas representam cada gene, estas são apenas de compostas de 1 e 0, sendo 1 indicando que existe interação entre os genes e 0 que não há interação. Uma rede de interação pode ser direta ou indireta, para nossa análise consideramos as interações como indiretas. A construção da matriz de adjacência (A) se deu da seguinte forma: se o módulo do coeficiente de correlação de *Pearson* for maior que 0,75 então a o elemento correspondente da matriz A recebe o valor de 1, caso contrário recebe 0. Por fim do pacote *igraph*

foi utilizado para construir a rede a partir da matriz de adjacência. A **Figura 38** contém o esquema da construção da rede de correlação.

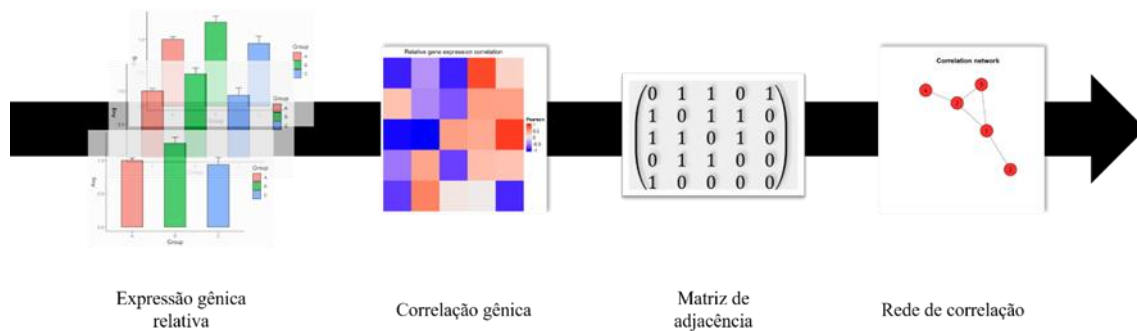


Figura 38 - Esquema para a construção da rede de correlação baseada na expressão gênica.

A **Figura 39** contém um *heatmap* dos valores de correlação obtidos, valores da diagonal principal foram manualmente ajustadas para zero para evitar “*auto-loops*” na rede de correlação. A rede de correlação obtida contém 48 vértices (ou nodos) representando os genes avaliados e 282 arestas representando as interações, com apenas 9 dos genes não apresentaram interações, foram eles: **EGFR1**, **ERBB2**, **BCL2**, **RAC1**, **IGFR1**, **HGFR**, **RHOA**, **CDC42** e **PXN**. Centralidades importantes dos genes foram calculados utilizando o pacote *igraph*. A **Tabela 9** contém os valores para *Grau de conectividade*, *Grau de proximidade* e *Grau de intermediação* para cada gene e a **Figura 40** contém gráficos de densidade para os valores de cada centralidade observada.

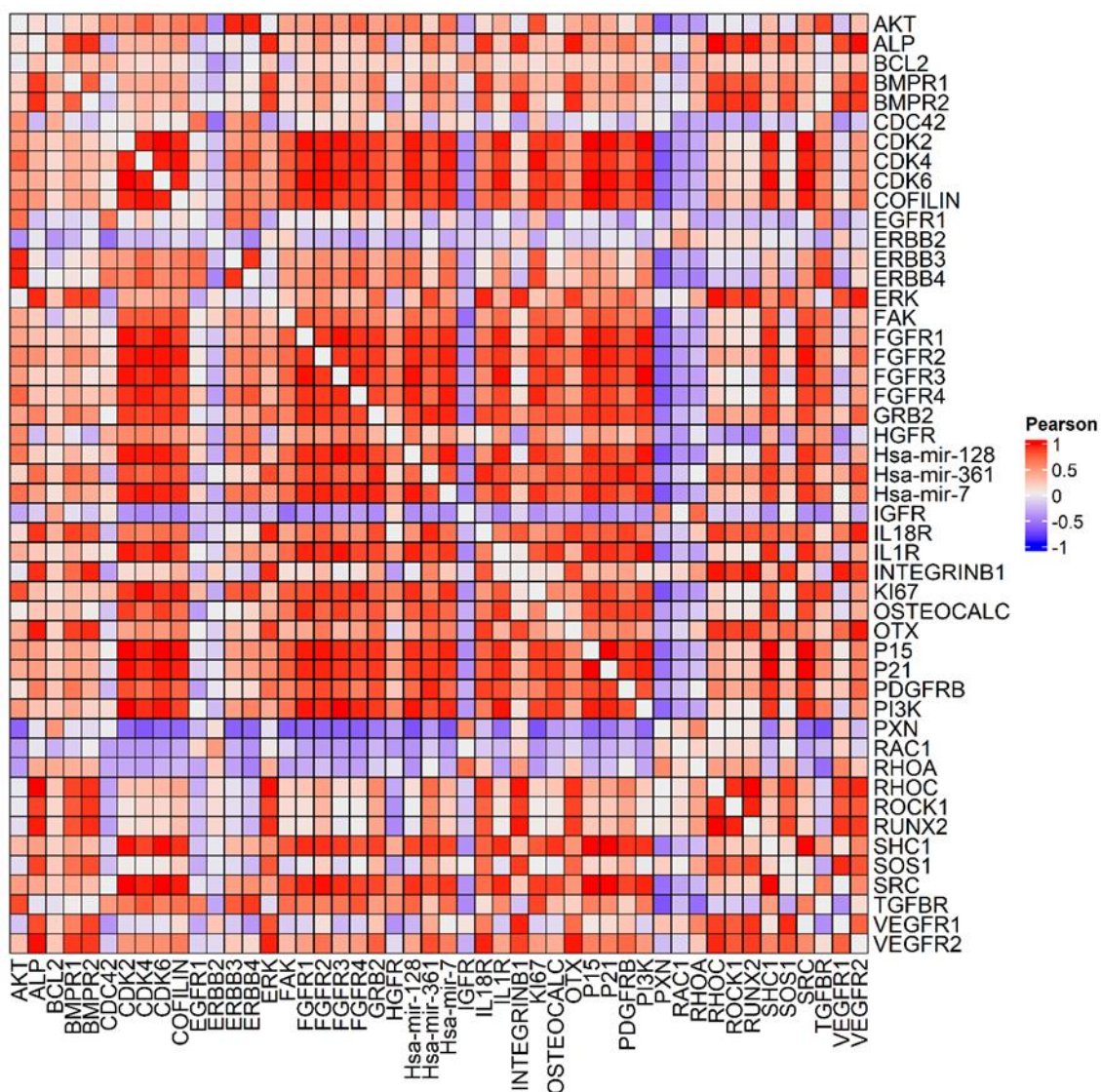


Figura 39- Heatmap da correlação de Pearson dos genes avaliados.

Tabela 9 - Valores de centralidades para cada gene.

Gene	Grau de conectividade	Grau de proximidade	Grau de intermediação
AKT	4	0.001835	0.333333333
ALP	12	0.001898	2.897310519
BCL2	0	4.43E-04	0
BMPR1	8	0.001883	0.446679396
BMPR2	11	0.001894	2.247310519
CDC42	0	4.43E-04	0
CDK2	20	0.002008	7.941441559

CDK4	20	0.001988	29.60972246
CDK6	21	0.002012	12.48231457
COFILIN	19	0.002004	9.359513054
EGFR1	0	4.43E-04	0
ERBB2	0	4.43E-04	0
ERBB3	3	0.001832	0
ERBB4	6	0.001876	2.984891599
ERK	13	0.001965	75.60195757
FAK	7	0.001901	0
FGFR1	19	0.002004	6.343626163
FGFR2	19	0.002004	7.105344323
FGFR3	18	0.00198	1.414768605
FGFR4	19	0.001984	25.16607167
GRB2	20	0.002028	89.82293275
HGFR	0	4.43E-04	0
Hsa-mir-128	18	0.00198	1.414768605
Hsa-mir-361	18	0.002024	193.6505938
Hsa-mir-7	18	0.002	5.507528927
IGFR	0	4.43E-04	0
IL18R	12	0.001984	140.1672222
IL1R	20	0.002008	7.941441559
INTEGRINB1	11	0.001894	2.247310519
KI67	20	0.001957	78.47797718
OSTEOCALC	14	0.001969	0.997069147
OTX	10	0.00189	0.696679396
P15	21	0.002012	12.48231457
P21	21	0.002012	12.48231457
PDGFRB	13	0.001992	22.54474867
PI3K	20	0.002008	7.941441559
PXN	0	4.43E-04	0
RAC1	0	4.43E-04	0
RHOA	0	4.43E-04	0
RHOC	12	0.001898	2.897310519
ROCK1	10	0.001862	0.717857143
RUNX2	12	0.001898	2.897310519
SHC1	21	0.002012	12.48231457

SOS1	8	0.001855	0.125
SRC	21	0.002012	12.48231457
TGFBR	5	0.001873	1.141942881
VEGFR1	8	0.001855	0.125
VEGFR2	12	0.001961	51.82232098

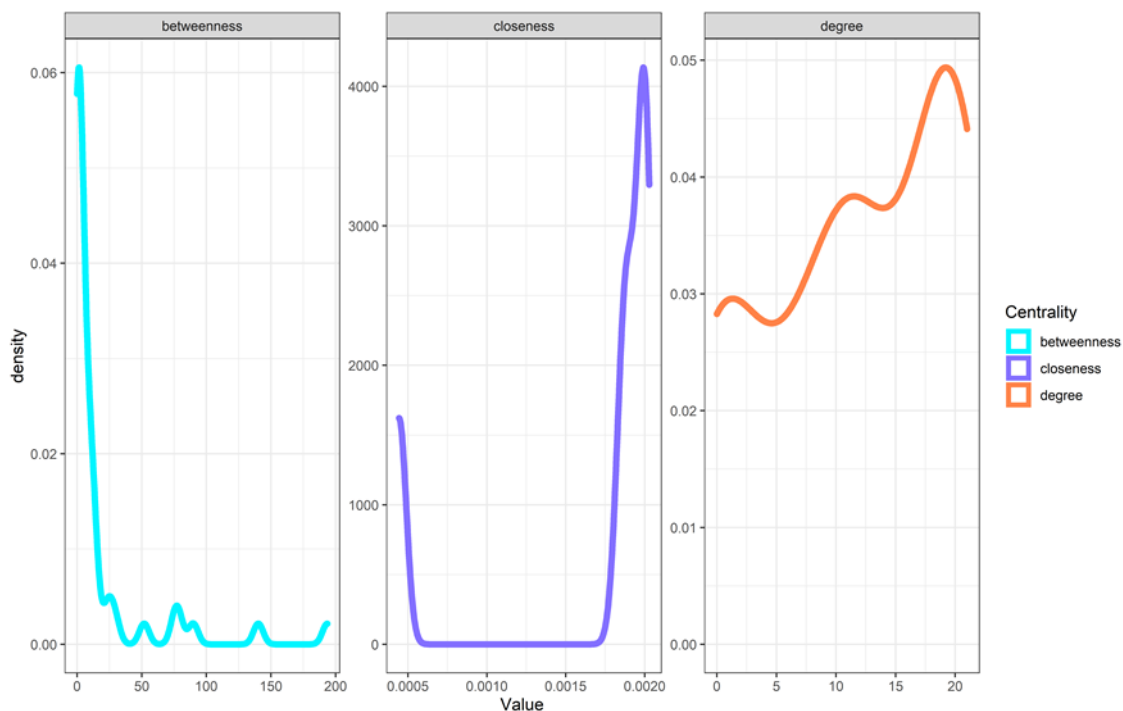


Figura 40 - Gráfico de densidades para as centralidades analisadas.

Utilizando o aplicativo MCODE do Cytoscape foi possível encontramos clusters na rede de correlação. Foram obtidos 2 clusters, o primeiro contendo 19 genes e 330 interações e o segundo com 13 genes e 134 interações. O primeiro cluster contém os seguintes genes: **CDK6, PI3K, CDK4, CDK2, P21, P15, IL1R, Hsa-mir-7, Hsa-mir-361, Hsa-mir-128, KI67, GRB2, FGFR4, FGFR3, FGFR2, FGFR1, SRC, COFILIN e SHC1**. O segundo cluster contém: **ROCK1, RHOC, OTX, INTEGRINB1, IL18R, ERK, BMPR2, BMPR1, ALP, VEGFR2, VEGFR1, SOS1 e RUNX2**. Já **AKT, ERBB3, ERBB4, FAK, OSTEOCALCINA, PDGFRB e TGFBR1** não fizeram parte de clusters embora apresentem interação na rede. A **Figura 41** contém a rede de correlação obtida colorida de acordo com a participação ou não em clusters.

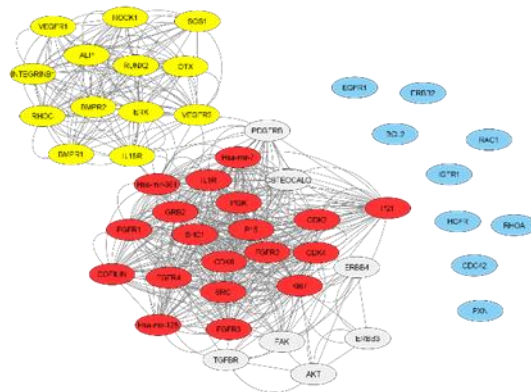


Figura 41 - Rede de correlação obtida. Genes relativos ao cluster 1 foram coloridos em vermelho, do cluster 2 em amarelo, genes da rede que não fizeram parte de clusters foram coloridos em branco e gene sem interações foram coloridos em azul.

O processo de randomização de redes foi utilizado para a comparação da rede de correlação gerada. Este processo consistiu em gerar 1000 redes aleatórias com o número de vértices igual e densidade de arestas aproximadamente igual ao da rede de correlação (Vértices = 48/Densidade = 0.25). O método para gerar as redes escolhido foi o de Erdos & Renyi (ERDÖS; RÉNYI, 1959). Em seguida foram calculadas as médias dos caminhos para as 1000 redes aleatórias e para a rede de correção. Por fim, foi utilizado um histograma para a determinação de quantas redes aleatórias têm um comprimento médio do caminho maior ou menor do que o comprimento médio do caminho da rede original. A **Figura 42** contém o histograma obtido pelo processo de randomização, a linha tracejada demonstra o valor obtido em nossa rede de correlação.

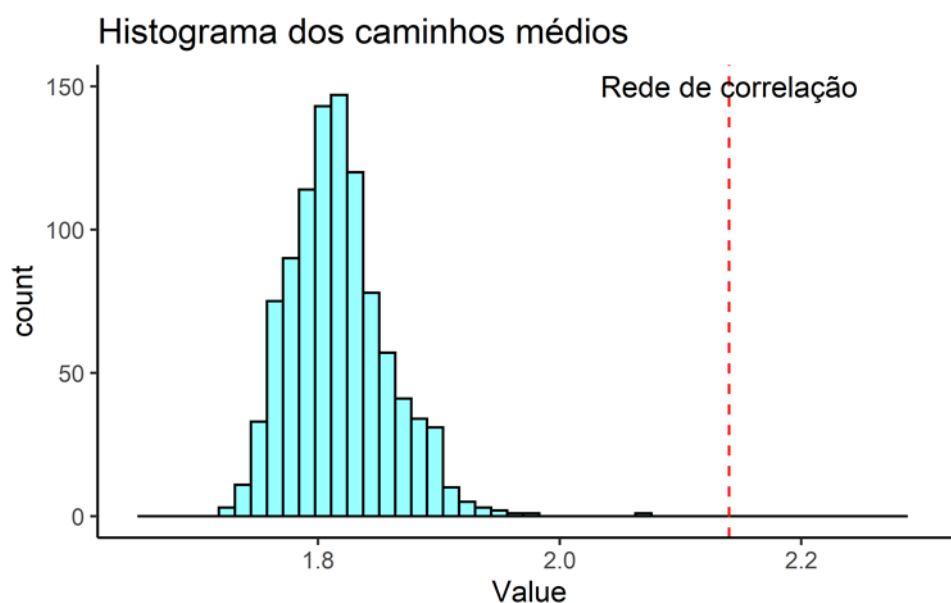


Figura 42 - Histograma dos caminhos médios obtidos pelo processo de randomização.

Os genes encontrados em cada cluster foram então utilizados para análise de enriquecimento funcional utilizando a ferramenta *DAVIDtools*. Foram realizadas análises de ontologias para processos biológicos (**BP**: *biological process*) e funções moleculares (**MF**: *molecular functions*) e para vias de sinalização com *KEGG pathway*. As figuras **Figura 43**, **Figura 44** e **Figura 45** contêm resultados para o Cluster 1 enquanto as figuras **Figura 46**, **Figura 47** e **Figura 48** contêm gráfico de barras dos resultados obtidos pela análise de enriquecimento funcional para os genes do Cluster 2.

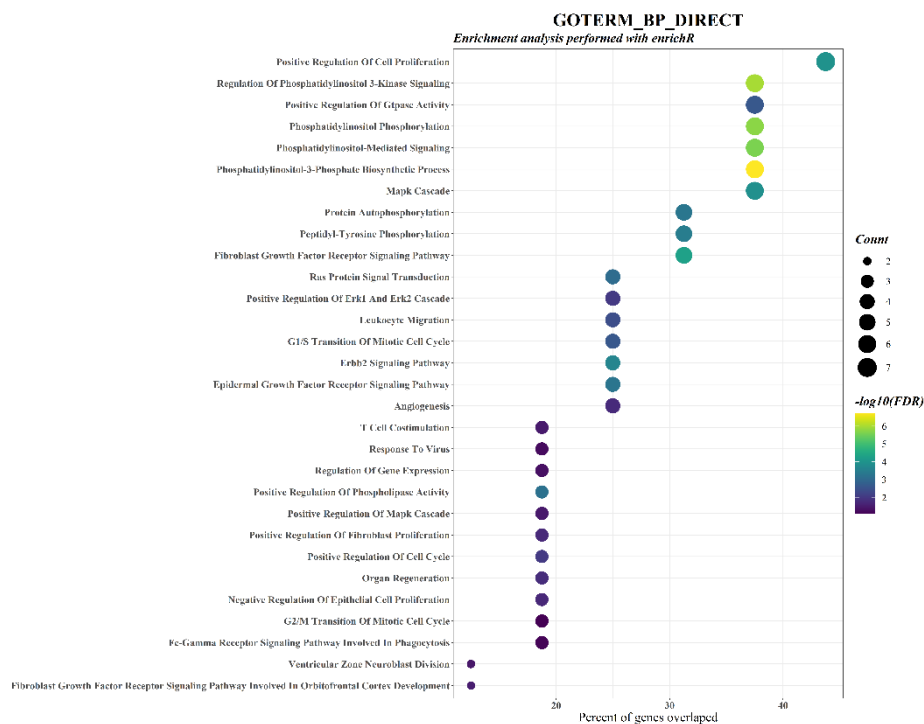


Figura 43 - Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos dos genes encontrados no Cluster 1.

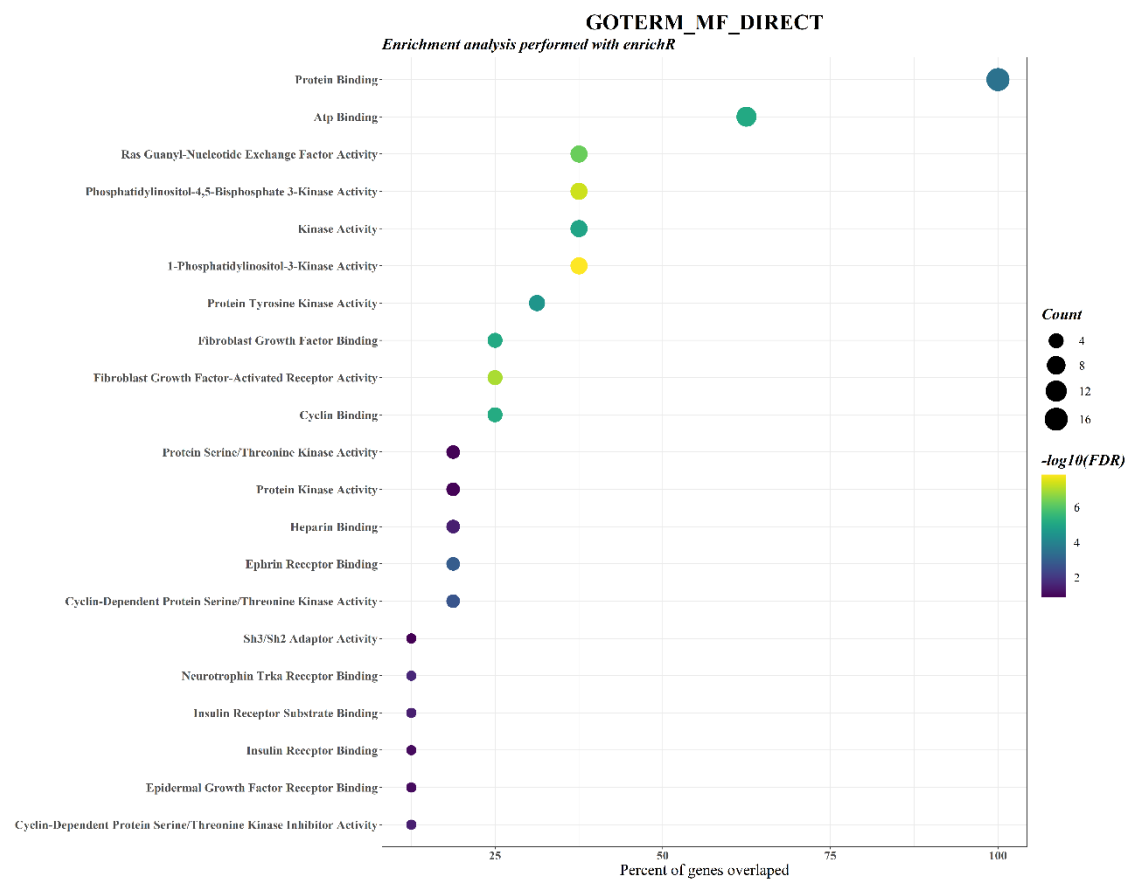


Figura 44 - Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares dos genes encontrados no Cluster 1.

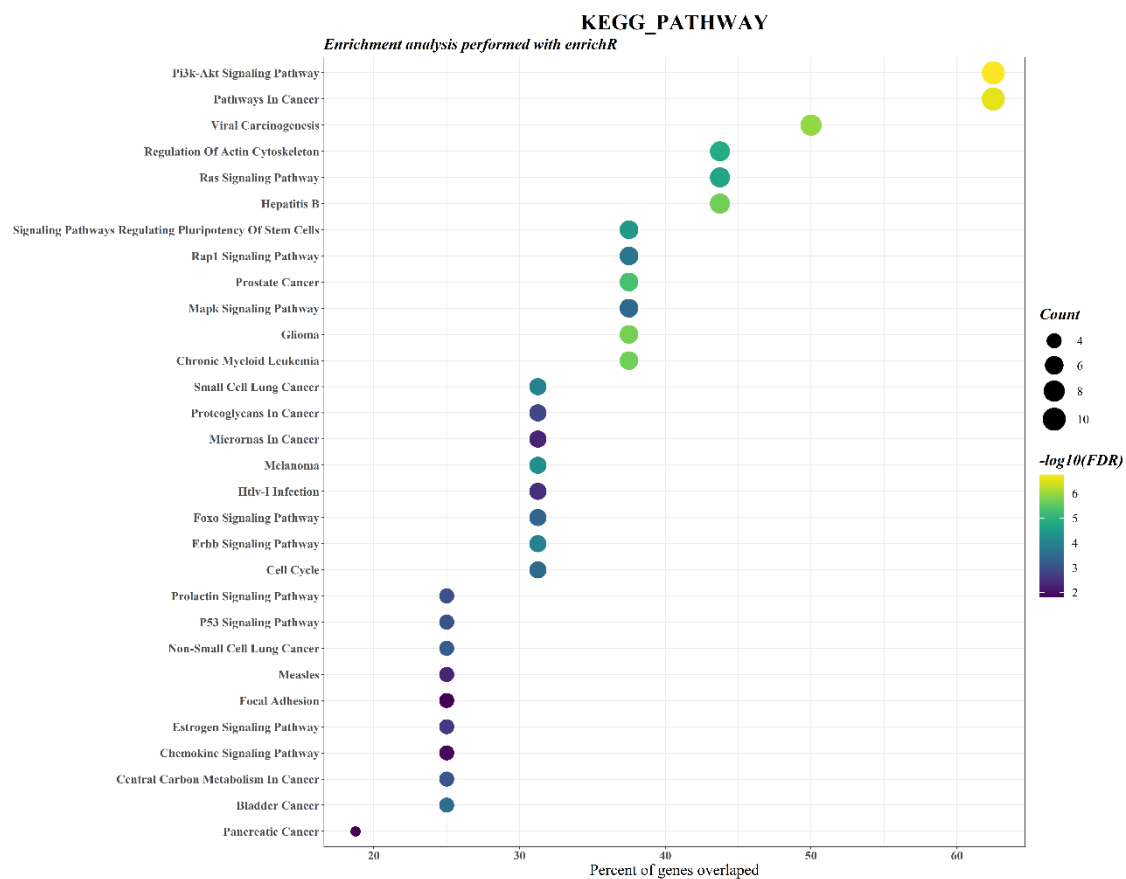


Figura 45- Análise de enriquecimento funcional de vias de sinalização para os genes encontrados no Cluster 1.

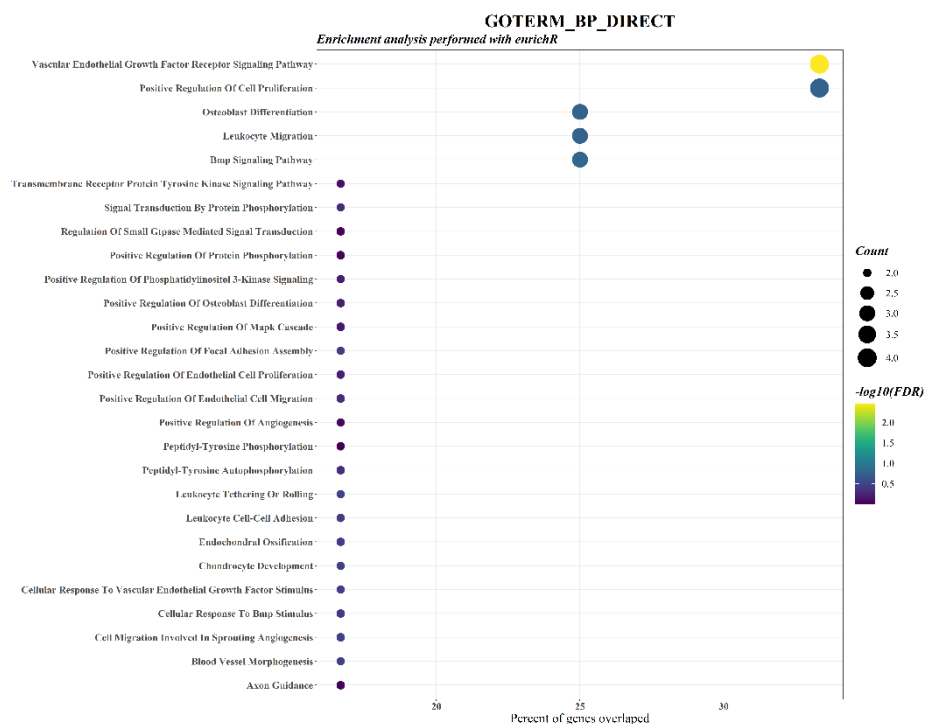


Figura 46 - Análise de enriquecimento funcional de processos biológicos dos genes encontrados no Cluster 2.

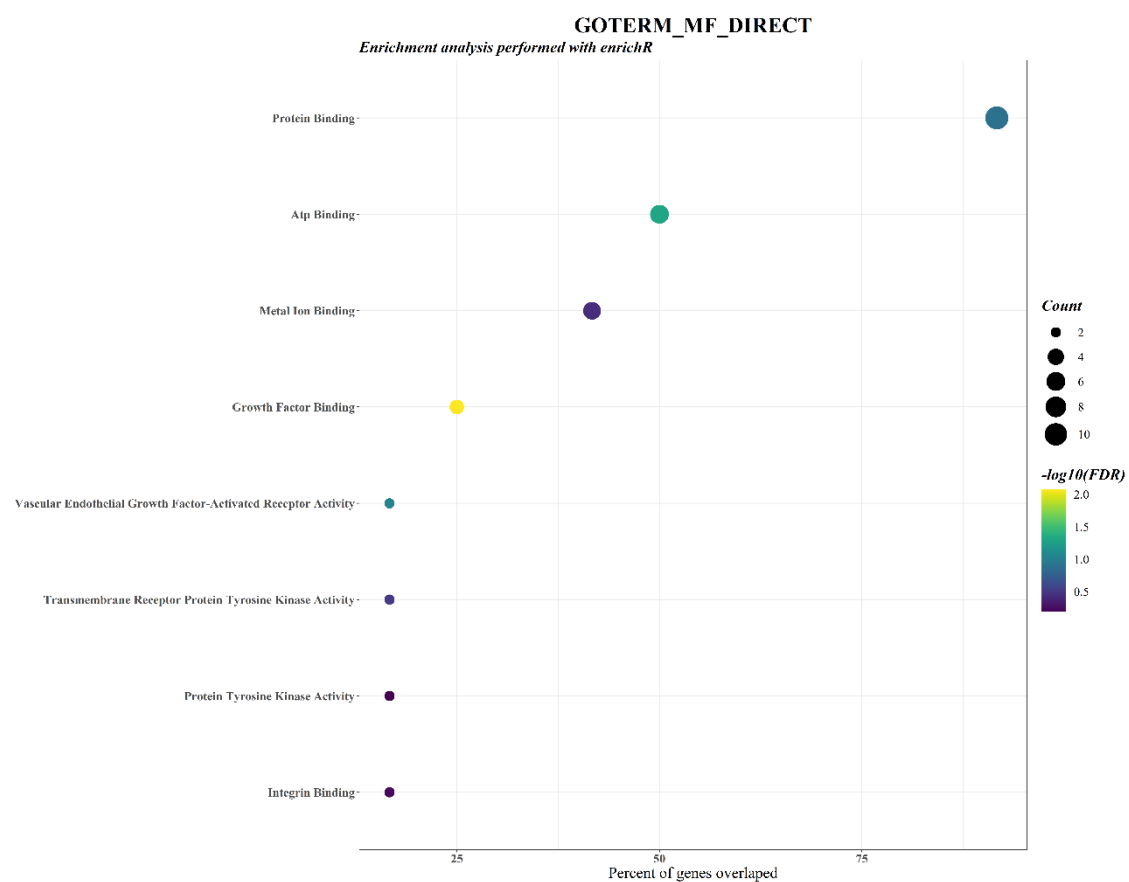


Figura 47 - Análise de enriquecimento funcional de funções moleculares dos genes encontrados no Cluster 2.

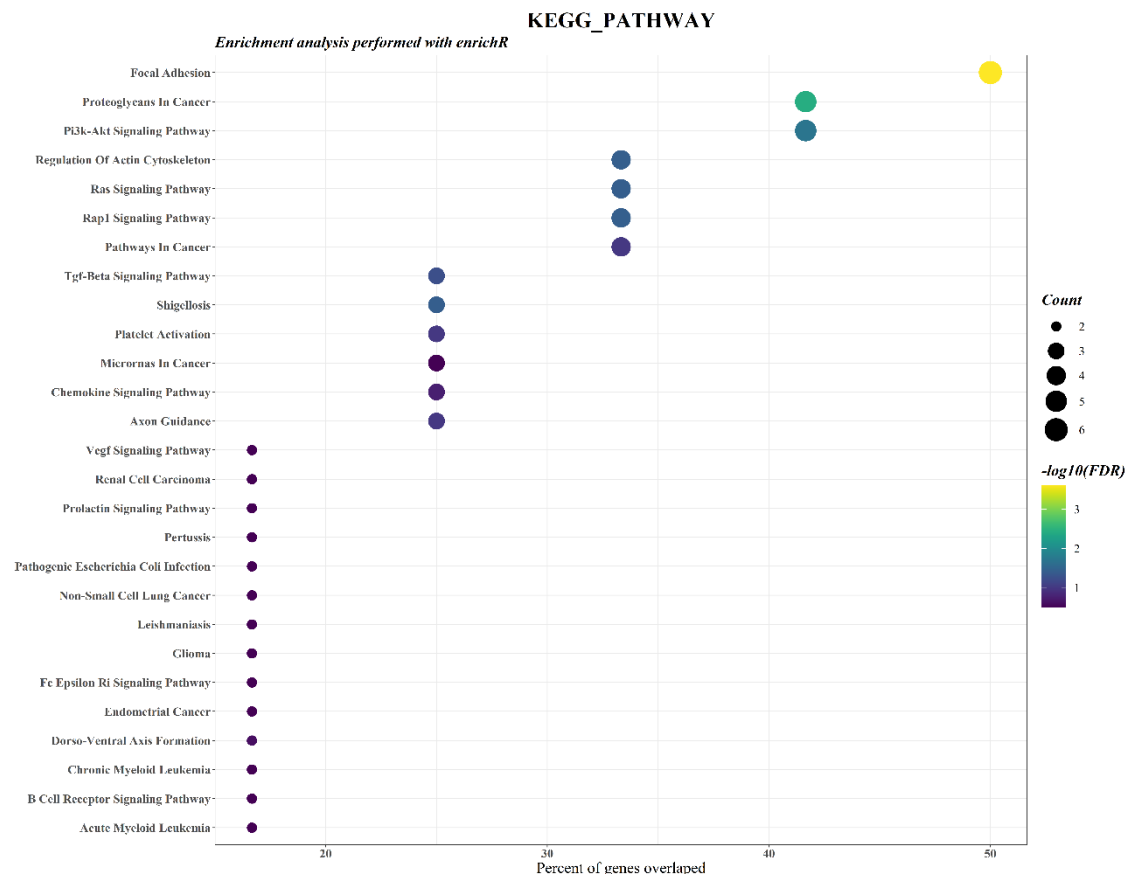


Figura 48 - Análise de enriquecimento funcional de vias de sinalização para os genes encontrados no Cluster 2.

4.4 Discussão

PRP vem sendo proposto como alternativa no tratamento de lesões ósseas devido ao diverso conteúdo de biomoléculas ativas como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, miRNAs, hormônios e íons (BOILARD; DUCHEZ; BRISSON, 2015; FERREIRA; ZAMBUZZI, 2020). Múltiplos estudos clínicos foram desenvolvidos demonstrando eficácia do tratamento utilizando PRP, porém há uma falta de estudos que demonstrem seu efeito na maquinaria molecular das células. Neste capítulo investigamos o a modulação de vias de sinalização celular clássicas pelo efeito de PRP líquido e liofilizado, em um modelo de osteodiferenciação em períodos iniciais, utilizando expressão gênica relativa e técnica de bioinformática.

O processo de modulação celular causado pelo efeito do tratamento com PRP começa na membrana celular, onde existem receptores especializados para os diferentes fatores de crescimentos e citocinas presentes no PRP (AMABLE et al., 2013; MARX et al., 1998). São estes receptores que iniciam a cascata de sinalização celular alterando toda sua performance e a contextualizando com o seu novo ambiente (AGHAJANOVA et al., 2018). Viabilidade, proliferação e adesão celular são processos biológicos amplamente estudados e desejados no contexto de regeneração tecidual (DIMITRIOU et al., 2011; WALMSLEY et al., 2016). Para a

engenharia de tecido ósseo, é importante o potencial de indução da osteogênese pelo tratamento (GIACOMO; CATALDI; SANCILIO, 2020; LEE et al., 2019b).

Para elucidação do complexo mapa molecular obtido utilizamos técnicas de bioinformática com PCA e redes de correlação. PCA é uma técnica de redução de dimensionalidade amplamente utilizada na análise de largos conjuntos de dados para a simplificação da análise (SELL et al., 2020). Através da PCA foi possível agruparmos nossas amostras e comparar os grupos analisados neste trabalho. Os dois componentes principais foram capazes de explicar 73,9% da variância dos valores de expressão obtidos. O primeiro componente (49,8%) agrupou os grupos tratados durante 7 com PRP e Liofilizado junto ao grupo tratado com meio osteoindutor, também por 7 dias. Genes como os referentes ao controle do ciclo celular, proliferação e adesão/remodelamento do citoesqueleto foram observados com alta contribuição para este componente. Observando que grupos tratados em 7 dias apresentaram diferenças antagônicas em relação ao PC1 quando comparados aos grupos em 24 horas, os efeitos de tratamentos com PRP e Liofilizado foram capazes de modular o ciclo celular impactando na sobrevivência e proliferação celular. De fato, os genes investigados para aferição do comportamento do ciclo celular apresentaram um aumento em sua expressão em 7 dias. Nos últimos anos nosso grupo tem investigado a expressão desses genes como gatilho para eventos biológicos de interesse, uma vez que estes regulam fases de síntese de proteínas durante o ciclo celular (DA SILVA et al., 2020b; MACHADO et al., 2019).

Cofilina, FAK e SRC foram outro conjunto de genes a apresentar alta contribuição para PC1. FAK e SRC são proteínas transdutoras de sinais em diversos contextos biológicos, com especial destaque para a participação no complexo de adesão focal, onde após ativação de integrinas durante a adesão celular, FAK e SRC disparam vias de sobrevivência e proliferação (BEZERRA et al., 2017; DA SILVA et al., 2020b; ZAMBUZZI et al., 2011c). SRC apresentou um aumento em sua expressão nos grupos tratados em 7 dias, enquanto FAK apresentou apenas um efeito temporal no grupo tratado com PRP. Cofilina é uma proteína que atua diretamente no remodelamento dos filamentos de actina (MACHADO et al., 2019). Estes resultados indicam que os tratamentos com PRP e Liofilizado promovem um microambiente capaz de favorecer a adesão celular e possivelmente sua migração. Para testar esta hipótese investigamos a expressão de Rho-GTPases como RHOA, RHOC, ROCK1, RAC1 e CDC42, proteínas estas classicamente relacionadas ao remodelamento do citoesqueleto em diferentes processos biológicos (AIYELABEGAN; SADRODDINY, 2017; DA COSTA FERNANDES et al., 2018b; PARSONS; HORWITZ; SCHWARTZ, 2010; VEGA et al., 2011). Porém RHOA, RHOC e ROCK1 apresentaram maior contribuição para PC2, com elevada expressão no grupo tratado com meio osteoindutor em comparação aos grupos PRP e Liofilizado.

A participação de RHOA no comprometimento de células tronco mesenquimais com o fenótipo osteoblástico foi demonstrada por McBeath et al. (MCBEATH et al., 2004). A expressão de Rho-GPTases foi encontrada correlata com BMP2 e BMP4 levando a formação de tecido ósseo pelo grupo de Harmey et al. (HARMEY et al., 2004). RAC1, que é descrita como atuante no processo de diferenciação osteoblástica, foi observada com alta expressão no grupo tratado pelo meio osteoindutor e baixa nos grupos tratados (HUCK et al., 2020).

Ainda sobre PC1 foram observados alta contribuição de receptores de FGF. A sinalização via FGF é descrita como importante para o desenvolvimento ósseo (MARIE; MIRAOU; SÉVEÈRE, 2012; PERRINE et al., 2019; SU; JIN; CHEN, 2014). GRB2 e SHC1, proteínas classicamente relacionadas a interação com receptores tirosina quinase (RTK), também foi observada contribuindo para PC1. A interação entre FGFRs e GRB2-SHC1 é reportada durante eventos da diferenciação osteoblástica e em condições patológicas do osso (CURTO et al., 1998; SU; JIN; CHEN, 2014; XIE et al., 2020b). PI3K que também apresentou contribuição para PC1 é relatada como ativada por GRB2 e SRC, levando a ativação da via PI3K/AKT/mTOR responsável pela sobrevivência, proliferação, diferenciação entre outras (CORN et al., 2013). Receptores de IL1 β e IL18 também apresentaram alta contribuição para PC1, exibindo um aumento na sua expressão nos grupos tratados. Essas proteínas participam do processo inflamatório que vem sendo explorado por nosso grupo como atuante no metabolismo de osteoblastos (DA S. FELTRAN et al., 2019; DA SILVA et al., 2020a; SARTORETTO et al., 2020).

O segundo componente principal foi capaz de explicar 24,1% da variância dos dados. Observando PC2 é possível ver a resposta antagônica entre os grupos tratados com PRP e Liofilizado por 7 dias ao compararmos com o grupo tratado com meio osteoindutor por 7 dias. Receptores de fatores de crescimento VEGF, TGF, HGF e BMP apresentaram alta contribuição para PC2 e diferenças na expressão na comparação entre os grupos tratados com PRP e Liofilizado e o grupo tratado com o meio osteoindutor. O aumento na expressão destes fatores é observado no processo de diferenciação osteoblástica (CARREIRA et al., 2015; CHEN et al., 2012; HU; OLSEN, 2016). ERBB4, um receptor tirosina quinase da família de EGF1, também foi observado como contribuindo para PC2. Poucos estudos relacionam a expressão de ERBBs durante a diferenciação osteoblástica, em especial ERBB4. Li et al., encontrou que ERBB4 foi capaz de ampliar a migração e crescimento celular de células de osteosarcoma, modulando a via PI3K-AKT (LI et al., 2020). O efeito na migração e proliferação em células de osteosarcoma causado por ERBB4 também foi descrito por Geryk-Hall & Hughes (GERYK-HALL; HUGHES, 2009). Dentre os marcadores da diferenciação osteoblástica analisados RUNX2, Osterix (SP7) e ALPL apresentaram contribuições para PC2, enquanto Osteocalcina (BGLAP) apresentou para PC1. RUNX2 e Osterix são fatores de transcrição amplamente relacionados a osteogênese (ASSIS et

al., 2021; DA SILVA et al., 2019b; KANG et al., 2018). ALPL por sua vez é uma proteína de membrana que atua mineralização da matriz extracelular, sendo amplamente estudada como marcador da diferenciação osteoblástica (BEZERRA et al., 2017; DA SILVA et al., 2019b, 2020b).

A osteogênese como efeito do tratamento com PRP vem sendo estudada em modelos *in vitro*, *in vivo* e em alguns ensaios clínicos com foco em análises histológicas e de proliferação celular, com poucos estudos abordando a expressão gênica como resposta ao tratamento (KASTEN et al., 2006; WANG et al., 2019; YU et al., 2017; ZOU et al., 2014). Os estudos que utilizam de expressão gênica focam nos genes marcadores da osteogênese como RUNX2, Osterix, Osteocalcina, Osteopontina e Colágeno, com uma lacuna de trabalhos reportando modulação de outras vias clássicas. Xie et al. avaliaram o efeito de PRP e seu liofilizado na osteogênese de células tronco de medula óssea obtidas de coelho. Os genes investigados ALP, Osteocalcina e BMP2 nos tempos 1,3,6 e 9 dias apresentaram modulação em sua expressão com diminuição ao longo deste período (XIE et al., 2020a). Os autores realizaram também marcações de vermelho de alizarina e de fosfatase alcalina onde observaram aumento na mineralização ao longo no tempo nos grupos tratados com liofilizado. Embora os autores clamem o efeito do tratamento de PRP e Liofilizado na osteogênese, faltam dados da expressão de fatores de transcrição RUNX2 e Osterix para melhor avaliação. Todavia, os resultados indicam um aumento na proliferação e mineralização como efeito do tratamento.

Em nosso trabalho publicado no **capítulo 2** investigamos utilizando bioinformática a possibilidade de miRNA's carregados por plaquetas modularem a osteogênese. O conteúdo de miRNA's em plaquetas vem ganhando destaque nos últimos anos com especial destaque para processos patológicos (DAHIYA et al., 2015; FERREIRA; ZAMBUZZI, 2020; KRAMMER; MAYR; HACKL, 2020). Selecionamos 3 miRNAs para avaliarmos sua expressão em células MS ao serem tratadas com PRP ou Liofilizado. É importante ressaltar que pela limitação de nosso modelo experimental não é possível afirmar que estes miRNA foram transferidos pelas plaquetas para as células MS, devendo ser colocado como uma expressão de origem endógena. hsa-miR-361, hsa-miR-128 e hsa-miR-7 tiveram sua expressão aumentada pelos tratamentos. Poucos trabalhos na literatura investigaram a expressão destes miRNAs. hsa-miR-7 foi relatado como capaz de promover a osteogênese através da inibição da transcrição de CRY2 em um processo ativado pela via de STAT3 (TANG et al., 2020). hsa-miR-361 em mulheres com osteoporose pós-menopausa e em modelo animal de osteoporose (WANG et al., 2021). Zhang et al. encontram que hsa-miR-128 é capaz de inibir a diferenciação osteoblastica em modelo utilizando ensaio *in sílico* e com células tronco de medula óssea (ZHANG et al., 2020). A elevada expressão deste pode se um fator dos níveis de expressão dos marcadores da diferenciação osteoblástica terem sido encontrados baixo em nossos tratamentos.

Redes de correlação são objetos matemáticos que vem sendo amplamente utilizado para a representação visual de dados ômicos (BATUSHANSKY; TOUBIANA; FAIT, 2016; BAUM; RAJAPAKSE; AZUAJE, 2019; JARDIM et al., 2019). Com ela é possível foi possível tratarmos relações entre os genes avaliados baseados em sua correlação. Utilizando randomização verificamos que nossa rede apresentou características distintas de redes com números de vértices o que evidencia que as relações biológicas por ela representadas são significativas. Os dois clusters obtidos apresentaram genes similares aos genes com contribuição significativa aos dois primeiros componentes principais e as funções biológicas encontradas nestes foram relacionados a vias PI3K-AKT, RAS e MAPK para o cluster 1 (similar ao PC1) e o cluster 2 apresentou estas somada as vias de VEGF e adesão focal. Os valores de centralidade reforçam o papel de ciclinas em nosso modelo, além de receptores de FGF e proteínas reguladoras da transdução de sinais como GRB2, SHC1 e SRC.

Ao todo nossos dados indicam um potencial no aumento da proliferação celular decorrente do efeito de PRP e Liofilizado em células tronco mesenquimal obtida de polpa de dente decíduo, contudo uma diminuição do potencial osteoindutor destes tratamentos nas mesmas.

4.5 Constatações

- PRP e liofilizado modularam genes estudados neste período;
- Comparados ao grupo meio osteoindutor, PRP e liofilizado apresentaram um perfil de expressão gênica distintos para os períodos estudados;
- Embora o perfil de expressão gênica obtido para os grupos PRP e liofilizado tenham sido similares, foram observadas diferenças entre alguns genes que podem ser explicadas pelo conteúdo proteico dos grupos. Este deverá ser mais bem elucidado com a realização da análise proteômica (shotgun);

Capítulo 5

Obtenção de um hidrogel a base de alginato
associado a PRP e fosfatos de cálcio

5.1 Resumo do capítulo

Com o aumento na expectativa de vida e na urbanização de nossas cidades, lesões ósseas se tornaram mais comuns e com elas veio o desafio em propor novos procedimentos para a regeneração do tecido no menor tempo possível, provendo maior qualidade de vida e impactando na saúde pública. Embora o tecido ósseo seja um tecido altamente dinâmico com boa capacidade de se regenerar, em caso de lesões mais severas 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, 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, neste capítulo buscamos a síntese de um biomaterial capaz de modular a performance óssea acelerando a regeneração tecidual. Alginato foi utilizado para a obtenção de um hidrogel. Foi realizada a síntese e caracterização de hidroxiapatita e fosfato tricálcio e em seguida foi estudada a incorporação deste num hidrogel de alginato junto a PRP. A citotoxicidade do biomaterial em células de pré-osteoblastos e macrófagos foi analisada e por fim RT-qPCR foi utilizada para averiguar a modulação de marcadores da fase inflamatória.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado

Ver item **3.2.1 Coleta de sangue e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP): líquido e liofilizado.**

5.2.2 Síntese de fosfato tricálcio

A síntese de fosfato tricálcio foi realizada por síntese de estado sólido (CICEK et al., 2011). 0,20 mol de carbonato de cálcio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 0,40 mol de fosfato de cálcio bibásico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram misturados utilizando-se acetona como solvente. Após homogeneização da mistura por 30 minutos deixou-se a solução descansar *overnight*. O precipitado então foi seco em uma estufa por quatro horas a 80 °C. O pó seco foi levado em cadinhos de alumina (99%) e em seguida calcinadas por 1100 °C por seis horas (Rampa de temperatura de 15 °C por minuto). Ao final, o material foi transferido para estufa seca a 80°C para armazenagem.

5.2.3 Síntese de hidroxiapatita

Hidroxiapatita foi sintetizada utilizando método de co-precipitação. 30 mM de Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram mantidos em agitação enquanto 50 mM de CaCl_2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram gotejados. Após o gotejamento a solução foi mantida em agitação por 30 minutos para otimização da reação entre íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Em seguida a solução foi centrifugada a 4000 RPM por 15 minutos a temperatura ambiente e a fase líquida descartada. A fase sólida foi então lavada utilizando água milli-q e agitador orbital por 1 hora. Ao final as soluções foram novamente centrifugadas e a fase sólida transferida para estufa a 80 ° C. Foi estudado o efeito do tratamento térmico nas hidroxiapatitas nos tempos 2 horas, 3 horas e 4 horas nas temperaturas de 900 ° C, 1000 ° C e 1100 ° C.

5.2.4 Construção de hidrogéis

Hidrogéis foram obtidos a partir do método descrito por Demirtas et. al. com algumas modificações (DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017). Alginato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi diluído em PBS (pH 7,4) na concentração de 3% (massa/volume). CaSO_4 1% (massa/volume) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionado à solução para início do processo de reticulação do alginato na proporção de 2:1 (Alginato: CaSO_4). Essa solução foi homogeneizada utilizando uma seringa através do processo de agitação. Em seguida foram adicionados 20 mg por mL de **HAp** ou **TCP** e novamente homogeneizados exaustivamente utilizando uma seringa. 10 mL de solução foram despejadas em solução de CaCl_2 1M para reticulação total.

Hidrogéis de PRP foram obtidos utilizando uma solução de 50 mg de liofilizado de PRP diluídos em 5 mL de água ultrapura. Esse foram diluídos na solução de Alginato nas proporções de 1:1, 3:2, 4:1, 3:1 e 9:1(Alginato:PRPLiofilizado) além da solução com apenas alginato. 1 mL destas concentrações foi pipetado em poço de placa de 24 poços e 2 mL de CaCl_2 20 mM foram adicionados para reticulação.

5.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).

Ver item **3.2.8 Espectroscopia na região do infravermelho médio com transformada de Fourier (FTIR).**

5.2.6 Difratometria de raios-x

Os padrões de difração de raios-X em pó (DRX) foram coletados por meio de um difratômetro de bancada (MiniFlex de 6ª geração, Rigaku), aplicando radiação $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 1,5406$

Å; 40 kV; 15 mA), na faixa de 5 a 80°, com taxa de 4° min⁻¹ e um tamanho de passo de 0,04°. Previamente à análise, as amostras serão posicionadas em suportes para amostras de fundo zero.

5.2.7 Cultura celular

Células MC3T3-E1 foram cultivadas em meio de cultura alfa-MEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) e células Raw 264.7 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com soro fetal bovino (10 %), antibiótico e antimicótico, e mantidas em estufa úmida a 37 ° C e 5 % de CO₂. Meio osteoindutor foi produzido suplementado o meio de cultura com 50 µg/ml de fosfato de ácido L-ascórbico, 10 mM de β-glicerofostato e 100 nM de dexametasona.

5.2.8 Ensaio de citotoxicidade

Hidrogeis de alginato com PRP e HAP ou TCP foram utilizados para condicionamento do meio de cultura por 24 horas conforme a ISO10993-12. A citotoxicidade do meio condicionado com foi avaliada utilizando o ensaio de MTT. Meio de cultura sem tratamento foi utilizado como controle. Células MS foram semeadas a 5 × 10⁴ células por mL em placas de 96 poços. Após 24 horas as células foram tratadas por adicionais 24 horas, quando o meio foi coletado e outro meio contendo o MTT foi adicionado. Após 4 horas, o meio contendo MTT foi retirado e o formazan formado foi diluído em DMSO, o qual foi medido em microleitor de placas a absorbância de 570 nm.

5.2.9 Expressão gênica relativa

Células MC3T3 e Raw 264.7 foram semeadas a 5 × 10⁴ células por mL em placas de 6 poços. Após tratamento, as células foram coletadas, homogeneizadas em TRIzol® e armazenadas em biofreezer a -80 °C. Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 (≥ 1,8) e OD 260/230 (≥ 1,0) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs extraídos, realizada com kit SuperScript First Strand. As reações para o estudo do padrão de expressão dos possíveis genes foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (Primers) mostrados na **Tabela 10**. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo 2^{-ΔΔCt}, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 experimento independentes realizados em duplicata e como o controle interno, o gene GAPDH.

Tabela 10 - Lista de sequencias de primers utilizadas neste capítulo.

Gene	Forward	Reverse
Cdk2 (12566)	TACCCAGTACTGCCATCCGA	CGGGTCACCATTTCAGCAAA
Cdk4 (12567)	TCGATATGAACCCGTGGCTG	TTCTCACTCTGCGTCGCTTT
Cdk6 (12571)	TTCTCACTCTGCGTCGCTTT	CGCCGATCAGCAGTATGAGT
P21 (12575)	CGCCCGATCAGCAGTATGAGT	GCCGGGCTCTGGAACCTTTAT
Tnfa (21926)	CCACATCTCCCTCCAGAAAA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
Nfkb (18033)	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC	GGTTCAGGAGCTGCTGAAAC
Il1r1 (16177)	ACCCCATATCAGCGGACCG	TTGCTTCCCCCGGAACGTAT
Myd88 (17874)	ATGGTGGTGGTTGTTTCTGACGA	GCAAGGGTTGGTATAGTCGCATATA
Il6 (16193)	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	CAGAATTGCCATTGCACAAC
Il18 (16173)	ACTTTGGCCCGACTTCACTGT	GGGTTCACTGGCACTTTGAT
Il33 (77125)	CCTTCTCGCTGATTCCAAG	CCGTTACGGATATGGTGGTC
Nrlp3 (216799)	ATTACCCGCCCGAGAAAGG	TCGCAGCAAAGATCCACACAG
Gapdh (14433)	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	TGCCTGCTTCACCACCTTCT
NOS1 (nNOS) (18125)	TACTCCATCAGCTCCTCTCCA	GGATGTCAAATTGTCGCTGTT
NOS2 (iNOS) (18126)	CAGCTGGGCTGTACAAACCT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
NOS3 (eNOS) (18127)	AAGCCGCATACGCACCCAGAG	TGGGGTACCGCTGCTGGGAGG
Asc1 (104385)	AGACATGGGCTTACAGGA	CTCCCTCATCTTGTCTTGG
Tlr4 (21898)	AAACTCAGCAAAGTCCCTGATGAC	CGTAGAAACTGTAAGTCGTTGACAG
Casp1 (12362)	TGAAAGAGGTGAAAGAATT	TCTCCAAGACACATTATCT
P15 (12579)	GGGCAAGTGGAGACGGTG	ACCCCGCTACCTGGATT
Il10 (16153)	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TTTTCACAGGGGAGAAATCG
Vegfr1 (14254)	GAGCTAAAAATCTTGACCCACATTG	CAGTATTCAACAATCACCATCAGAG
Vegfr2 (16542)	AGCTCTCCGTGGATCTGAAA	TAAGGGCATGGAGTTCTTGG

5.2.10 Análise dos dados

Gráficos e testes estatísticos foram realizados nos programas Graphpad Prism7, OriginLab 8.5 e no ambiente R com pacotes base e tidyverse. Diferenças significativas entre os

grupos estudados foram verificadas empregando-se a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a diferença estatística foi significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre os grupos estudados. Os valores significativos serão considerados para $P < 0,05$.

5.3 Resultados

5.3.1 Caracterização de HAp e TCP

Foram sintetizadas hidroxiapatita (**HAp**) e fosfato tricálcio (**TCP**), estas com capacidade de osteointegração bem estudadas. **HAp** foi sintetizada através método de co-precipitação utilizando soluções aquosas Na_2HPO_4 30 mM e CaCl_2 50 mM. Essa estequiometria foi pensada para obtermos uma matriz com razão cálcio-fosforo de 1,66, característica de **HAp**. A solução de Na_2HPO_4 foi mantida e sob agitação enquanto a solução de CaCl_2 foi gotejada a uma vazão de, aproximadamente, 2 gotas por segundo. O intuito de utilizarmos gotejamento foi promover a síntese de partículas de menor dimensão. Imediatamente após o início do gotejamento foi observado mudança no aspecto da solução, sendo notada uma turgidez do meio devido ao princípio da precipitação de **HAp** na solução. Após o término do gotejamento deixamos a solução por 30 minutos em agitação para otimização da reação de íons livres em solução. Em seguida a solução foi centrifugada por 15 minutos, lavada por 1 hora para a remoção de sais utilizando um agitador orbital e finalmente centrifugada por mais 15 minutos. Nossa síntese foi pensada para ter como produto, além de **HAp**, um resíduo de NaCl este com alta solubilidade em água, assim sendo removido pelo processo de lavagem. As **HAp** foram mantidas em estufa a 80 °C devido ao seu alto potencial higroscópico. Caracterização foi feita utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e difratometria de raios-x.

Difratometria de raios-x (DRX) foi utilizada para estudo da composição da síntese de **HAp** e **TCP**. Difratoograma de **HAp** indicou presença de fases amorfas. Para melhorar investigarmos e refinarmos a estrutura cristalina de **HAp**, realizamos tratamentos térmicos. Os tratamentos tiveram como tempos 2,3 e 4 horas e as temperaturas 900, 1000 e 1100 °C, com uma rampa de aquecimento de 15 °C por minuto. Os tratamentos a 1000 °C conseguiram já em 2 horas reduzir o número de pequenos picos na região de 2θ aproximadamente 25°~35°. Já tratamentos em 900 °C precisaram de 3 horas para a obtenção de resultados similares. Tratamentos com 1100 °C apresentaram picos distintos e com o aumento do tempo no tratamento foram observados novos picos no difratograma. Foi realizada a comparação das estruturas contidas em fichas catalográficas utilizando-se o software Search Match (Malvern Pananalytical). A **Tabela 11** contém as principais estruturas retornadas pela busca com a porcentagem de similaridade com nossa síntese. A **Figura 49** contém os difratogramas da síntese de **HAp** proveniente da síntese de co-precipitação (**A**) e com os tratamentos térmicos (**B**). Em trabalhos anteriores havíamos já

háviamos utilizado o tratamento de 1000 °C por 2 horas e visto que não apresentava citotoxicidade. A **Figura 50** contém o difratograma com identificação de picos. Picos marcados em vermelho foram detectados utilizando algoritmo automatizado do pacote *ggmisc* do R enquanto os azuis foram inseridos manualmente.

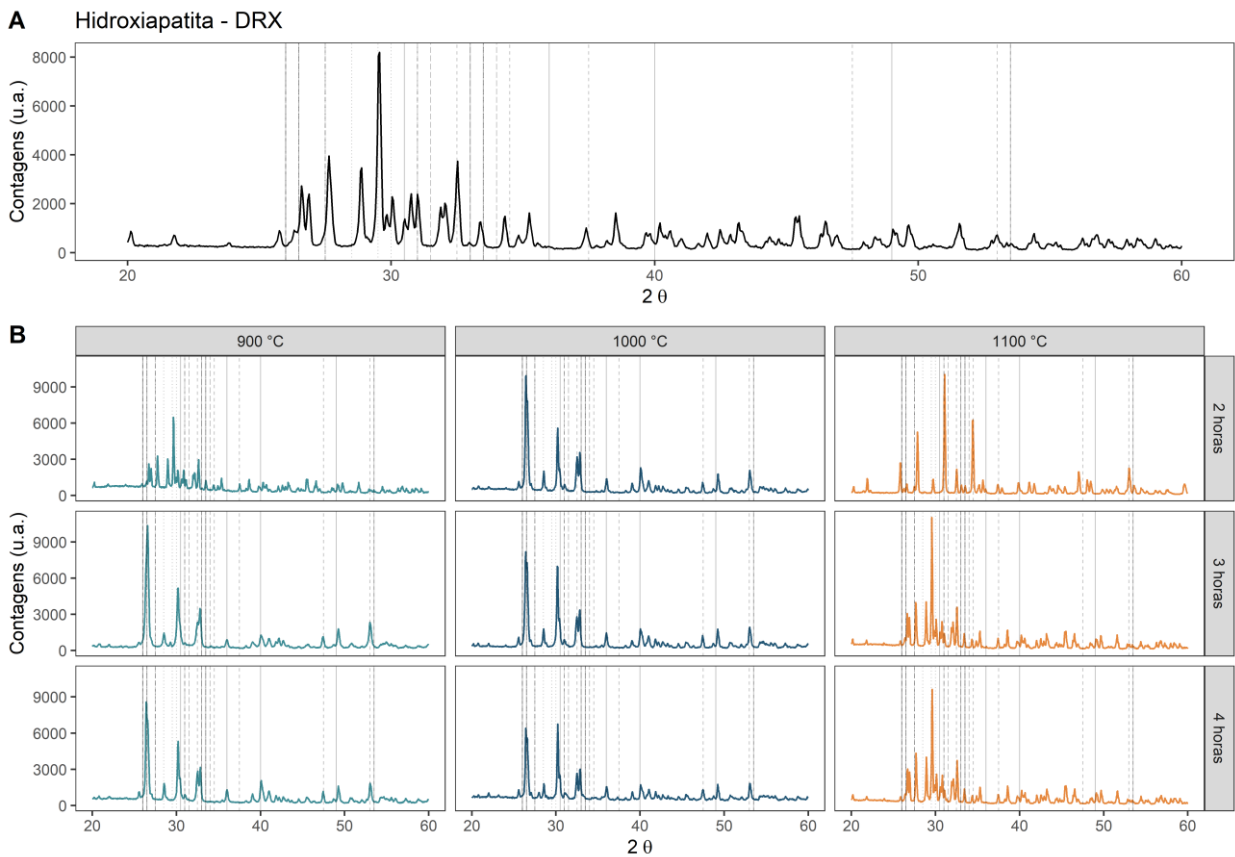


Figura 49 - Difratograma de hidroxiapatita. Após a análise da síntese (A) investigamos a variação no difratograma para os tempos 2, 3 e 4 horas nas temperaturas de 900 °C, 1000 °C e 1100 °C (B). Linhas verticais contém os principais picos para os materiais de referência: linha sólida monetita (PDF: 75-1520), tracejada beta fosfato de cálcio e cobre (PDF: 9-80), pontilhada beta fosfato tricalcio (PDF: 81-2257) e com traços longos hidrogenofosfato de cálcio hidratado (PDF: 74-1301).

Tabela 11 - Resultados de Search match para a comparação com fichas cristalográficas em bases de dados.

Síntese	Cristal referencia
HAp sintetizada	56% Monetita – PDF: 9-80 52% Monetita – PDF: 70-360
HAp – 2h – 900°	39% Beta Fosfato de cálcio e cobre – PDF: 48-1126 22% Monetita – PDF: 9-80
HAp – 3h – 900°	78% Beta Fosfato de Calcio – PDF: 81-2257 19% Monetita – PDF: 70-359
HAp – 4h – 900°	72% Beta Fosfato de Calcio – PDF:71-2123 25% Monetita – PDF: 89-5969
HAp – 2h –1000°	70% Beta Fosfato de Calcio – PDF: 81-2257 32% Monetita – PDF: 77-128
HAp – 3h – 1000°	24% Monetita – PDF: 75-1520 18%Hidrogenofosfato de cálcio hidratado – PDF: 74-1301

HAp – 4h – 1000°	72% Beta Fosfato de Calcio – PDF:71-2123 25% Monetita – PDF: 75-1520
HAp – 2h – 1100°	53% Beta Fosfato de cálcio e cobre – PDF: 48-1126 22% Monetita – PDF: 9-80
HAp – 3h – 1100°	59% Beta Fosfato de Calcio – PDF: 71-2123 24% Monetita – PDF: 89-5969
HAp – 4h – 1100°	71% Beta Fosfato de Calcio – PDF: 81-2257 27% Monetita – PDF: 75-1520

Hidroxiapatita - DRX

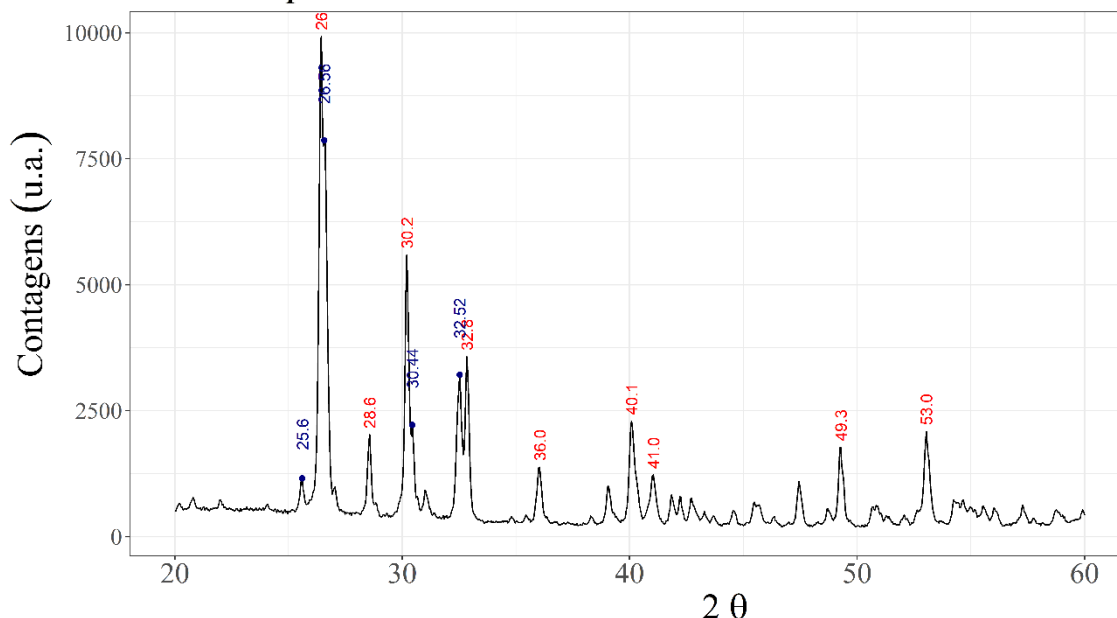


Figura 50 – Difratoograma de hidroxiapatita tratada termicamente por 2 horas a 1000 °C.

Com FTIR foi possível observar a presença de uma larga banda na região de na região de 1050 cm^{-1} e duas bandas em 540 cm^{-1} e 610 cm^{-1} , aproximadamente, essas bandas são referentes a vibração do grupo PO_4^{3-} e amplamente utilizadas como *fingerprint* de compostos fosfatos de cálcio, como a **HAp**. Foi observada também uma banda na região 1630 cm^{-1} , referente a vibração de OH^- , indicando a presença de água livre associada a **HAp**. A presença de uma banda em aproximadamente 860 cm^{-1} sugere a presença de CO_2^{3-} , que acreditamos ter se originado do ar atmosférico. A **Figura 51** contém o espectro de **HAp** em vermelho. Em seguida estudamos modificações resultantes da calcinação a 1000 °C por 2 horas. Para isso utilizamos uma mufla e realizamos a rampa de aquecimento a 5 graus por minuto. A calcinação tem como objetivo a produção de grãos maiores e mais cristalinos de **HAp**.

A após calcinado o espectro infravermelho da amostra foi obtido para comparação. As bandas na região de 1050 cm^{-1} , 540 cm^{-1} e 610 cm^{-1} , características de **HAp**, foram observadas sem variações para a amostra, como desejado. A banda de OH^- foi observada em 1630 cm^{-1} indicando que o aquecimento não modificou a associação de moléculas de água na estrutura cristalina. Não foi observada bandas na região de 860 cm^{-1} sugerindo a remoção do grupo CO_2^{3-} . Por fim foi observado em 730 cm^{-1} uma banda referente ao grupo P_2O_7 encontrada quando **HAp**

são submetidas a altas temperaturas. A **Figura 51** contém o espectro de **HAp** calcinada a 1000 °C em preto.

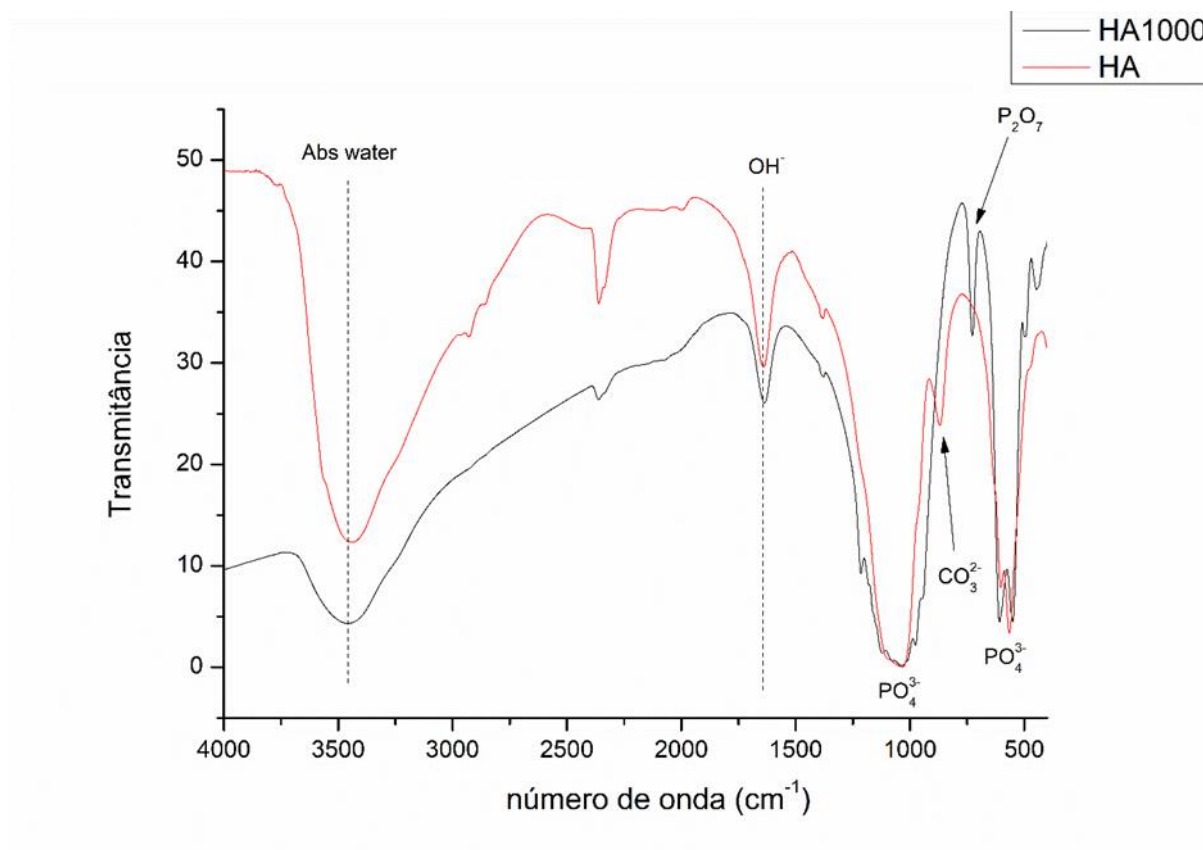


Figura 51 - FTIR hidroxiapatita sintetizada (HA) e após tratamento a 1000 °C por 2 horas (HA1000).

A síntese de **TCP** foi realizada utilizando síntese de estado sólido. Foram utilizados 0,4 mol de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,2 mol de CaCO_3 . Acetona foi utilizada como solvente para a homogeneização dos compostos. Em seguida a amostra foi colocada em cadinho de alumina e levada a uma mufla onde foi aquecida até 1100 °C (Rampa de aquecimento de 5 graus por minuto) por 6 horas. Após resfriada a amostra foi lavada em água milli-q por 1 hora, de modo similar as amostras de **HAp**. Ao término, a amostra foi centrifugada e mantida em estufa a 80 °C. **TCP** foi caracterizado também utilizando DRX e FTIR. A **Figura 52** contém o difratograma de **TCP** obtido em nossa síntese, conforme feito com o difratograma de **HAp**, os picos marcados em vermelho foram detectados utilizando algoritmo automatizado do pacote *ggmisc* do R enquanto os azuis foram inseridos posteriormente. Foi possível observar a presença de vários picos indicando a que a amostra contém mais de uma fase. Na comparação com fichas catalográficas obtivemos uma similaridade de 100% com a ficha de ICSD-6191, que é referente a beta-TCP.

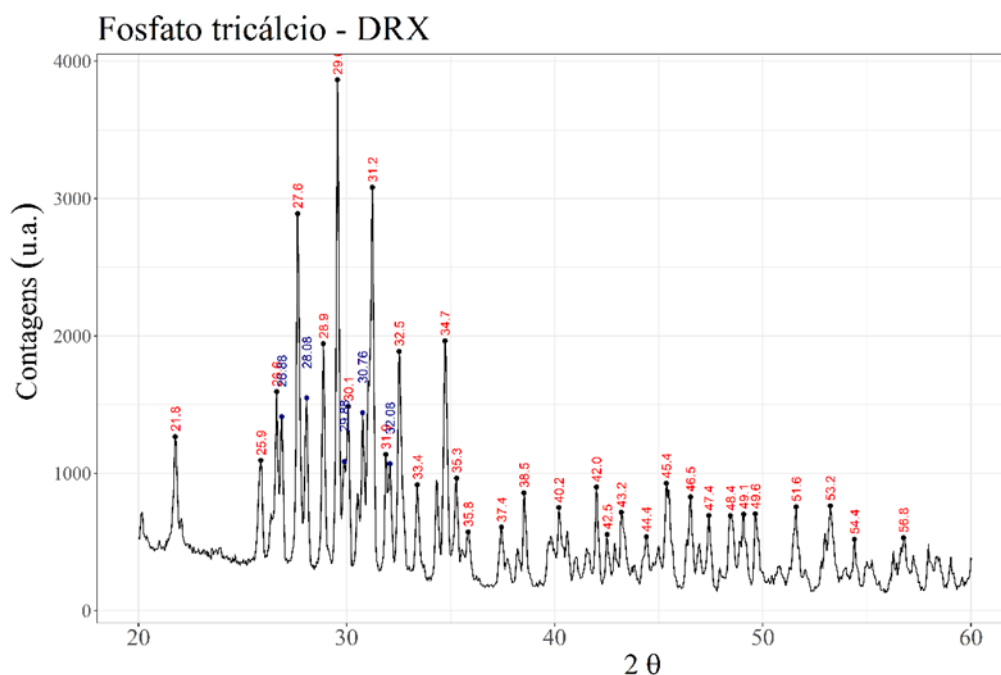


Figura 52 - Difratoograma de fosfato tricálcio.

Foram observadas duas bandas em 605 cm^{-1} e 545 cm^{-1} , além de uma larga banda na região de 1040 cm^{-1} . Como dito anteriormente para **HAp**, essas bandas são referentes a vibração de grupos PO_4^{3-} presentes na amostra e bandas características de amostras de **TCP**. Foram também observadas bandas em 1430 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} e 720 cm^{-1} , referentes aos grupos OH^- , CO_2^{3-} e P_2O_7 . A presença das bandas de CO_2^{3-} e P_2O_7 se devem ao processo de síntese escolhida. A banda de OH^- se deve, provavelmente, pelo fato de o sal de fosfato de cálcio utilizado ser dihidratado e durante o aquecimento a água pode ter sido deslocada para o interior da estrutura cristalina da amostra. A **Figura 53** contém o espectro de **TCP** obtido.

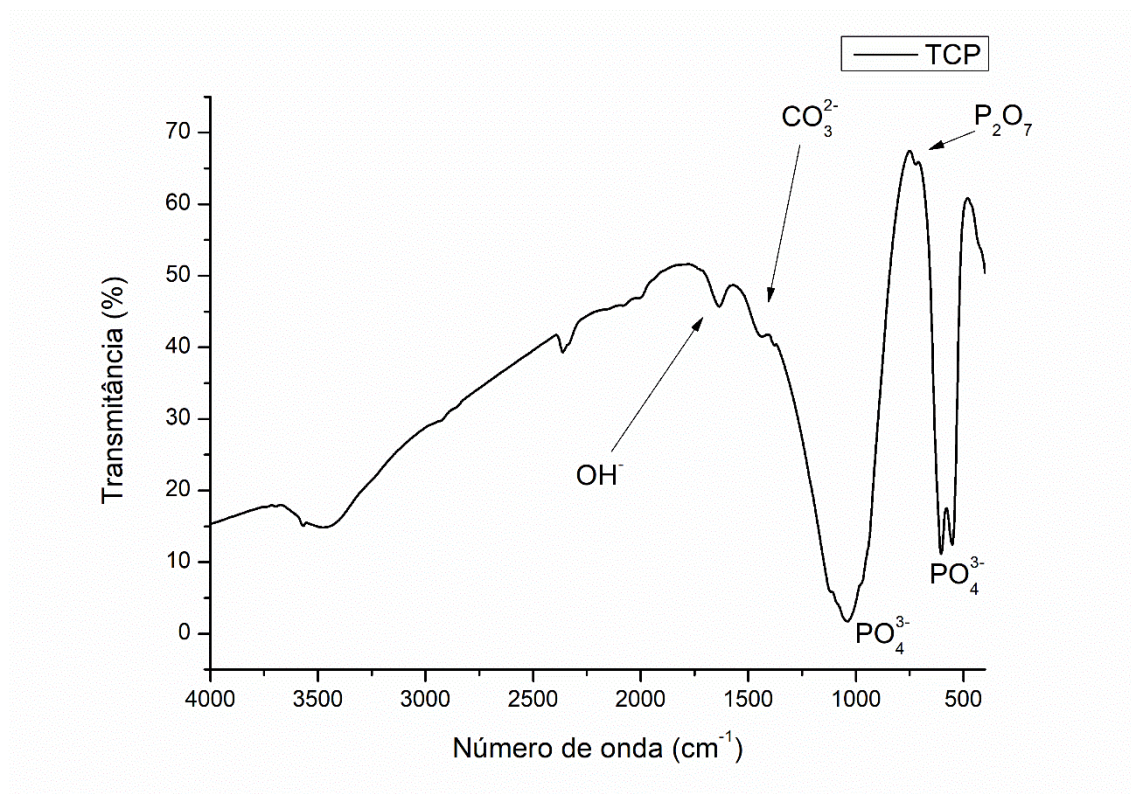


Figura 53 – Espectro infravermelho de TCP.

5.3.2 Construção de hidrogéis com HAp e TCP

A próxima etapa estudada foi a construção do compósito com as matrizes inorgânicas e **PRP**. Durante a pandemia com a impossibilidade de realizarmos coletas de **PRP** optamos por começar utilizando o PRP liofilizado que já tínhamos. Isso resultou em uma praticidade para a elaboração de nossa síntese que foi a possibilidade de trabalharmos com massa sabendo que a massa do liofilizado é proporcional a concentração de proteínas disponíveis ao ser solubilizado no meio. Alginato é um polímero abundante na natureza sendo encontrado como componente estrutural em algas marinhas marrons (phaeophyceae) e como polissacarídeo capsular em bactérias do solo (Hecht & Srebnik, 2016). De fórmula química $(C_6H_8O_6)_n$, alginato é composto por monômeros de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico, sendo estes conhecidos como blocos M e G, respectivamente, ligados por uma ligação β -1,4 (Doderio, Vicini, Alloisio, & Castellano, 2019; Hecht & Srebnik, 2016; Yoon, Oh, Jo, Lee, & Hwang, 2014).

Realizamos a síntese de um hidrogel de alginato com **HAp** e um com **TCP** seguindo o protocolo de Demirtas (DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017). Alginato foi dissolvido em PBS 7.4 (3% massa/volume) e em seguida misturada com uma solução de $CaSO_4$ (1%) na proporção de 2 partes de alginato para 1de $CaSO_4$ para ativar o processo de reticulação do alginato. Os autores utilizaram um sistema de mistura “three-way tap” para a homogeneização

da mistura, devido a não termos acesso a um equipamento desses utilizamos uma seringa e realizamos o procedimento de “up & down” até a soluções estarem satisfatoriamente homogêneas. Foram adicionados 20 mg de **HAp** ou **TCP** por mL da mistura de alginato/CaSO₄. Preparamos géis de 10 mL. As matrizes inorgânicas foram homogeneizadas pelo mesmo processo e em seguida despejadas em solução de CaCl₂ 20 mM onde foram mantidas *overnight* para a completa reticulação. A **Figura 54** contém as imagens dos hidrogéis para alginato com **HAp** e **TCP** respectivamente. Essas amostras foram congeladas a – 80 ° C e foram levadas para liofilização para podermos utilizar FTIR para estudarmos sua composição química.



Figura 54 - Gel de alginato com HAp e TCP. Vídeo da manufatura do gel <https://www.youtube.com/watch?v=1648xstSc4I>

A **Figura 55** contém os espectros de alginato (**SA**), **HAp** e do gel liofilizado de alginato com **HAp** (**SA+HAp**). As linhas tracejadas mostram bandas presentes em **SA+HAp** e em **SA** ou **HAp**. Foram observadas 6 bandas comuns, a banda marcada como **1** é presente entre **SA** e **SA+HAp** foi observada na região de 2930 cm⁻¹ é referente a vibração da ligação C-H, a banda marcada como **2** está na região de 1630 cm⁻¹ é relacionada a vibração de OH⁻¹ esta comum aos 3 grupos. Em **3** observamos na região de 1425 cm⁻¹ foi observada a vibração de C-H para os grupos **HAp+SA** e **SA**. Em 875 cm⁻¹ observamos bandas relacionadas ao grupo CO₂³⁻ nos grupos **HAp+SA** e **SA** essa banda marcada como **4**. A banda marcada como **5** foi observada em 750 cm⁻¹ para os grupos **HAp+SA** e **SA**. Essa banda pode ser relacionada a vibração da ligação entre C-Cl ou ainda C-H. Em **6** foi observada bandas para os grupos **HAp+SA** e **HAp** na região de 525 a 620 cm⁻¹, essas relacionadas a vibração do grupo PO₄³⁻. As mesmas 6 bandas foram observadas

para o grupo **TCP+SA**, diferindo apenas na intensidade relativa das mesmas. A **Figura 56** contém o espectro de **TCP+SA**, além dos espectros de **SA** e **TCP**. Os géis de **HAp+SA** e **TCP+SA** apresentaram também uma larga banda na região de 1025 cm^{-1} , essa região apresenta bandas em **HAp** e **TCP** sendo estas relacionadas a vibrações do grupo PO_4^{3-} características destes materiais, já **SA** apresenta bandas relacionadas a vibrações das ligações de grupos C=O , C=C , C-O e C-H . Esta região não foi destacada em nossas figuras pois ainda vamos estudar essas bandas utilizando deconvolução para melhor identificação das bandas.

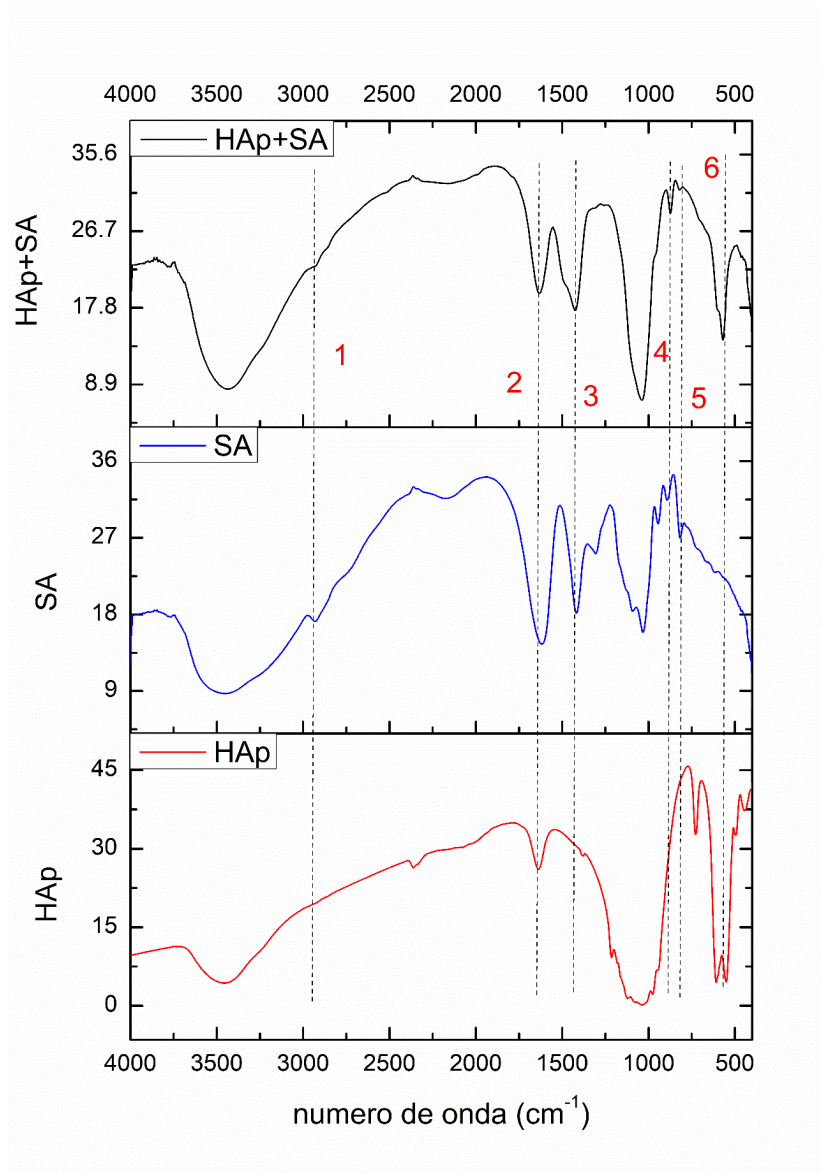


Figura 55 - Espectro de FTIR do gel de alginato com HAp.

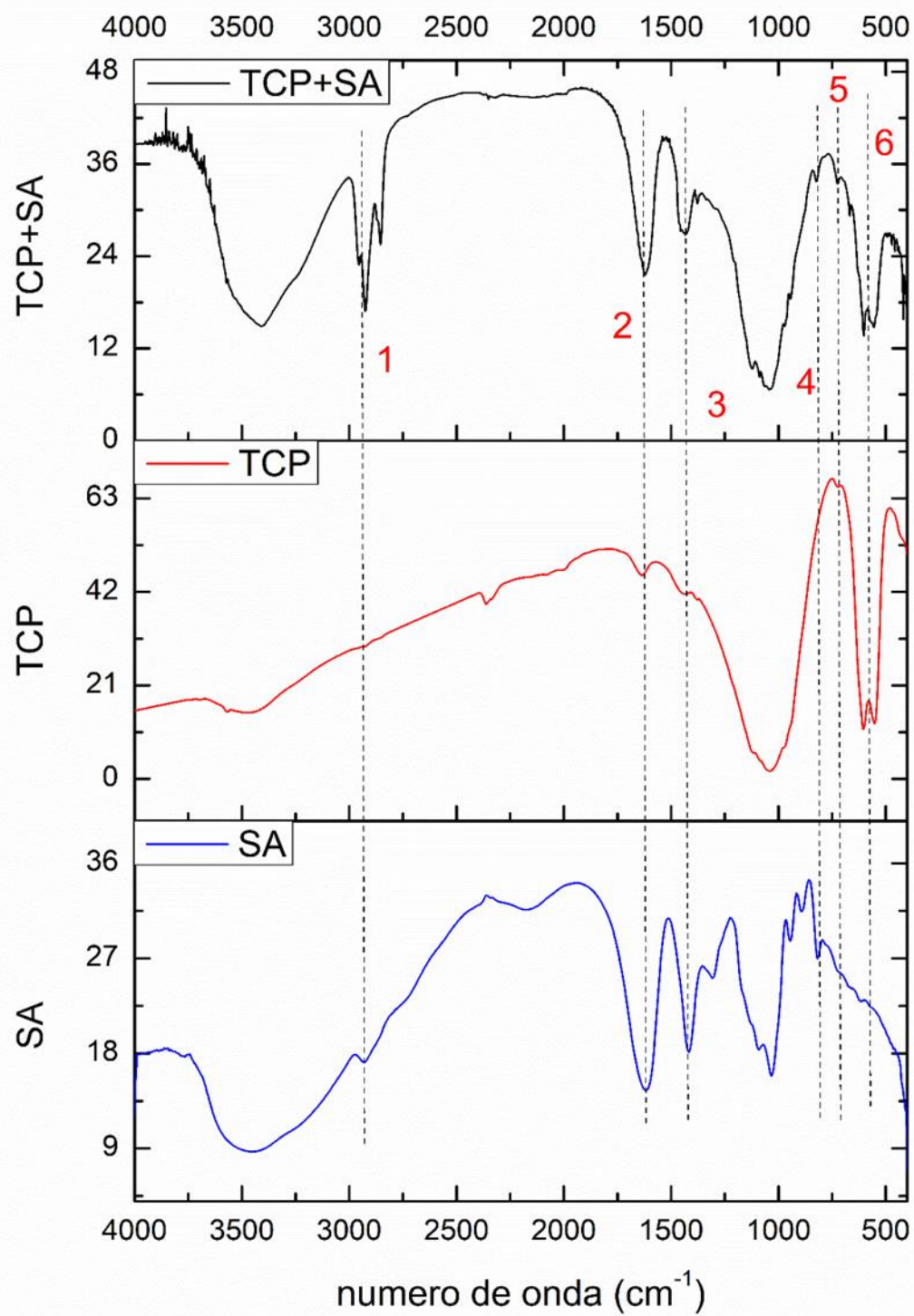


Figura 56 - Espectro de FTIR do gel de alginato com TCP.

5.3.3 Incorporação de PRP em géis de alginato

Construímos também hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP. Estes foram construídos da seguinte forma: 50 mg de liofilizado foi diluído em 5 mL de água milli-q (concentração padrão em nosso tratamento), a solução de alginato dessa vez foi preparada em água com uma concentração de 3 %. As soluções de alginato e liofilizado foram então misturadas nas seguintes proporções: 1:1, 3:2, 4:1, 3:1 e 9:1(Alginato:Liofilizado) além da solução com apenas alginato. Foram construídos hidrogéis de 1mL pipetando este volume em placa de 24 poços e em seguida adicionando 2 mL de 20 mM CaCl_2 para a reticulação do gel (**Figura 57**). Os hidrogéis foram construídos em triplicatas.



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).

Na sequência obtivemos os espectros para as 6 concentrações distintas do hidrogel. A **Figura 58** contém os espectros para as distintas proporções de hidrogéis construídas. Foram observadas nos hidrogéis com maiores concentrações de liofilizado bandas que havíamos observado do espectro do liofilizado apresentado no **capítulo 3**. Essas bandas, marcadas em setas vermelhas, são referentes a amins secundárias (1550 cm^{-1}), amins terciárias (1240 cm^{-1}) e vibração do grupo PO_4^{3-} (1075 cm^{-1}). Também havíamos identificados em 1650 cm^{-1} , relativos a amins primárias, e em 1400 cm^{-1} , relativo ao ácido carboxílico no **capítulo 3**. Essas bandas estão presentes em nossos hidrogéis mas como também é possível observamos bandas no alginato para essas regiões devemos utilizar deconvolução para melhor estudar as bandas. De todo modo, os

presentes resultados indicam ocorreu que o encapsulamento do liofilizado pelo alginato em nossos hidrogéis.

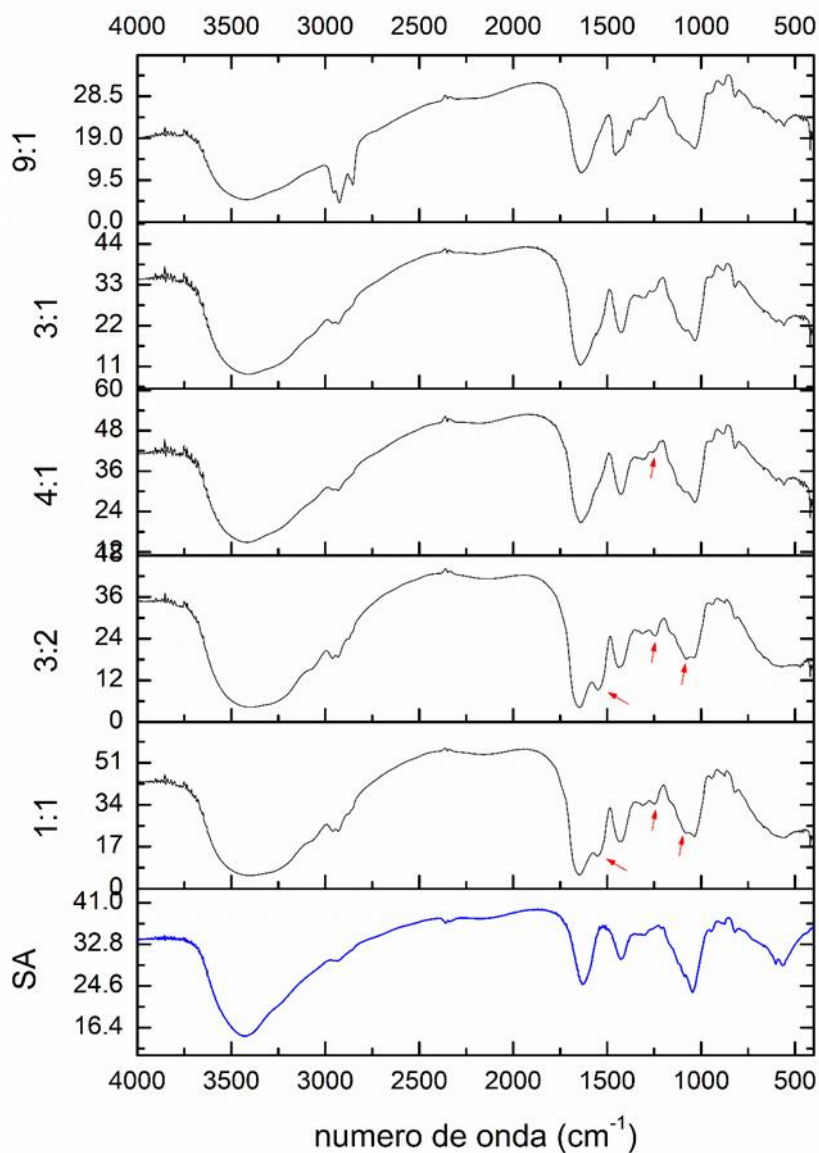


Figura 58 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP.

Em seguida construímos hidrogéis de alginato com PRP e HAp ou TCP incorporados. Para isso foram diluídos 10 mg de Liofilizado de PRP para cada mL da solução de alginato e mantidos em agitação por 10 minutos. Após este período foram adicionados 20 mg de HAp ou TCP por mL de solução e mantidos em agitação por mais 10 minutos. Na sequência, foi adicionado solução de CaSO_4 1% para ativação do processo de reticulação e a solução foi transferida para placa de 24 poços. Após 5 minutos foi adicionado solução de CaCl_2 1 M para reticulação total dos hidrogéis por mais 15 minutos. Solução de NaCl 0,15 M foi usada para lavar

os hidrogéis e estes foram coletados para caracterização físico-química por FTIR ou ensaios biológicos de citotoxicidade e expressão gênica relativa de células de interesse. É importante ressaltar, que devido a todos os desafios que a pandemia lançou no período destes experimentos que impossibilitaram o avanço na caracterização e, consequentemente, aprimoramento de nossas sínteses, optamos por realizar estes ensaios com hidroxiapatita e fosfato tricálcio adquiridas junto a Sigma-Aldrich, códigos 677418 para hidroxiapatita e 49963 para o fosfato tricálcio. Deste modo foi possível a manutenção dos prazos.

A **Figura 59** contém imagens do hidrogéis obtidos, **TCP** dissolveu bem na solução de alginato enquanto **HAp** acabou precipitando. As figuras **Figura 60** e **Figura 61** contém o espectro infravermelho dos hidrogéis compostos com **PRP** e **HAp** ou **TCP**. Foram observadas bandas comuns a ambos os géis que havíamos observado nas análises anteriores. Bandas largas na região de 1625 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} foram encontradas em ambos os géis referentes aos grupos amina primária e ácido carboxílico, respectivamente. A banda de amina primária apresentou uma intensidade tão elevada que acabou sobrepondo a banda de amina secundária (1550 cm^{-1}). Bandas relacionadas a vibração de PO_4^{3-} foram observadas na região de 1050 cm^{-1} e 590 cm^{-1} nos dois espectros. Bandas com menores intensidades foram observadas em 820 cm^{-1} (CO_2^{3-}) e 1240 cm^{-1} (amina terciária). Na região de 3000 a 2800 cm^{-1} bandas foram observadas relacionadas a aldeídos (C-H estiramento) e/ou alcanos (H-C-H estiramento assimétrico e simétrico).

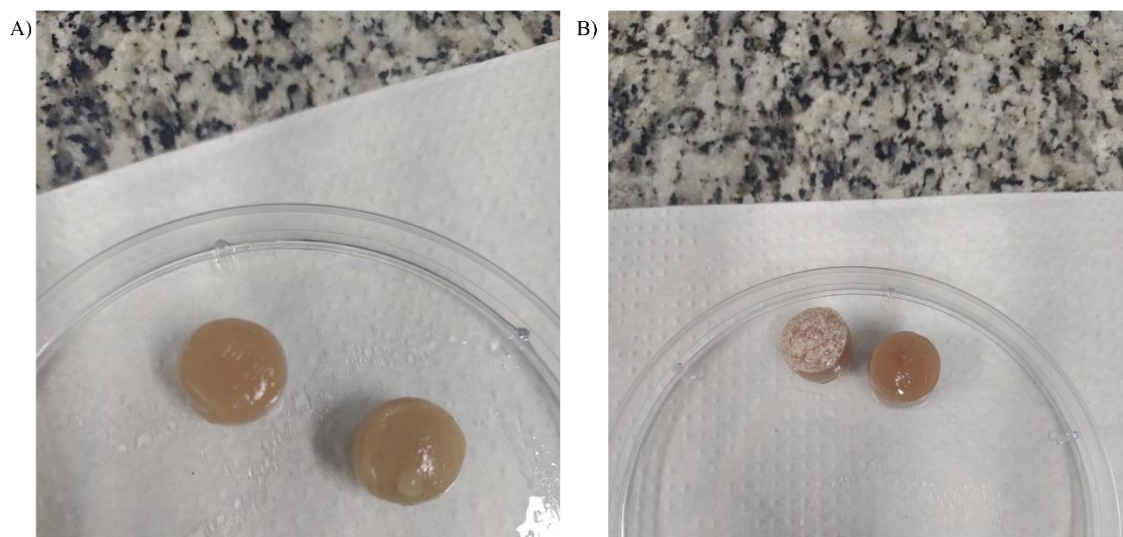


Figura 59 – Hidrogéis com de alginato com PRP e TCP (A) e PRP e HAp (B).

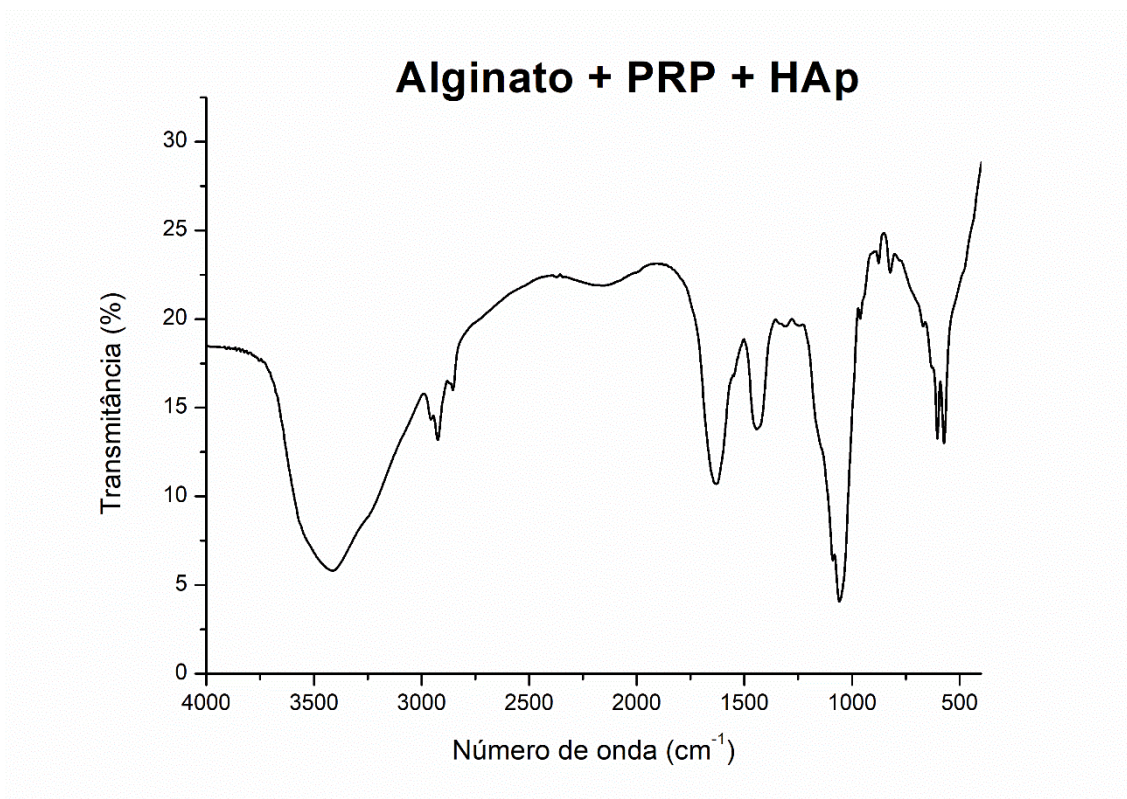


Figura 60 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP e hidroxiapatita.

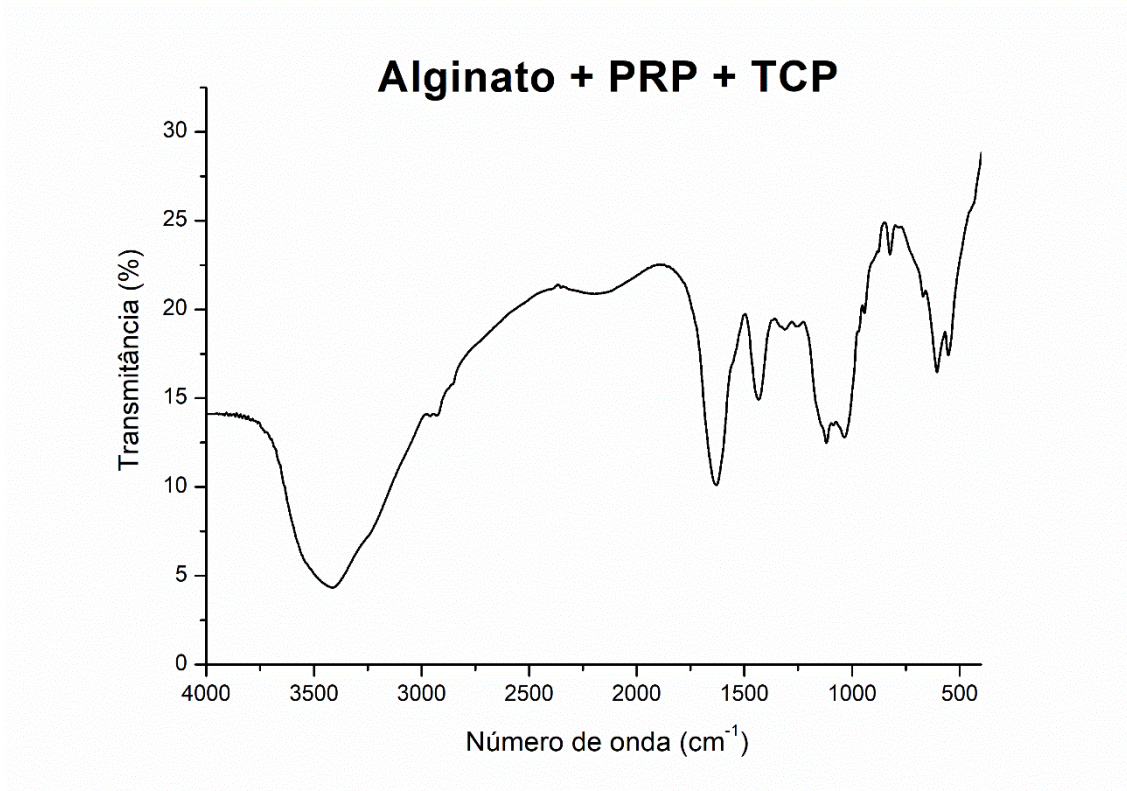


Figura 61 - Espectros de FTIR dos hidrogéis de alginato com liofilizado de PRP e fosfato tricálcio.

5.3.4 Citotoxicidade de hidrogéis em células MC3T3 e RAW 264.7

A citotoxicidade dos hidrogéis foi avaliada em pré-osteoblastos (MC3T3) e macrófagos (Raw 264.7) através do método indireto. Após o condicionamento por 24 horas, o meio foi adicionado às células por mais 24 horas de tratamento. A **Figura 62** contém os gráficos de MTT indicando que não foi observada citotoxicidade dos materiais estudados.

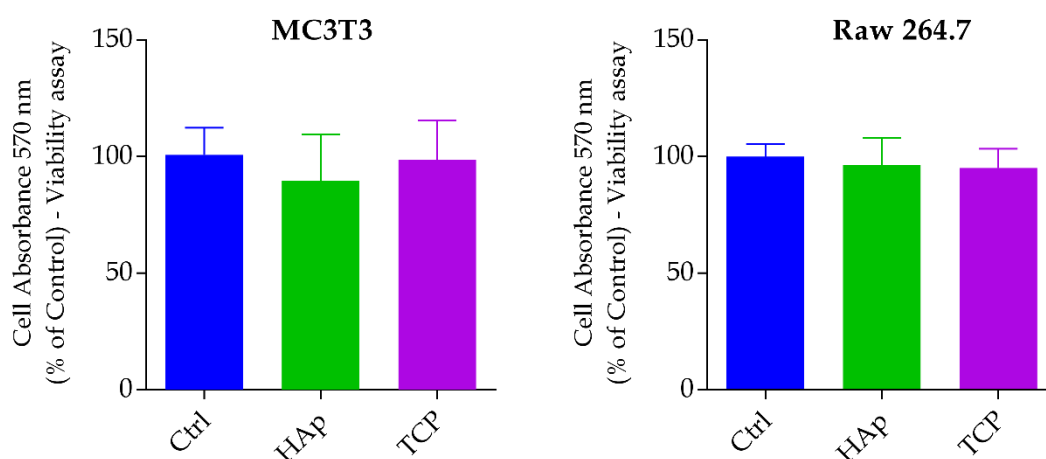


Figura 62 - MTT de células MC3T3 e Raw 264.7 submetidas a meio condicionado por 24 horas com hidrogéis de Alginato+PRP+HAP e Alginato+PRP+TCP.

5.3.5 Expressão genica relativa de células MC3T3 e RAW 264.7 submetida a meio condicionado pelos materiais

A última etapa realizada até o presente momento foi a avaliação da expressão gênica relativa de células MC3T3 (pré-osteoblastos) e Raw 264.7 (macrófagos) submetidas ao meio condicionado com os hidrogéis por 24 horas. O período foi escolhido para buscar o entendimento da resposta inflamatória nas células em um momento inicial. Os conjuntos de genes avaliados foram relativos ao complexo inflamassômico, marcadores de ciclo celular, interleucinas e marcadores de angiogênese.

Em células MC3T3, poucos genes tiveram sua expressão modulada pelos tratamentos detectada com teste de ANOVA. Foram eles: Cdk4, eNOS, Il18 e P21. A

Tabela 12 contém os P-valores para o teste de ANOVA de cada gene. Importante destacarmos que alguns primers não apresentaram boa corrida no PCR. As figuras **Figura 63**, **Figura 64**, **Figura 65** e **Figura 66** contém gráficos de expressão gênica relativa para os marcadores de ciclo celular, interleucinas, complexo inflamassômico e angiogênese, respectivamente.

Tabela 12 – Valores de P referentes ao resultado de ANOVA para células MC3T3.

Gene	P-valor	Significativo
Asc1	3.45E-01	No
Cdk2	5.92E-02	No
Cdk4	5.04E-03	Yes
Cdk6	8.21E-01	No
eNos	5.05E-04	Yes
Il10	2.71E-01	No
Il13	1.63E-01	No
Il18	8.55E-06	Yes
Il1b	3.20E-01	No
Il33	5.31E-01	No
Il6	2.00E-01	No
iNos	5.54E-01	No
Nfkb	1.37E-01	No
nNos	2.61E-01	No
Nrlp3	8.62E-02	No
P15	8.23E-02	No
P21	8.23E-03	Yes
Tnfa	1.55E-01	No
Vegf-R2	4.24E-01	No

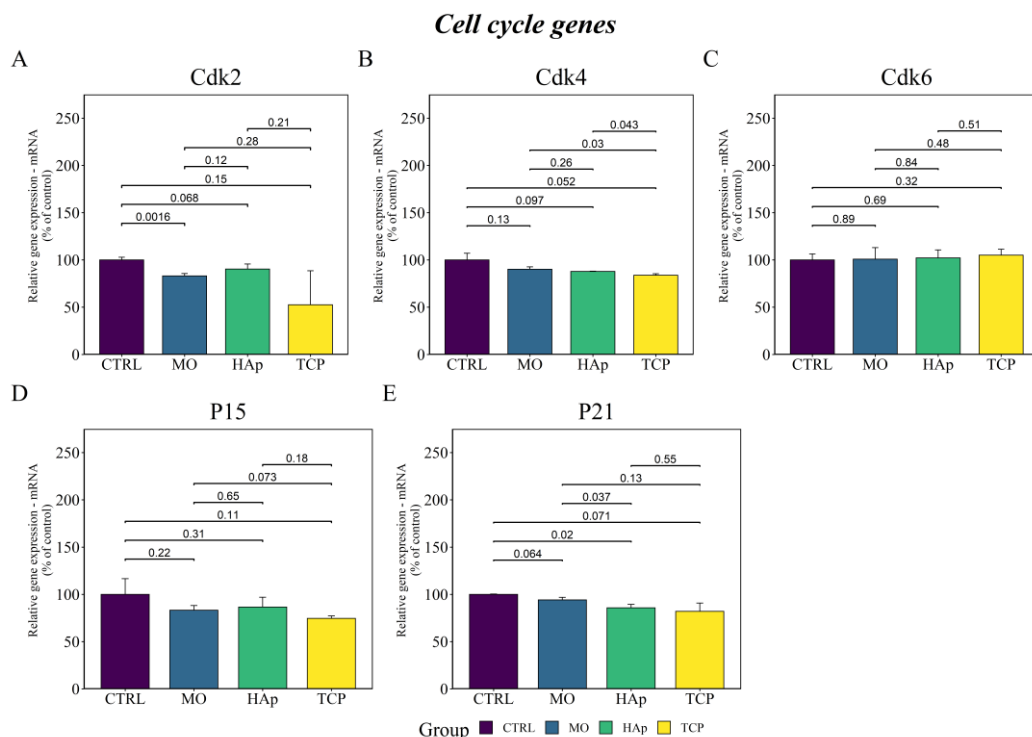


Figura 63 – Expressão gênica relativa de marcadores de ciclo celular em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogeis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) CDK2, (B) CDK4, (C) CDK6, (D) P15 e (E) P21. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

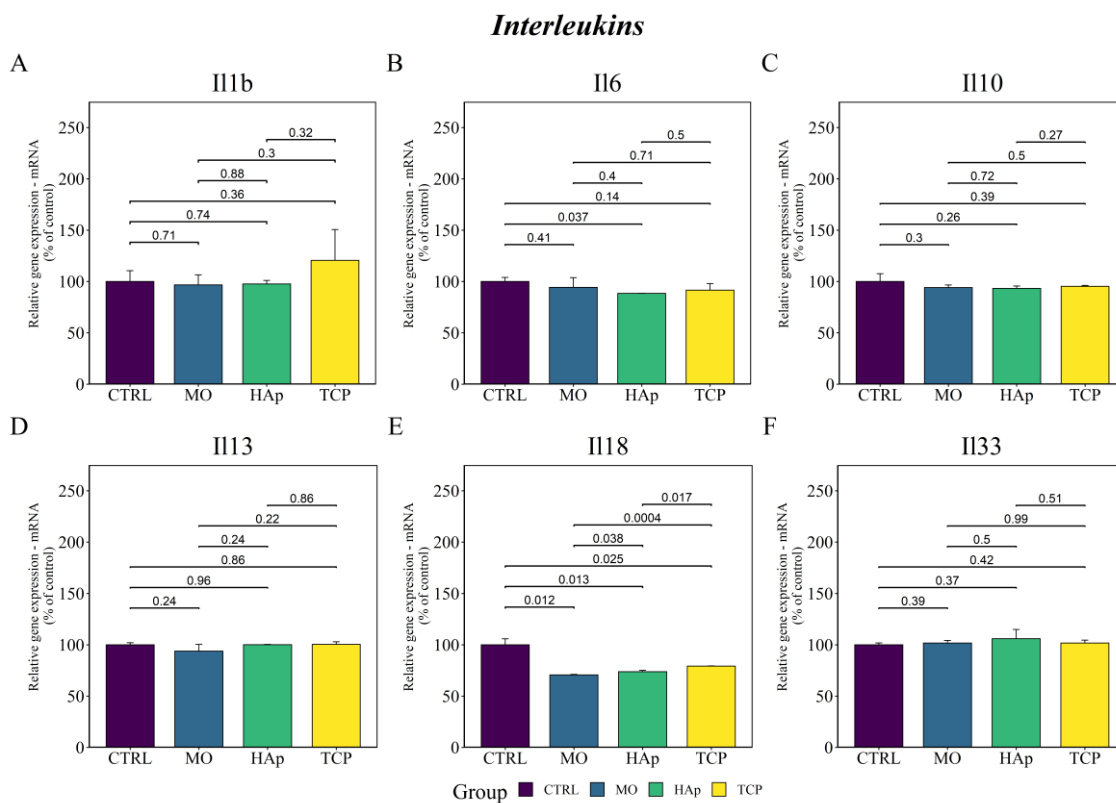


Figura 64 - Expressão gênica relativa de interleucinas em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogeis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador

positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) IL1B, (B) IL6, (C)IL10, (D) IL13, (E) IL18 e (F) IL33. Linhas de suporte contêm os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

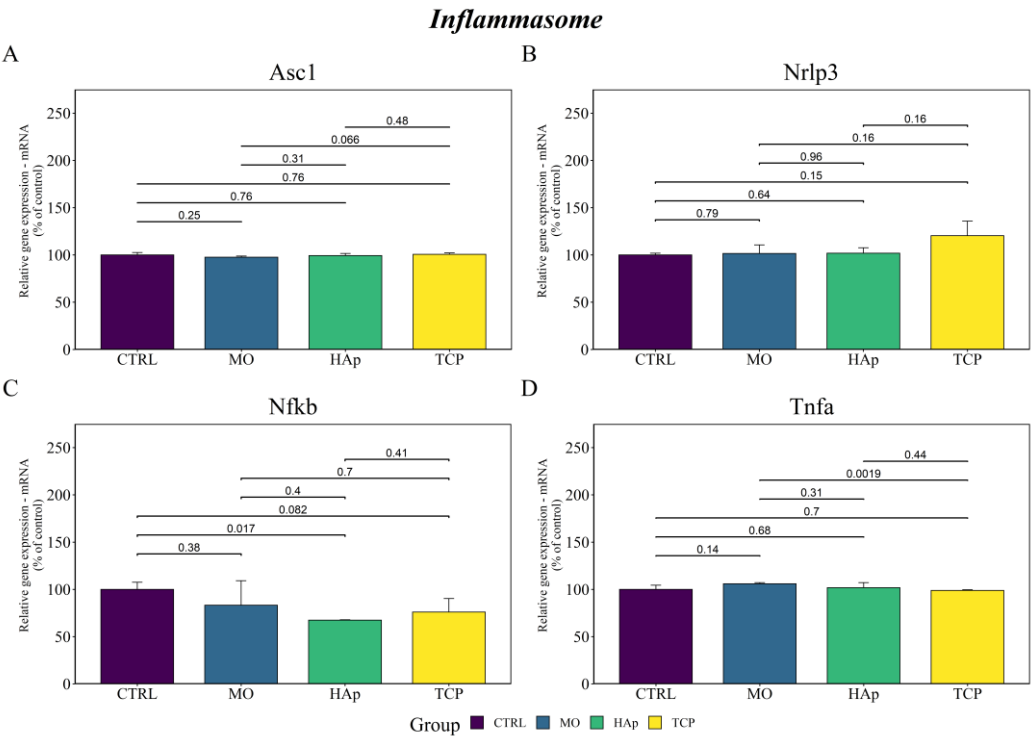


Figura 65 - Expressão gênica relativa de marcadores do inflamassoma em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) ASC1, (B) NRLP3, (C) NFkB e (D) TNFa. Linhas de suporte contêm os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

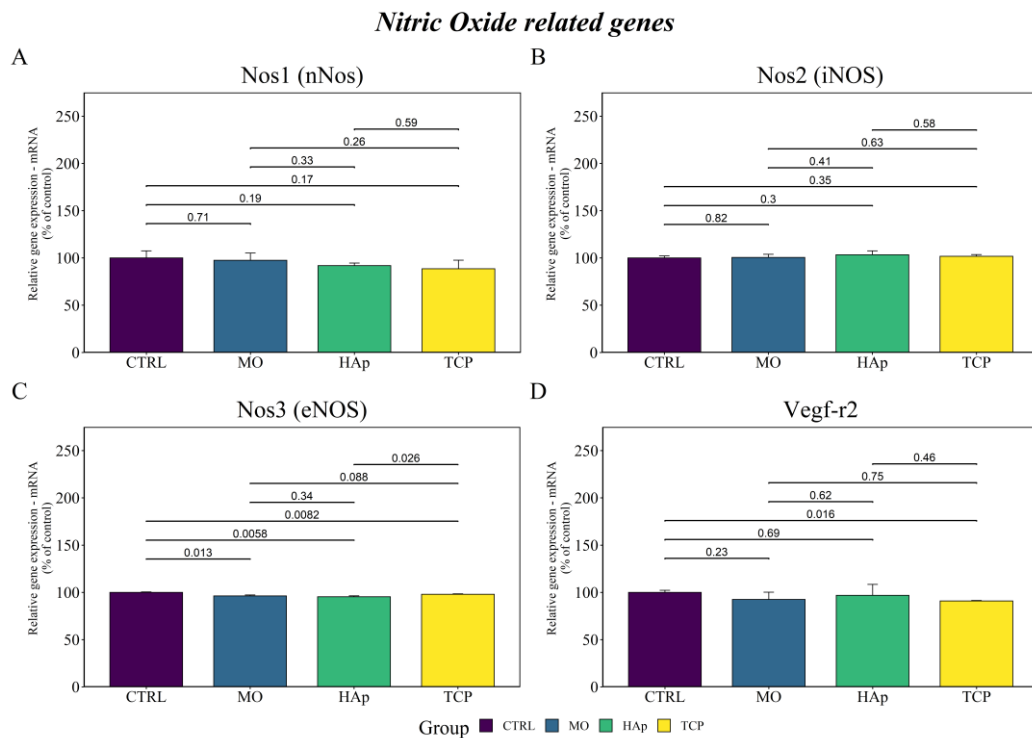


Figura 66 - Expressão gênica relativa de marcadores de angiogênese/óxido nítrico em células MC3T3 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) eNOS, (B) iNOS, (C) nNOS e (D) VEGF-R2. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

Já para células Raw 264.7 foram observados mais genes com expressão modulada pelo tratamento. Cdk2, Cdk4, Il33, Il6, Myd88, Nfkb, Nlrp3 e Tnf α . Diversos genes não apresentaram boa corrida no PCR. A **Tabela 13** contém os P-valores do teste ANOVA e as figuras **Figura 67**, **Figura 68** e **Figura 69** apresentam resultados da expressão gênica relativa dos conjuntos de genes avaliados para marcadores de ciclo celular, interleucinas/angiogênese e do complexo inflamassômico.

Tabela 13 - Valores de P referentes ao resultado de ANOVA para células Raw 264.7.

Gene	P-valor	Significativo
Asc1	4.28E-01	No
Cdk2	1.51E-02	Yes
Cdk4	4.69E-02	Yes
Enos	9.52E-01	No
Il33	4.02E-03	Yes

Il6	1.48E-02	Yes
Myd88	1.36E-05	Yes
Nfkb	4.25E-06	Yes
Nrlp3	3.77E-05	Yes
P15	2.04E-01	No
Tnfa	4.25E-04	Yes

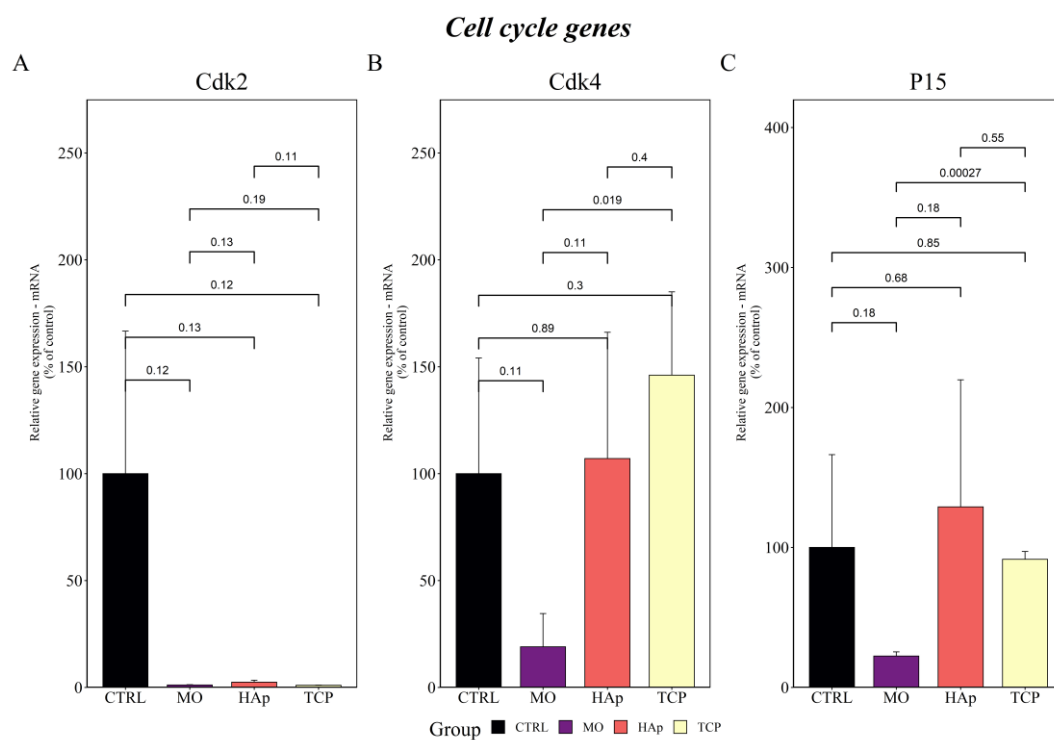


Figura 67 - Expressão gênica relativa de marcadores de ciclo celular em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogeis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) CDK2, (B) CDK4 e (C) P15. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

Interleukins and Nitric Oxide

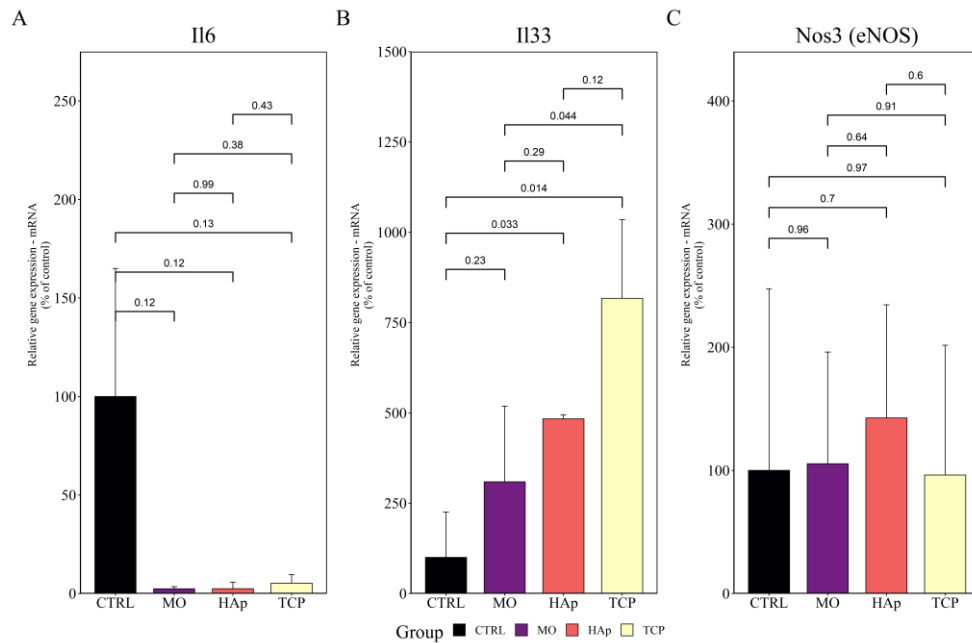


Figura 68 - Expressão gênica relativa de interleucinas e oxido nítrico sintase em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) IL6, (B) IL33 e (C) eNOS. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

Inflammasome related

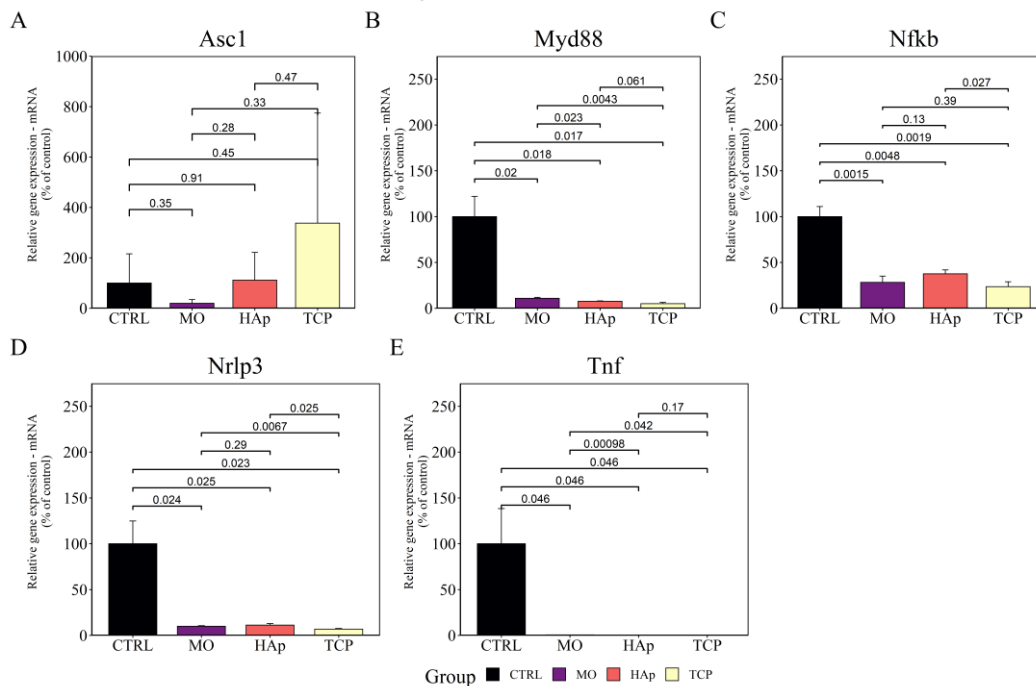


Figura 69 - Expressão gênica relativa de marcadores do complexo inflamassômico em células Raw 264.7 submetidas a meio condicionado com hidrogéis de alginato+PRP+HA e alginato+PRP+TCP. Meio osteoindutor foi utilizado como marcador positivo do processo osteogênico. Foram avaliados (A) ASC, (B) MYD88, (C) NFKB, (D) NRLP3 e (E) TNF. Linhas de suporte contém os valores do teste de comparações de médias de Tukey.

5.4 Discussão

A construção de um biomaterial capaz de mimetizar eventos da regeneração tecidual óssea acelerando a recuperação do paciente é o atual desafio na engenharia de tecidos ósseos. Inúmeras aplicações biotecnológicas vêm sendo implementadas utilizando alginato devido a sua alta capacidade de reticulação (“cross-linking”) instantânea independente de temperatura e a sua transição sol / gel na presença de cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , dentre outros (Hecht & Srebnik, 2016; Yoon et al., 2014). Vários trabalhos exploram as propriedades do alginato para construção de impressos e bioimpressos 3D (AXPE; OYEN, 2016; FARAMARZI et al., 2018; MARKSTEDT et al., 2015), inclusive alguns já realizam a impressão de **HAp** e/ou **TCP** utilizando de alginato (DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017; DIOGO et al., 2014; NAYAK et al., 2019; SANCILIO et al., 2018; SONG et al., 2020).

Dentre os trabalhos disponíveis, o artigo publicado por *Demirtas et al.* apresentou um protocolo simples e altamente reprodutível para a síntese de um hidrogel de alginato com **HAp** bioimprimível (DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017). No trabalho os autores apresentam a possibilidade de realizar a bioimpressão. Essa possibilidade nos animou em relação a pensar no compósito como um hidrogel de alginato contendo **HAp** ou **TCP** e **PRP** liofilizado. Neste capítulo começamos a construção de um biomaterial reunindo as propriedades do alginato com matrizes inorgânicas de **HAp/TCP** e os fatores de crescimento contidos no **PRP**.

A padronização das sínteses de HAp e TCP foram desafios neste período. Sadat-Shojai et al. fez uma ampla revisão sobre diferentes rotas de obtenção de HAp (SADAT-SHOJAI et al., 2013). A síntese escolhida por nós foi a desenvolvida em nosso departamento e é reportada em artigo publicado por Martins et al. (MARTINS et al., 2020). Foi realizada apenas uma modificação com a utilização de Na_2HPO_4 ao invés de realizar a reação de H_3PO_4 com NaOH . Utilizando análises de FTIR conseguimos monitorar a presença de resíduos da síntese durante o desenvolvimento deste capítulo. O espectro por nós obtido contém as bandas de PO_4^{3-} classicamente reportadas na literatura referentes a diferentes fosfatos de cálcio, como hidroxiapatita e o fosfato tricálcio. O espectro de FTIR de **TCP** também apresentou estas bandas características. A fase cristalina de nossa síntese de **HAp** foi investigada com DRX sendo observada uma maior fase amorfa o que nos levou a investigar o efeito do tratamento térmico em sua estrutura. Foram encontrados resultados de múltiplas fases como monetita e beta-TCP. Estes resultados indicam que o tratamento leva a uma transição de fases, porém não retornando a fase de hidroxiapatita desejada na concepção desta tese. Entretanto trabalhos exploram a aplicação destas fases em modelos *in vivo* ou *in vitro* apresentando bom biocompatibilidade (NANDI et al., 2018; SHEN et al., 2021; ZHOU et al., 2020). O difratograma de **TCP** confirmou a síntese na fase desejada. Devido aos desafios impostos pela pandemia optamos por utilizar reagentes

comerciais já caracterizados, porém devido ao alto custos é fundamental o aprimoramento de nossa síntese.

A associação de PRP com alginato vem sendo explorada em diferentes trabalhos (GAO et al., 2019; MAN et al., 2012; ZHANG et al., 2021). Zhang et al. descreveram a formação de uma rede “dupla” no hidrogel, fibras de alginato e fibrina, uma vez que tanto alginato quanto PRP são ativados por CaCl_2 . Os autores avaliaram o material em modelo de ferida em animais encontrando resultados promissores na aceleração do reparo nos grupos tratados (ZHANG et al., 2021). A formação deste tipo de estrutura em nosso material é algo que visamos estudar nas próximas etapas utilizando técnicas de microscopias eletrônica e histológicas. Utilizando FTIR foi possível observarmos uma incorporação de **PRP** no gel de alginato, porém não foi possível atestar a formação da estrutura de uma rede dupla. A adição de **HAp** e **TCP** foi observada pelo espectro de FTIR e não foi observada citotoxicidade em células MC3T3 e Raw 264.7. Estas células foram escolhidas para investigarmos o efeito na fase inflamatória da regeneração óssea. Os conjuntos de genes escolhido seguiram o mesmo critério. Os hidrogéis modularam a expressão gênica de maneira distintas entre as células, porém devido a problemas na corrida de alguns genes não foi possível compararmos diretamente o efeito entre as células. Os resultados até aqui obtidos sustentam mais estudos na área, com melhores abordagens na medicina e odontologia, com perspectivas de estudos pré-clínicos que possam (ou não) melhor avaliar seus efeitos em humanos.

5.5 Constatações

- Sínteses de HAp e TCP apresentaram espectro infravermelho compatíveis com a literatura;
- HAp apresentou múltiplas fases em seu difratograma;
- O difratograma de TCP confirmou a fase obtida;
- Construção de hidrogéis com hidroxiapatita ou fosfato tricálcio utilizando alginato foi realizada;
- Hidrogéis de alginato foram capazes de encapsular o liofilizado de PRP;
- Hidrogéis compostos de alginato, PRP e HAp ou TCP não apresentaram citotoxicidade em células MC3T3 e Raw 264.7;
- Os hidrogéis foram capazes de modular a expressão gênica relativa de marcadores da fase inflamatória.

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. **corrr: 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.

Anexo I - Artigos publicados durante o período do doutorado

Bezerra, F., Ferreira, M.R., Fontes, G.N., da Costa Fernandes, C.J., Andia, D.C., Cruz, N.C., da Silva, R.A. and Zambuzzi, W.F. (2017), Nano hydroxyapatite-blasted titanium surface affects pre-osteoblast morphology by modulating critical intracellular pathways. *Biotechnol. Bioeng.*, 114: 1888-1898. doi:10.1002/bit.26310

Célio J.C. Fernandes, Fábio Bezerra, Marcel R. Ferreira, Amanda F.C. Andrade, Thais Silva Pinto, Willian F. Zambuzzi (2018), 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*, 163, 321-328, ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.12.049>.

da Costa Fernandes, C.J., Ferreira, M.R., Bezerra, F.J.B. et al. Zirconia stimulates ECM-remodeling as a prerequisite to pre-osteoblast adhesion/proliferation by possible interference with cellular anchorage. *J Mater Sci: Mater Med* 29, 41 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6041-9>

Rodrigo A. da Silva, Amanda Fantini de Camargo Andrade, Geórgia da Silva Feltran, Célio Júnior da C. Fernandes, Rahyza Inacio F. de Assis, Marcel Rodrigues Ferreira, Denise C. Andia, Willian F. Zambuzzi (2018), The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 478, 151-167, ISSN 0303-7207, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.08.008>.

Geórgia da Silva Feltran, Célio Junior da Costa Fernandes, Marcel Rodrigues Ferreira, Ha Ram Kang, Ana Livia de Carvalho Bovolato, Márjorie de Assis Golim, Elenice Deffune, Ivan Hong Jun Koh, Vera Regina Leopoldo Constantino, Willian F. Zambuzzi (2019), Sonic hedgehog drives layered double hydroxides-induced acute inflammatory landscape, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 467-475, ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.051>.

Mariana Issler Pinheiro Machado, Anderson Moreira Gomes, Marcel Ferreira Rodrigues, Thais Silva Pinto, Célio Júnior da Costa Fernandes, Fábio J. Bezerra, Willian Fernando Zambuzzi (2019), Cobalt-chromium-enriched medium ameliorates shear-stressed endothelial cell

- performance, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 54, 163-171, ISSN 0946-672X, <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.04.012>.
- da S. Feltran, G. Bezerra, F. da Costa Fernandes, CJ, Ferreira, MR, Zambuzzi, WF. 2019. Differential inflammatory landscape stimulus during titanium surfaces obtained osteogenic phenotype. *J Biomed Mater Res Part A* 2019: 107A: 1597– 1604.
- Rodrigo A. da Silva, Gwenny M. Fuhler, Vincent T. Janmaat, Célio Júnior da C. Fernandes, Geórgia da Silva Feltran, Flávia Amadeu Oliveira, Adriana Arruda Matos, Rodrigo Cardoso Oliveira, Marcel Rodrigues Ferreira, Willian F. Zambuzzi, Maikel P. Peppelenbosch (2019), HOXA cluster gene expression during osteoblast differentiation involves epigenetic control, *Bone*, 125, 74-86, ISSN 8756-3282, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.04.026>.
- da Silva, RA, Ferreira, MR, Gomes, AM, Zambuzzi, WF. LncRNA HOTAIR is a novel endothelial mechanosensitive gene. *J Cell Physiol*. 2020; 235: 4631– 4642. <https://doi.org/10.1002/jcp.29340>
- O.P. Gomes, G.S. Feltran, M.R. Ferreira, C.S. Albano, W.F. Zambuzzi, P.N. Lisboa-Filho (2020), A novel BSA immobilizing manner on modified titanium surface ameliorates osteoblast performance, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 190, 110888 ISSN 0927-7765, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110888>.
- Ferreira, MR, Santos, GA, Biagi, CA, Silva Junior, WA, Zambuzzi, WF. GSVA score reveals molecular signatures from transcriptomes for biomaterials comparison. *J Biomed Mater Res*. 2020; 1– 11. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37090>
- Ferreira, M. R., & Zambuzzi, W. F. (2021). Platelet microparticles load a repertoire of miRNAs programmed to drive osteogenic phenotype. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(8), 1502–1511. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37140>
- Rodrigo A. da Silva, Geórgia da Silva Feltran, Marcel Rodrigues Ferreira, Patrícia Fretes Wood, Fabio Bezerra, Willian F. Zambuzzi, "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*, vol. 2020, Article ID 3026893, 11 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3026893>
- Pinto, T. S., Martins, B. R., Ferreira, M. R., Bezerra, F., & Zambuzzi, W. F. (2022). Nanohydroxyapatite-Blasted Bioactive Surface Drives Shear-Stressed Endothelial Cell Growth and Angiogenesis. *BioMed Research International*, 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/1433221>
- Franco Cairo, J. P. L., Mandelli, F., Tramontina, R., Cannella, D., Paradisi, A., Ciano, L., Ferreira, M. R., Liberato, M. v., Brenelli, L. B., Gonçalves, T. A., Rodrigues, G. N., Alvarez, T. M., Mofatto, L. S., Carazzolle, M. F., Pradella, J. G. C., Paes Leme, A. F., Costa-Leonardo, A. M., Oliveira-Neto, M., Damasio, A., ... Squina, F. M. (2022). Oxidative cleavage of polysaccharides by a termite-derived *superoxide dismutase* boosts the degradation of biomass by glycoside hydrolases. *Green Chemistry*, 24(12), 4845–4858. <https://doi.org/10.1039/D1GC04519A>

Anexo II – Plano de gestão de dados

Conforme solicitado pela FAPESP, delineamos um plano para gestão dos dados obtidos neste projeto. Os dados gerados nesse projeto serão mantidos sob embargo por 2 anos enquanto eventuais pedidos de patentes e/ou publicações serão confeccionados. Após esse período os dados serão mantidos e disponibilizados de acordo com a natureza de seu conteúdo. Por exemplo, “scripts” das análises de bioinformática, machine learning e estatística serão disponibilizados em um repositório aberto no github (<https://www.github.com/>). Github é um site para disponibilização de códigos-fontes com versões de controle amplamente utilizada no mundo. Para as análises acima citadas é uma plataforma referência. Os demais dados gerados pelo projeto em experimentos como qPCR, Western Blotting, colorimétricos (como MTT, Cristal violeta, etc), caracterização físico-química, entre outros, serão salvos baseado no tipo de dado: “Dados brutos”, “Texto”, “Gráfico”, “Figura”, dentre outros. Estes serão disponibilizados em repositórios *Open Source* como incentivado pela FAPESP. Neste momento estamos estudando quais os melhores repositórios para os tipos de dados.

Declaro também que desde novembro de 2019 iniciei um modelo interno de gestão de dados. Este modelo se baseia em dois arquivos de metadados, um sobre os experimentos realizados e um sobre as amostras produzidas. Os metadados de experimentos são construídos a partir da padronização dos nomes dos arquivos. Decidimos pelo seguinte formato: *“data_projeto_colega_experimento_amostra_tipo.formato”*

- Data: dia em que o experimento foi realizado. Será escrito seguindo a ISO 8601.
- Projeto: o código do projeto FAPESP em questão, neste caso 057317
- Colega: como muitos de nossos experimentos são conduzidos com ajuda de colegas padronizei a escrita de seu nome.
- Experimento: Nome do experimento em questão.
- Amostra: Nome da amostra cadastrada no metadado de amostras.
- Tipo: Figura, gráfico, texto, dados brutos, entre outros.
- Formato: Extensão do arquivo. Gerada automaticamente

Foi construída uma aplicação utilizando R para a construção de uma planilha em excel para os metadados de experimentos de modo automatizado. O código e demais explicações se encontram disponíveis em <https://github.com/marceelrf/MetaDataMRF>. A **Figura 70** contém um modelo da saída da aplicação dos metadados experimentais. Já os metadados de amostras atualmente contêm apenas 3 colunas:

- Amostra: Nome da amostra;
- Protocolo de preparo: Nome do protocolo utilizado para obtenção da amostra;

- Data: dia em que a amostra foi coletada. Será escrito seguindo a ISO 8601.

Estamos cogitando novas colunas a respeito da natureza da amostra (cultura de células, tecido, biomateriais etc.). Os nomes dos protocolos, bem como toda a descrição de suas etapas, estão mantidos em um arquivo de word e serão disponibilizados.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Date	Project	Colleague	Experimenter	Sample	Type	Format			
2	25/11/2019	57317	Anderson	Lowry	PRP1	data	pzfx			
3	25/11/2019	57317	Anderson	Lowry	PRP1	data	xlsx			
4	05/12/2019	57317	Anderson	Lowry	PRP1	data	pzfx			
5	05/12/2019	57317	Anderson	Lowry	PRP1	data	xlsx			
6	05/12/2019	57317	Anderson	MTT	PRPlif	data	pzfx			
7	05/12/2019	57317	Anderson	MTT	PRPlif	data	xlsx			
8	05/12/2019	57317	Anderson	MTT	PRPlif	graph	png			
9	05/12/2019	57317	Anderson	MTT	PRPlifSor	data	pzfx			
10	05/12/2019	57317	Anderson	MTT	PRPlif	data	xlsx			
11	11/12/2019	57357	Georgia	LowryLib	PRPlif	graph	png			

Figura 70 - Modelo de arquivo de metadados gerado pela aplicação criada.

Durante a realização do projeto os dados estão sendo armazenados em notebook próprio com realização de backup quinzenais em mídia física (DVD).