

RAFAELA CANASSA MAIOLINI

Potencial biotecnológico da fração proteica F1 do látex natural e da estimulação elétrica na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais para o reparo do tecido ósseo

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Patrícia Soares Santiago

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira Caetano

Araraquara-SP
2024

M227p	<p>Maiolini, Rafaela Canassa</p> <p>Potencial biotecnológico da fração proteica F1 do látex natural e da estimulação elétrica na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais para o reparo do tecido ósseo / Rafaela Canassa Maiolini. -- Araraquara, 2024</p> <p>75 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara</p> <p>Orientadora: Patrícia Soares Santiago</p> <p>Coorientador: Guilherme Ferreira Caetano</p> <p>1. Estimulação elétrica. 2. Engenharia tecidual. 3. Células-tronco. 4. Látex. 5. Seringueira. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

É necessário buscar alternativas terapêuticas capazes de auxiliarem a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos nos casos de fraturas e lesões ósseas, principalmente em quadros mais severos. Estudos utilizando células vivas, bioativos e biomateriais tem sido avaliados como futuros tratamentos biotecnológicos capazes de apresentarem resultados mais promissores em comparação às terapias convencionais. Neste trabalho, foi proposto o uso da estimulação elétrica em associação à fração proteica F1 do látex para promoção da diferenciação osteogênica.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

It is necessary to look for therapeutic alternatives capable of assisting regenerative medicine and tissue engineering in cases of fractures and bone injuries, especially in more severe cases. Studies using live cells, bioactives and biomaterials have been evaluated for future biotechnological treatments capable of presenting more promising results compared to conventional therapies. In this study, the use of electrical stimulation in association with the F1 protein fraction of latex was proposed to promote osteogenic differentiation.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Potencial biotecnológico da fração proteica F1 do látex natural e da estimulação elétrica na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais para o reparo do tecido ósseo"

AUTORA: RAFAELA CANASSA MAIOLINI

ORIENTADORA: PATRICIA SOARES SANTIAGO

COORIENTADOR: GUILHERME FERREIRA CAETANO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro

Prof. Dr. RICARDO JOSÉ DE MENDONÇA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM - Uberaba

Prof.^a Dr.^a ANA LETÍCIA MADEIRA SANCHES (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro-SP

Araraquara, 08 de março de 2024



Documento assinado digitalmente

PATRICIA SOARES SANTIAGO

Data: 14/03/2024 13:42:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafaela Canassa Maiolini

Nome em citações bibliográficas: MAIOLINI, R.C.; CANASSA, R.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO:

Graduação em Biomedicina - Centro Universitário Hermínio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR:

2022-2022 Curso de Comunicação e Escrita Científica. (Carga horária: 4h).
American Chemical Society, Estados Unidos.

2021-2021 Extensão Universitária em Manejo clínico da COVID-19 na Atenção Especializada. (Carga horária: 15h).
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Malária na Atenção Primária à Saúde. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Prevenção de Infecção. (Carga horária: 1h).
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Imunologia. (Carga horária: 120h).
Associação Brasileira de Educação Online, ABELINE, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Doenças ocasionadas por vírus respiratórios emergentes, incluindo a COVID-19. (Carga horária: 4h).
Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Diagnóstico e Cuidado Onco-hematológico na Atenção Primária à Saúde. (Carga horária: 8h).
Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na Atenção Básica. (Carga horária: 45h).
Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brasil.

2021-2021 Extensão Universitária em COVID-19: O que precisa saber e fazer! (Carga horária: 6h).
Associação Faculdade de Ribeirão Preto S/S LTDA., AFRPS_PPROV, Brasil.

2021-2021 Liga Nacional de Perfusão com Apoio da EM CEC PELO Brasil, EMCECBR, Brasil.

- 2019-2019 Segurança em Laboratórios Químicos. (Carga horária: 15h).
Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP, FUNCAMP/SP, Brasil.
- 2019-2019 Extensão universitária em Treinamento de manejo de animais de laboratório.
(Carga horária: 15h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2019-2019 Extensão universitária em GRUPO DE ESTUDOS EM ANATOMIA HUMANA –
terceiro período. (Carga horária: 15h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2019-2019 Introdução ao diagnóstico de vírus. (Carga horária: 10h).
Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
- 2019-2019 Curso de Verão em Fisiologia. (Carga horária: 30h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2017-2017 Introdução ao controle de infecções nos serviços de saúde. (Carga horária: 5h).
Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.
- 2017-2017 Extensão universitária em V TREINAMENTO EM MASSA DE
RESSUSCITAÇÃO CARDIOPULMONAR. (Carga horária: 1h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2017-2017 Extensão universitária em GRUPO DE ESTUDOS EM ANATOMIA HUMANA –
primeiro período do segundo semestre. (Carga horária: 4h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2017-2017 Extensão universitária em GRUPO DE ESTUDOS EM ANATOMIA HUMANA –
primeiro período. (Carga horária: 21h).
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras, UNIARARAS, Brasil.
- 2015-2015 Instrumentação Cirúrgica. (Carga horária: 80h).
Instituto Politécnico de Ensino a Distância, IPED, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL:

Unesp Campus Araraquara, UNESP, Brasil.

Vínculo institucional

2023 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda

Atividades

03/2022 - Atual

Pesquisa e desenvolvimento, Unesp Câmpus Araraquara.

Linhas de pesquisa
Biotecnologia Aplicada à Saúde

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA:

Resumos publicados em anais de congressos

SANTIAGO, P. S.; **MAIOLINI, R.C.**; CAETANO, G. F.; BREGALANTE, L. PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE F1 PROTEIN OF NATURAL LATEX USED IN ASSOCIATION WITH ELECTRICAL STIMULATION FOR OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS. In: 47TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOPHYSICAL SOCIETY, 2023, Campinas. 47TH ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN BIOPHYSICAL SOCIETY, 2023. v. 1.

Artigos publicados

CANASSA, R.; LEVADA, M. M. O. Vida Emocional do Feto e as Fisiopatologias Associadas. GESTÃO UNIVERSITÁRIA, 2020.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS:

Participação:

1. 52ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). THE USE OF NATURAL LATEX F1-PROTEIN AND ELECTRICAL STIMULATION FOR OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS. 2023. (Congresso).
2. Curso de Inverno de Imunologia. O EMPREGO DA PROTEÍNA F1 DO LÁTEX NATURAL E DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA PARA A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS. 2023. (Outra).
3. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line. 2023. (Congresso).
4. III Simpósio/Curso de Toxinologia Básica & Aplicada (SIM-TOX): Do envenenamento à aplicação biotecnológica e medicinal. 2023. (Simpósio).
5. V Escola de Inverno em Física Aplicada à Medicina e Biologia. 2022. (Outra).
6. XIV Workshop Biotecnologia e XIII Semana Acadêmica de Biomedicina. 2022. (Congresso).
7. 16º Congresso Científico, 13º Congresso Internacional e 15º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPq da FHO. 16º Congresso Científico, 13º Congresso Internacional e 15º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPq da FHO. 2021. (Congresso).
8. 15º Congresso Científico, 12º Congresso Internacional, 14º Congresso de Iniciação

- Científica PIBIC - CNPq da FHO. 15º Congresso Científico, 12º Congresso Internacional, 14º Congresso de Iniciação Científica PIBIC - CNPq da FHO. 2020. (Congresso).
9. Palestra intitulada "BIOLOGIA MOLECULAR E COVID-19. Palestra intitulada "BIOLOGIA MOLECULAR E COVID-19. 2020. (Congresso).
 10. Palestra intitulada "DOCÊNCIA E PESQUISA". Palestra intitulada "DOCÊNCIA E PESQUISA". 2020. (Congresso).
 11. Palestra intitulada "IMPACTO DA HIPÓXIA SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO. 2020. (Congresso).
 12. Palestra intitulada "INFLAMAÇÃO X INFECÇÃO: CONCEITOS GERAIS E DIFERENÇAS. 2020. (Congresso).
 13. Palestra intitulada "PERÍCIA: A CIÊNCIA A FAVOR DA JUSTIÇA. 2020. (Congresso).
 14. Palestra intitulada "SARS-COV-2: A GENÉTICA DA PANDEMIA. 2020. (Congresso).
 15. XII WORKSHOP DE BIOTECNOLOGIA E XI SEMANA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA. XII WORKSHOP DE BIOTECNOLOGIA E XI SEMANA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA. 2020. (Congresso).
 16. 14ª Feira das Profissões da Fundação Hermínio Ometto - FHO como MONITOR. 14ª Feira das Profissões da Fundação Hermínio Ometto - FHO como MONITOR. 2018. (Feira).
 17. IX Semana Acadêmica de Biomedicina. IX Semana Acadêmica de Biomedicina. 2018. (Congresso).
 18. X Workshop de Biotecnologia e IX Semana Acadêmica de Biomedicina. X Workshop de Biotecnologia e IX Semana Acadêmica de Biomedicina. 2018. (Congresso).
 19. 11º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC - CNPq. 11º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC - CNPq. 2017. (Congresso).
 20. 12º CONGRESSO CIENTÍFICO UNIARARAS. PRIMEIROS SOCORROS. 2017. (Oficina).
 21. 13ª Feira das Profissões da Fundação Hermínio Ometto - FHO|Uniararas como MONITOR. 2017. (Feira).
 22. 8ª SEMANA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA. 8ª SEMANA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA. 2017. (Congresso).
 23. 9º CONGRESSO INTERNACIONAL. 9º CONGRESSO INTERNACIONAL. 2017. (Congresso).
 24. 9º WORKSHOP EM BIOTECNOLOGIA DA UNIARARAS. 9º WORKSHOP EM

BIOTECNOLOGIA DA UNIARARAS. 2017. (Congresso).

Organização de eventos científicos:

1. SCHARLACK, N. K. ; GRIGNOLI, C. R. E. ; **MAIOLINI, R.C.** . XIV Workshop Biotecnologia e XIII Semana Acadêmica de Biomedicina. 2022. (Congresso).
2. LEVADA, M. M. O. ; **CANASSA, R.** . 14^a Feira das Profissões FHO. 2018.

Dedico esta dissertação a Deus por ser minha fortaleza e meu guia, por me conceder força para concluir esta fase e me sustentar até aqui.

Aos meus pais por todo incentivo e amor, por serem exemplos de persistência, honestidade e resiliência.

À minha amada avó pelas palavras de encorajamento e por ser meu abrigo em tantos momentos.

Ao meu esposo por todo apoio, por me amparar, encorajar e acreditar em meu potencial.

Aos meus familiares, minha irmã e meus sobrinhos por me acompanharem durante todo este percurso e sempre torcerem pelas minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Patrícia Soares Santiago por me receber como aluna de mestrado, pelo amparo, pela confiança e respeito, pela compreensão e por todos os ensinamentos e experiências especiais, por acreditar que tudo daria certo e me mostrar novos caminhos. Por confiar, em minhas mãos, técnicas e aparelhos inovadores e me abrir oportunidades dentro da físico-química e da carreira acadêmica.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Guilherme Ferreira Caetano, também, pelo acolhimento, por toda confiança, pela paciência e compreensão em todos os momentos. Por me ensinar prontamente e sempre estar disposto a me ajudar e orientar de forma tão ativa e responsável. Por me proporcionar novas experiências e vivências dentro do laboratório de cultura celular.

Muito obrigada aos membros e professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Unesp de Araraquara por todo suporte. Seus ensinamentos e amparos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação.

Agradeço aos professores, alunos de pós graduação e técnicos da Unesp de Registro, do Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR), e aos técnicos de laboratório da Fundação Hermínio Ometto de Araras. Todos sempre me auxiliaram muito nas técnicas e no uso dos aparelhos, me acolheram prontamente, sempre proporcionando um clima agradável no laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus queridos e especiais alunos de iniciação científica, João Lucas, Ana Beatriz, Fábio e Milena, que sempre foram responsáveis e ótimos em tudo que fizeram. Obrigada por me acolherem, me respeitarem e contribuírem de forma tão significativa durante todo nosso estudo.

Às colegas de mestrado Luana, Cintia e Júlia por me apoiarem e ajudarem sempre que foi preciso. Luana, sua amizade e parceria foram essenciais para que esta etapa fosse concluída com tanta alegria, obrigada por cada momento compartilhado durante todo mestrado.

Em especial, à minha amada família. Ao meu pai Doni e minha mãe Rosemei por não medirem esforços para realizarem meus sonhos e me incentivarem sempre a buscar o melhor caminho, por nunca terem desistido de mim e terem acreditado em meus projetos. À minha avó Josephina que é um anjo em minha vida, sempre torcendo pelos meus objetivos e me enchendo de amor e carinho, além de me acolher nos momentos difíceis, me colocando em suas orações todos os dias. Ao meu amado esposo André que sempre me encorajou a superar meus limites, por ser meu porto seguro durante todo processo. Seu amor e proteção foram um grande estímulo para minha dedicação ao estudo. À minha irmã Paula e meus sobrinhos Pedro e Pietro por serem minha alegria, por me fazerem ver a vida com mais leveza e acreditar que sempre é possível alcançar os objetivos.

E ao principal autor de toda esta obra, o meu muito obrigada. Deus, sem a Tua força, presença e Teu o amor, nada seria possível, tudo vem de Ti e tudo é para Ti, Tua é a glória hoje e sempre.

“Bem aventurado o homem que acha a sabedoria, e o homem que adquire conhecimento.” – Provérbios 3:13.

RESUMO

Com o aumento da expectativa de vida e do envelhecimento ósseo, a carência de novas alternativas terapêuticas para casos de fraturas e perdas ósseas críticas ganha relevância. A engenharia tecidual emerge para promover o reparo de tecidos lesados por meio de células e fatores biológicos. O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização físico-química da fração proteica F1 do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* (LXHb) e avaliar *in vitro* a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea de ratos Wistar, submetidas à estimulação elétrica (ES) e cultivadas com a fração proteica F1, bem como analisar a expressão dos genes relacionados à osteogênese. A caracterização foi realizada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta para F1 a 1% (10 mg/mL); 0,1% (1 mg/mL) e 0,01% (0,1 mg/mL) a 0, 24 e 48h após diluição em tampão fosfato-salino (pH 7,4). Para F1 a 0,01%, foram feitas análises em diferentes valores de pH, na ausência e na presença de cloreto de sódio (NaCl). Para caracterização das proteínas de F1, foram realizadas Cromatografia Líquida de Gel Filtração (CGF) e Quantificação Proteica por Analisador Elementar CNS - Leco. Nos ensaios de viabilidade celular (método MTT) e de diferenciação osteogênica (vermelho de Alizarina), a estimulação foi aplicada por 60s, 150s e 300s a 10 μ A, duas vezes por semana, e o meio celular foi suplementado com as três concentrações de F1. Para as análises de expressão gênica, as células foram estimuladas por 60s e 300s e suplementadas com F1 a 0,1% e 0,01%. Por DLS, observou-se duas populações de partículas independente do tempo de preparo das amostras. Por intensidade a 0h pós preparo, as partículas apresentaram tamanho médio de 123,2 e 5227,0 nm (F1-1%), 164,2 e 1187,0 nm (F1-0,1%), 336,0 e 3369,0 nm (F1-0,01%). O Potencial Zeta apresentou valor nulo para as concentrações analisadas em pH 7,4. A quantificação proteica determinou um teor de 10,2% de proteínas na massa total da fração F1 do látex. Nos ensaios *in vitro*, observou-se, em todos os grupos experimentais, viabilidade celular acima de 70% (não citotoxicidade) e diferenciação osteogênica superior a 80%, com maior taxa no grupo ES-60s associado à F1 a 0,01%. Na análise da expressão gênica, os genes *Bmp2* e *Ltype* apresentaram expressão maior nos grupos estimulados por 60s nas duas associações com F1-0,1% e 0,01%, já o gene *Col1a1* obteve expressão significativa no grupo 300s-0,1%. Os genes *Alp* e *Runx2* demonstraram expressão maior na associação com F1-0,01% e o gene *Camk2* nos grupos F1-0,1%, ambos associados à ES-60s e 300s. Conclui-se que a fração proteica F1 é um sistema polidisperso e apresenta carga nula em pH 7,4. Essa fração é constituída, em massa, por uma baixa porcentagem de proteínas, porém, com importante ação biológica no que se refere ao aumento da proliferação e diferenciação osteogênica de CTMs, principalmente, quando associada à estimulação elétrica, tornando-a uma alternativa de tratamento promissor para a medicina regenerativa no estudo do reparo ósseo.

Palavras-chave: Estimulação elétrica; engenharia tecidual; células tronco; látex; seringueira

ABSTRACT

With increased lifespan and bone aging, there is a relevant need for new therapeutic options for fractures and critical bone losses. Tissue engineering emerges to promote injured tissue repair through cells and biological factors. This study aimed to perform the physicochemical characterization of the F1 protein fraction from natural rubber (latex) found in the rubber tree *Hevea brasiliensis* (LXHb), and an in vitro assessment of the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from Wistar rats' bone marrow subjected to electrical stimulation (ES) and cultured with F1 protein fraction, as well as analyzing the gene expression related to osteogenesis. The characterization was performed by Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta Potential for F1 at 1% (10 mg/mL); 0.1% (1 mg/mL) and 0.01% (0.1 mg/mL), at 0, 24, 48 hours after dilution in phosphate-buffered saline (pH 7.4). Different analyzes were carried out for F1 at 0.01% at different pH values, in the presence or absence of sodium chloride (NaCl). Gel filtration chromatography and Protein Quantification Leco CNS analyzer were used for F1 protein characterization. In the analysis of cell viability (MTT Assay) and osteogenic differentiation (Alizarin red) the stimulation was applied by 60s, 150s, and 300s at 10 μ A twice a week, and the cell culture was supplemented with three F1 concentrations. For gene expression analyses, the cells were stimulated by 60s and 300s and supplemented with F1 at 0.1% and 0.01%. By using DLS, two populations of particles were observed regardless of the time for sample preparation. By intensity at 0h after preparation, the particles had an average size of 123.2 and 5227.0 nm (F1-1%), 164.2 and 1187.0 nm (F1-0.1%), 336.0 and 3369.0 nm (F1-0.01%). The Zeta Potential reported null charge for analyzed concentrations at pH 7,4. Protein quantification determined a protein content of 10,2% of in the total mass of the F1 latex fraction. in vitro assays, it was possible to observe in all experimental groups cell viability above 70% (non-cytotoxicity) and osteogenic differentiation above 80% with a higher rate in the ES-60s group associated with F1 at 0,01%. In the gene expression analysis, the *Bmp2* and *Ltype* genes showed a higher rate in the groups stimulated for 60s in both associations with F1-0,1% and 0,01%. As to the *Col1a1* gene, a significant rate was obtained in the 300s-0,1% group. *Alp* e *Runx2* genes showed a higher rate in association with F1-0,01% and the *Camk2* gene in the F1-0,1% groups, both associated with ES-60s and 300s. In conclusion, the F1 protein fraction is a polydisperse system and shows a null charge at pH 7,4. This fraction consists, in total, of a low percentage of proteins, however, with an important biological action regarding the increase of the proliferation and osteogenic differentiation of MSCs, especially when associated with electrical stimulation, making it an option for a promising treatment in regenerative medicine and bone repair studies.

Keywords: Electrical stimulation; tissue engineering; stem cells; latex, rubber tree

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de uma partícula de borracha em látex.	26
Figura 2 - Perfil cromatográfico do soro do látex em pH 9,0.	28
Figura 3 - Equação de Stokes-Einstein.	29
Figura 4 - Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.	31
Figura 5 - Aplicação da estimulação elétrica nos poços da placa de cultura.....	38
Figura 6 – Cromatograma da purificação da fração proteica F1 do látex 100 mg.mL ⁻¹ obtido em colula de gel de filtração superdex 200PG, em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4 a 25°C acoplada ao cromatógrafo líquido AKTA Pure (General Electric).	42
Figura 7 - Resultado da quantificação proteica por %/massa de nitrogênio na amostra da fração F1, gerado pelo software do Analisador elementar CNS (C–CNS) - Leco 928.	44
Figura 8 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A; D; G), número (B; E; H) e volume (C; F; I) da fração proteica F1 do LXHb nas concentrações de 1% (10 mg.mL ⁻¹); 0,1% (1 mg.mL ⁻¹); 0,01% (0,1 mg.mL ⁻¹) nos tempos 0h (A; B; C); 24h (D; E; F) e 48h (G; H; I) após diluição em tampão fosfato-salino (pH 7,4).	46
Figura 9 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A), número (B) e volume (C) da fração proteica F1 do LXHb a 0,01% (0,1 mg.mL ⁻¹) em presença de cloreto de sódio (NaCl) a 0; 10; 20; 30 e 50mmol.L ⁻¹ , em tampão fosfato-salino (pH 7,4).	49
Figura 10 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A), número (B) e volume (C) da fração proteica F1 do látex natural a 0,01% (0,1 mg.mL ⁻¹) diluída em tampões em diferentes valores de pH (3; 5; 7.4; 8; 9 e 10).....	51
Figura 11 - Diferenciação <i>in vitro</i> das células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea em osteoblastos (diferenciação osteogênica), em adipócitos (diferenciação adipogênica) e grupo controle (sem diferenciação) em microscopia com aumento final de 100x.	53
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade (MTT) das CTMs submetidas ao cultivo com a aplicação da fração proteica F1 em diferentes concentrações e da estimulação elétrica 2 vezes na semana nos tempos de aplicação de 60s, 150s e 300s, à 10 µA, após 7 dias. (A) Aplicação de F1 a 0,01%. (B) Aplicação de F1 a 0,001%. (C) Aplicação de F1 a 0,0001%. Teste estatístico <i>One-way ANOVA</i> , pós-teste <i>Tukey</i> e teste <i>Kruskal-</i>	

Wallis com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).54

Figura 13 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea e cultivadas em meio indutor osteogênico sob estimulação elétrica e aplicação de fração proteica P1. A) Aplicação de F1 a 0,01%. B) Aplicação de F1 a 0,001%. C) Aplicação de F1 a 0,0001. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).56

Figura 14 - Imagens de microscopia (aumento final de 100x) do ensaio de mineralização com CTMs derivadas da medula óssea e cultivadas em meio osteogênico com proteína F1 a 0,0001% e aplicação de eletroestimulação.....56

Figura 15 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea e sob estimulação elétrica. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).57

Figura 16 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea em meio osteogênico com proteína F1. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$)......58

Figura 17 - Expressão relativa de (A) ALP, (B) BMP2, (C) RUNX2, (D) COL1A1, (E) LTYPE, (F) CAMK2 ($2^{-\Delta\Delta ct}$). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).64

Figura 18 – Mecanismo de ação da estimulação elétrica em cultura de células semelhantes a osteoblastos.....67

Figura 19 - Via de sinalização do cálcio.67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio TaqMan utilizados na técnica RT-qPCR.	40
Tabela 2 - Tamanho da partícula espalhadora (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão da fração F1 do LXHb obtidas por DLS nas concentrações de 1%; 0,1% e 0,01% em função do tempo de diluição em pH 7,4. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando os três tempos de diluições diferentes.	47
Tabela 3 - Potencial Zeta e tamanho (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para [F1] = 0,01% em função da concentração de cloreto de sódio, em pH 7,4. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando as três medidas independentes...	50
Tabela 4 - Potencial Zeta e tamanho (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para [F1] = 0,01% em função do pH. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando as três medidas independentes.	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEC matriz extracelular

CTMs células tronco mesenquimais

ES estimulação elétrica

LXHb látex da seringueira *Hevea brasiliensis*

LBN látex da borracha natural

DLS Espalhamento Dinâmico de Luz

CGF Cromatografia de Gel Filtração

NH₄OH hidróxido de amônio

NaCl cloreto de sódio

FrHB1 fração 1

FrHB2 fração 2

FrHB3 fração 3

HCl ácido clorídrico

CO₂ dióxido de carbono

SO₂ dióxido de enxofre

O₂ oxigênio

ARS Vermelho de Alizarina

SBF soro bovino fetal

PBS do inglês *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PDI índice de polidispersão

hADMSCs do inglês *Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells* (células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano)

ALP do inglês *alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina)

SHED do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (células tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados)

Dh diâmetro hidrodinâmico

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	21
1.1 Tecido ósseo	21
1.2 Células tronco mesenquimais (CTMs)	23
1.3 Estimulação elétrica	24
1.4 Fração proteica F1 do látex	25
2.OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Parte A: Purificação e Caracterização físico-química da fração F1	32
3.1.1 Obtenção do soro	32
3.1.2 Obtenção da fração F1 por Cromatografia em DEAE-Sepharose	32
3.1.3 Cromatografia de Gel Filtração (CGF).....	33
3.1.4 Quantificação de proteína por Analisador elementar CNS	33
3.1.5 Determinação do Potencial Zeta e do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). 34	
3.2 Parte B: Análise biológica	35
3.2.1 Cultura Celular	35
3.2.2 Caracterização das CTMs	36
3.2.3 Plaqueamentos das CTMs	37
3.2.4 Aplicação da fração proteica F1	37
3.2.5 Aplicação da Estimulação Elétrica	37
3.2.6 Análise de viabilidade celular - método MTT	38
3.2.7 Diferenciação osteogênica das CTMs.....	39
3.2.8 Expressão gênica	40
3.2.9 Análise Estatística	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	41

4.1 Purificação e Caracterização físico-química da fração F1.....	41
4.1.1 Cromatografia de Gel Filtração (CGF).....	41
4.1.2 Quantificação de proteína por Analisador elementar CNS (C–CNS) - Leco 928	42
4.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta em diferentes concentrações de F1 analisadas em função do tempo após a diluição	45
4.1.4 DLS e Potencial Zeta para F1 0,01% em presença de NaCl.....	48
4.1.5 DLS e Potencial Zeta de F1 0,01% em diferentes valores de pH.....	50
4.2 Análise biológica	53
4.2.1 Caracterização das CTMs	53
4.2.2 Análise de viabilidade celular - método MTT	54
4.2.3 Diferenciação osteogênica das CTMs	55
4.2.4 Expressão Gênica	61
5.CONCLUSÃO	68

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, apontado pela Projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), indicando que, até 2043, um quarto da população brasileira terá mais de 60 anos, o estudo do envelhecimento do tecido ganha importância no que se refere ao processo de reparo ósseo. Visto que, em casos de complicações ou má formação tecidual, eleva-se a incidência de morbidade e calcificação. Os tratamentos convencionais já não são suficientes, por isso, se faz necessária a descoberta de novos tratamentos que auxiliem nesse reparo tecidual e na substituição do tecido lesado (GINEBRA; MONTUFAR, 2019).

O tratamento convencional dá-se pela realização de transplantes, como autoenxerto (tecido retirado de uma área do corpo do indivíduo e enxertado em outro ponto), aloenxerto (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie) e xenoenxerto (transplante entre indivíduos de espécies diferentes) (ZHANG, 2016). Porém, apresenta inúmeras desvantagens, como: técnicas invasivas, ausência de suprimento tecidual, necessidade de cirurgias secundárias, desconforto maior do paciente, risco de infecção e até de rejeição (ZHANG, 2016; GINEBRA; MONTUFAR, 2019). Desta forma, em casos onde não há capacidade de regeneração espontânea, há um desafio que vem sendo estudado pela engenharia de tecidos e medicina regenerativa por meio do uso de células vivas para reparar e regenerar os tecidos perdidos ou lesionados.

1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é caracterizado como um tecido conjuntivo especializado, que confere integridade da estrutura do organismo, suporte, proteção dos órgãos internos, produção das células sanguíneas por meio da medula óssea vermelha e armazenamento de cálcio, fosfato e potássio. Em conjunto com as articulações e os músculos, auxilia na locomoção, conferindo resistência, alta mineralização e vascularização (SOUNDARYA *et al.*, 2018; ZAMANI *et al.*, 2020). Esse tecido organiza-se na forma trabecular ou esponjosa (osso esponjoso), que apresenta de 50% a 90% de porosidade, e na forma cortical (osso compacto) com 10% de porosidade, conferindo maior resistência à compressão (HAO; HARRIS, 2008).

A estrutura do tecido ósseo é constituída por uma matriz extracelular (MEC) (SOUNDARYA *et al.*, 2018), constituída de 65% a 70% por uma parte mineral e de

25% a 30% por uma parte orgânica (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). A parte mineral é formada por fosfato e hidróxido de cálcio que, ao se interagirem, formam nanocristais de fosfato e hidroxiapatita (ZAMANI *et al.*, 2020). A orgânica é formada por colágeno tipo I e uma porção celular constituída por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células tronco mesenquimais (CTMs) que conferem manutenção da dinâmica funcional do tecido ósseo (SOUNDARYA *et al.*, 2018).

Os osteoblastos são células que sintetizam os componentes orgânicos da matriz, sendo localizados ao longo da superfície óssea e derivados de CTMs que se diferenciam e expressam genes específicos, tal como: proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), osterix (Osx) e fatores de transcrição relacionados ao *Runx2*, responsável por regular positivamente os genes relacionados aos osteoblastos e demais componentes do tecido ósseo (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Dos osteoblastos, derivam os osteócitos, os quais estão situados nas lacunas ósseas rodeados pela matriz mineralizada e são células que realizam a manutenção da estrutura óssea, exercendo papel importante no transporte intercelular de moléculas de sinalização. Entretanto, essas células não possuem potencial de divisão. Os osteoclastos são células multinucleadas que se originam de CTMs, possuem a função de reabsorção da matriz óssea e mobilização de íons como fosfato e cálcio da matriz extracelular para a corrente sanguínea (LEI, 2019). Podem estar associados com a regulação da matriz óssea, por meio da ativação de CTMs e osteoblastos através de citocinas (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

As células osteoprogenitoras desempenham um papel fundamental na formação e manutenção da MEC, estrutura complexa e organizada que exerce papel essencial na homeostase óssea. Essas células são encontradas, principalmente, nas membranas conjuntivas altamente especializadas: periósteo (revestimento da superfície externa do osso) e o endósteo (revestimento interno do tecido ósseo). As duas membranas são altamente vascularizadas, possibilitando o fluxo de osteoblastos e CTMs, afim de proporcionar o suporte e suprimento celular necessário para o processo de manutenção e reparo ósseo (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015).

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica durante toda a vida do organismo, encontra-se em constante formação e remodelação afim de manter suas capacidades metabólicas e características físicas para reparar pequenos danos (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015; LEI, 2019). Em situações de dano tecidual em pequena dimensão, o tecido ósseo possui capacidade de regeneração por meio do recrutamento de

células, de liberação de fatores de crescimento e citocinas. Porém, em casos de perda óssea significativa, não ocorre adequadamente o processo regenerativo. No local do tecido ósseo perdido, há a formação de tecido fibroso que impede a neovascularização e, conseqüentemente, o processo de reparo, uma vez que é dependente deste. Além disso, este processo também é influenciado por outros fatores, como doenças associadas, idade, metabolismo, entre outros (TANG *et al.*, 2016).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa estudam novas abordagens e tratamentos para promoção do reparo ósseo por meio de três principais pilares: uso de células-tronco, de *scaffolds* (biomateriais) e de bioativos (exemplos: soro, fração proteica do látex) (MIRON; ZHANG, 2012). Em 1994, foi criada a Sociedade da Engenharia Tecidual e Medicina Regenerativa e, desde então, CTMs começaram a ser utilizadas por serem indiferenciadas e não especializadas, capazes de gerar novas células e, em condições fisiológicas ou experimentais, se diferenciarem em outros tipos celulares, possibilitando a formação de um novo tecido (CAETANO *et al.*, 2018).

1.2 Células tronco mesenquimais (CTMs)

As células tronco mesenquimais apresentam capacidade de autorrenovação, replicação, liberação de fatores parácrinos, imunossupressão e imunorregulação, diferenciação multipotente, promovendo a reposição de células de linhagens específicas. Elas podem ser isoladas de diferentes fontes de tecidos, porém as mais utilizados são as derivadas da medula óssea (BM-MSCs – *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) (BLACK *et al.*, 2015; GAO, 2017; LI, 2020).

Nos estudos sobre tratamentos para as lesões ósseas, a utilização de CTMs *in vitro*, provenientes da expansão e diferenciação de células do próprio paciente, vem ganhando relevância, principalmente quando associadas a suportes tridimensionais e agentes indutores como citocinas, fatores de crescimento e agentes externos, tal como a estimulação elétrica (ES - *electrical stimulation*) (MISHRA *et al.*, 2015; GRAY *et al.*, 2016; CAETANO *et al.*, 2018). O uso de ES na cultura de CTMs aponta-se como uma possibilidade promissora de reparo do tecido ósseo, devido às características de piezoelectricidade óssea, auxiliando a atração de células endógenas, induzindo os fatores de diferenciação de CTMs em osteoblastos, a proliferação celular, a síntese de proteínas, citocinas, fatores de crescimento e o aparecimento de novos vasos sanguíneos (GRAY *et al.*, 2016).

Vários fatores de crescimento, liberados pelas células, estão associados à

estimulação da osteogênese e angiogênese, dentre eles os da superfamília dos TGF, podendo acelerar a regeneração do tecido ósseo (STEGEN *et al.*, 2015). Porém, a principal limitação para o uso terapêutico está relacionada ao alto custo e à baixa meia-vida desses fatores (STEGEN *et al.*, 2015). Desta forma, o estudo de moléculas bioativas naturais de baixo custo, tal como a fração proteica do látex natural, vem ganhando relevância para aplicação na engenharia tecidual (ARAVAMUDHAN *et al.*, 2013). Além disso, a associação da fração F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* com a estimulação elétrica vem apresentando resultados promissores e favoráveis ao reparo ósseo (CAETANO *et al.*, 2018).

1.3 Estimulação elétrica

A estimulação elétrica tem mostrado acelerar significativamente o reparo ósseo em modelo animal, por meio da sua capacidade de promover migração, proliferação e diferenciação osteogênica de CTMs através da modulação celular das vias de cálcio e de outros íons. Os mecanismos com os quais a ES regula ou influencia o comportamento das células ainda não foram descobertos, porém observa-se resultados quanto às vias de Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e Cl^- na diferenciação osteogênica. Uma proposta é que a ES aumenta a concentração de cálcio no citosol dos osteoblastos, regulando a função dessas células via calmodulina, por meio da ativação de canais dependentes de cálcio, presentes na membrana celular (SILVA *et al.*, 2021; MOON; LEE; KWON, 2022).

A ES pode induzir, dentro da célula, a movimentação de moléculas eletricamente carregadas, alterando o potencial de membrana e as respostas celulares, como também, podendo atuar na superfície da membrana plasmática para modelação dos estados conformacionais de proteínas de membranas e para ativação do transporte de íons (THRIVIKRAMAN *et al.*, 2018).

O emprego da ES a 10 μA durante 5 minutos em calvária de ratos Wistar demonstraram indícios promissores referente ao potencial de reparo tecidual, apontando uma diminuição do processo inflamatório, um aumento da organização das fibras colágenas, da vascularização tecidual, bem como, modulação favorável do eixo RANK/RANKL/OPG (reguladores da osteoclastogênese) e presença de pontos precoces de calcificação, principalmente, quando a técnica de ES é aplicada, juntamente, com o uso de biomateriais enxertados (SILVA *et al.*, 2021).

Em estudos *in vitro*, a corrente elétrica pode ser aplicada na superfície de crescimento celular ou no meio de cultura. Existem três métodos de ES utilizados na engenharia de tecidos ósseos: corrente contínua, acoplamento capacitivo e acoplamento indutivo (LEPPIK *et al.*, 2020). A corrente contínua utiliza dois eletrodos paralelos imersos diretamente no meio de cultivo (*in vitro*) ou conectados diretamente no tecido alvo (*in vivo*), sendo conectados por uma fonte de energia. O acoplamento indutivo produz a ES por meio de campos eletromagnéticos oscilantes gerados através de bobinas. O acoplamento capacitivo produz a ES através de placas metálicas condutoras, que são colocadas acima e abaixo do tecido alvo, sem contato direto (GRIFFIN; BAYAT, 2011; THRIVIKRAMAN *et al.*, 2018).

Estudos indicam que uma corrente que varia de 10 μA a 50 μA pode estimular a proliferação de osteoblastos, bem como, a expressão de fatores de crescimento para a diferenciação óssea. A formação óssea encontra-se aumentada na tíbia e fêmur de cães e coelhos, com ES de 10 μA a 20 μA , durante diferentes períodos de tempo. No entanto, estimulações acima de 50 μA tem gerado necrose óssea (THRIVIKRAMAN *et al.*, 2018).

Mesmo com os efeitos positivos do uso da ES nas células ósseas, já indicados em estudos, a regeneração óssea localizada e guiada é um desafio, pois ainda não se conhece os mecanismos pelos quais a ES interage com as células, devido, principalmente, às variações no desenho experimental (tempo, intensidade e tipo de aplicação), aos resultados inconsistentes e/ou controversos (SILVA *et al.*, 2021). No entanto, os indícios favoráveis encontrados na literatura sobre a utilização de ES e CTMs na engenharia tecidual requerem a necessidade de uma avaliação profunda dos efeitos desta associação

1.4 Fração proteica F1 do látex

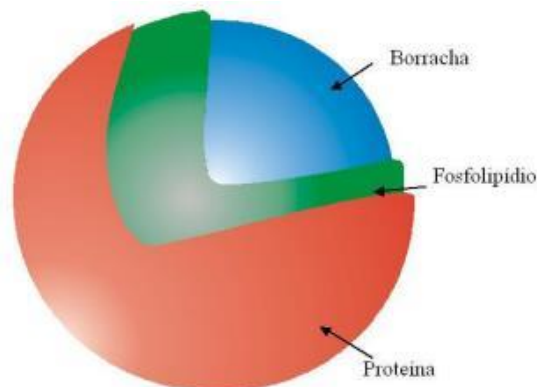
Uma das principais ferramentas da engenharia de tecidos para o estudo da cicatrização está associada ao uso das biomoléculas. O látex extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* (LXHb), apresenta-se como um indutor da proliferação e/ou diferenciação celular por meio do seu potencial angiogênico e de aumento da permeabilidade vascular, como resultado da homologia funcional entre os seus componentes ativos e os fatores de crescimento já muito estudados, como o VEGF, TGF- α , FGF, entre outros (MENDONÇA, 2004). Guerra *et al.* (2021) observaram que, ao se aplicar membranas de látex natural em tecido lesado, uma substância muito

semelhante ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi liberada, reconstruindo veias e artérias e, assim, auxiliando no transporte de nutrientes para o reparo.

Considerado como possível “fator de crescimento-like”, é de fácil isolamento, manuseio e de baixo custo. Segundo Ferreira *et al.* (2009) e Mendonça (2004), que estudaram a influência do látex e de seu soro na atividade neoangiogênica, o aumento da vascularização, promovido pela presença das proteínas do soro, acelerou o recrutamento de células inflamatórias por estímulo da fase inflamatória natural durante o estresse oxidativo, aumentando o aporte de nutrientes, o processo de oxigenação, e a remoção dos resíduos metabólicos, como também, o alcance, do tecido lesado, pelo fibrinogênio e pelos fatores de crescimento.

O látex de borracha natural (LBN) é definido como um sistema coloidal polifásico, constituído por partículas de espécies químicas orgânicas e inorgânicas, como proteína, carboidrato, flavanóide, lipídeo, poli-isopreno *cis* e/ou *trans*, entre outros (LEITE, 2016). Essas partículas são, predominantemente: partículas de borracha 30 a 45% (em massa) do látex, os lutóides que constituem 10 a 20% e os complexos de Frey-Wyssling (**Figura 1**) (AGOSTINI, 2009).

Figura 1 - Modelo de uma partícula de borracha em látex.



Fonte: AGOSTINI (2009).

O látex da *Hevea brasiliensis* é um sistema polidisperso, onde as partículas de borracha apresentam uma composição *cis*-1,4-poliisopreno, com um diâmetro que pode variar de 5 nm até 3.000 nm, com uma pequena quantidade de constituintes não-borracha, oriundos de proteínas e lipídios, que, em associação, formam uma membrana carregada negativamente, que confere estabilidade coloidal ao látex não estabilizado (THEPCHALERM *et al.*, 2014). Quando recém coletado, apresenta pH

entre 6 e 7, ou seja, é em torno deste pH que o látex se encontra na forma natural, sem adição de estabilizantes, com densidade de 0,975 e 0,980 g/cm³ e viscosidade variável, principalmente, com a ruptura dos lutóides em diluição com água (AGOSTINI, 2009).

A amônia serve como um estabilizante, capaz de preservar a integridade do látex durante toda fase experimental, evitando o processo de coagulação natural, em que se observa a formação de uma fase superior coagulada e uma fase inferior aquosa e clara, tendo como principais causas: a ação de microrganismos reagindo com compostos não borracha e o efeito à liberação de ânions de ácidos graxos através da hidrólise de várias substâncias lipídicas presentes no látex. Portanto, em casos de coagulação, o pH é reduzido para 5 e este processo pode ser acelerado pela adição de pequenas quantidades de sabões. Além disso, o tempo no qual o látex pode ser mantido sem coagular é aumentado se os cátions do mesmo são removidos (AGOSTINI, 2009).

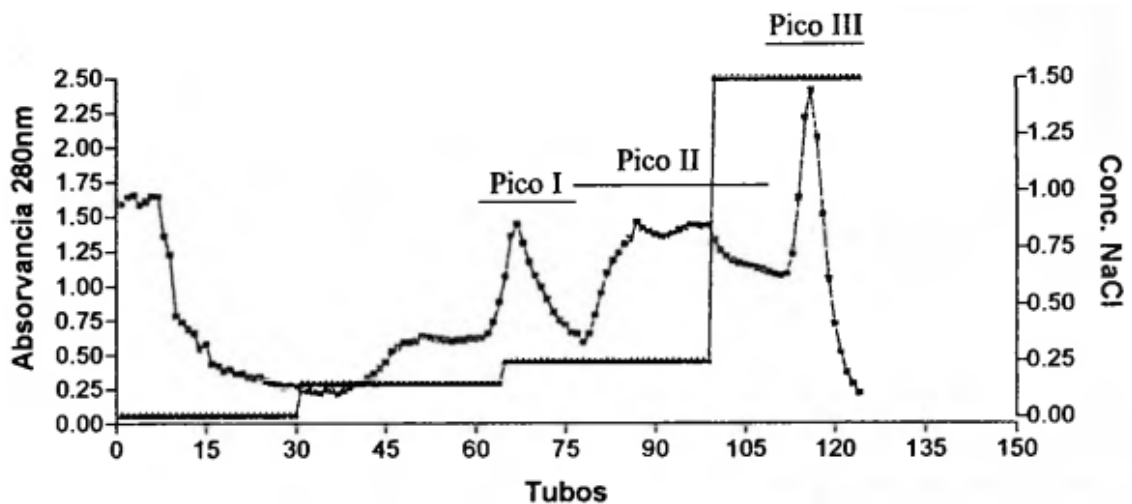
O soro do látex apresenta densidade de 1,020 g/cm³ e contém carboidratos, eletrólitos, proteínas e aminoácidos. O principal carboidrato é o quebrachitol (ou 1-metil inositol) e, caso o látex não seja adequadamente preservado, esse açúcar é oxidado a ácido volátil (fórmico, acético e propiônico). O soro apresenta 48% de proteínas (parte que confere o potencial de angiogênese e de aumento da permeabilidade vascular), além de bases nitrogenadas, aminoácidos, ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), sais minerais, sais de rubídio, manganês, sódio, potássio, cobre, magnésio, ferro e zinco (AGOSTINI, 2009).

Daruliza *et al.* (2011) relataram que o soro B do látex (NRL) apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans*, promovendo inibição do crescimento das leveduras. Sugere-se que essa atividade antifúngica seja atribuída aos polifenóis presentes no soro (MUBARAK *et al.*, 2018). Herculano *et al.* (2024) discutiram sobre estudos do soro de látex natural e seu elevado potencial para desenvolvimento de agentes anticancerígenos, podendo ser utilizado como medicamento para diminuir os efeitos colaterais mais graves.

Do soro, por meio de purificação e técnicas de cromatografia de troca iônica, é possível obter, de forma liofilizada, picos proteicos distintos (**Figura 2**), sendo o pico P1, a fração mais ativa (F1). Essa fração apresenta o maior potencial angiogênico e induz o aumento da permeabilidade vascular, facilitando o vazamento de água e macromoléculas e melhorando o fluxo de células imunes, fatores de crescimento e

nutrientes, através da parede do vaso, para o local da lesão (HERCULANO *et al.*, 2024). Estudos mostram que CTMs, tratadas com soro ou fração F1 a 0,01%, apresentaram maior atividade cicatrizante e deposição de matriz extracelular (MENDONÇA, 2004), sendo esta fração F1 (pico 1 da **Figura 2**) objeto de estudo desta dissertação.

Figura 2 - Perfil cromatográfico do soro do látex em pH 9,0.



Fonte: MENDONÇA (2004).

Mendonça (2004) mencionou, em seu trabalho, estudos que comprovam a utilização das biomembranas de látex para cicatrização de feridas em caso de lesões leves e graves, gerando adesão celular e estimulando várias células envolvidas nessa cicatrização, acelerando, assim, o tempo de cura. Bem como, Caetano *et al.* (2018) realizaram tratamento das CTMs com fração proteica do látex solubilizado em meio de cultura osteogênico e observaram efeitos positivos na diferenciação osteogênica acelerada por meio da fosfatase alcalina.

Balabarian *et al.* (2006) avaliaram a biocompatibilidade do látex natural ao implantar grânulos de látex em cavidades ósseas alveolares pós extração dental de ratos e foi demonstrado que o houve compatibilidade, integração com o osso, aceleração da cicatrização e do reparo ósseo.

Para a melhor eficiência na utilização do látex e de seus componentes, se faz relevante a avaliação físico-química do mesmo por meio das técnicas de Potencial Zeta, de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Cromatografia Líquida em Gel de separação (CGF) e Quantificação Proteica de F1. O Potencial Zeta é “a medida do

potencial elétrico entre a superfície externa da camada compacta e o meio líquido no qual se desenvolve”, interferindo na estabilidade da molécula por medir a atração ou repulsão entre as cargas das partículas (PECORA, 2000). Já a determinação do tamanho e da distribuição das partículas pela técnica de DLS leva em consideração o Movimento Browniano das moléculas em suspensão, com base na teoria da equação de Stokes-Einstein (**Figura 3**). Quando uma fonte de luz, com frequência conhecida e em um determinado ângulo, é incidida sobre as partículas em movimento, a luz se espalha com frequências diferentes, e assim, é possível correlacionar o tamanho dessas partículas com a mudança na frequência de luz (PECORA, 2000).

Figura 3- Equação de Stokes-Einstein.

$$D = \frac{kBT}{3\pi\eta\alpha d}$$

Fonte: ARIYAWIRIYANANA *et al.* (2013).

As partículas de borracha, com a adição da amônia para estabilização, diminuem seu tamanho e o valor do Potencial Zeta aumenta em módulo, devido à alteração das propriedades do látex, possivelmente, pela interação entre as proteínas na superfície, a hidrólise e a ação de inibição de alguns constituintes não borracha (SILVA, 2017).

De acordo com Blackley (1997), o tamanho médio do látex, com base no DLS, encontra-se entre 20 e 5.000 nm. Em pH básico (8-12), há estabilidade do sistema coloidal, apresentando valores negativos de Potencial Zeta, que variam entre -65 mV e -50 mV. No trabalho de Ariyawiriyanan *et al.* (2013), o látex apresentou Potencial Zeta entre -30 e +30 e diâmetro médio na faixa de 440 – 805 nm. Silva *et al.* (2015) observaram que todos os clones da borracha da seringueira *Hevea brasiliensis* apresentaram valores negativos, variando entre -41,4 mV a -57,5mV, e tamanho médio, com maior contagem, no intervalo de 180,0 nm a 192,1 nm.

A cromatografia de gel filtração (CGF) é utilizada para purificação de proteínas, e consiste na exclusão por tamanho molecular. A fase estacionária é composta por partículas esféricas distribuídas que conferem uma porosidade controlada à resina. Conforme a porosidade, as moléculas da amostra se difundem e são separadas por tamanho. A fase móvel é um tampão aquoso (DINIZ, 2019) e o detector de UV é

configurado no comprimento de onda a 280 nm (os anéis aromáticos de vários aminoácidos das proteínas em solução absorvem a luz ultravioleta nesse comprimento).

Mendonça (2004) utilizou a técnica de cromatografia de troca iônica e Morais *et al.* (2024), a cromatografia de troca aniônica fraca para separação das frações proteicas do soro do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* e observaram o aparecimento de três frações, Fração 1 (FrHB1), Fração 2 (FrHB2) e Fração 3 (FrHB3). Contudo, ainda não existem resultados já publicados sobre a purificação apenas da fração F1. Assim como, não existem metodologias e resultados para análise da quantidade de proteínas presentes em F1.

Dessa forma, o presente estudo objetivou caracterizar as propriedades físico-químicas e padronizar metodologias e ensaios voltados à purificação e quantificação das proteínas da fração proteica F1 do látex, assim como estudar o emprego da estimulação elétrica e da fração proteica F1 do látex natural afim de acelerar e/ou potencializar a proliferação e/ou diferenciação osteogênica de CTMs da medula óssea.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar físico-quimicamente a fração proteica (F1) do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* e estudar a associação de F1 com a estimulação elétrica na diferenciação osteogênica das células tronco da medula óssea de ratos Wistar e correlacioná-los como possíveis tratamentos biotecnológicos na engenharia tecidual óssea.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar físico-quimicamente a fração proteica F1 por técnicas de Cromatografia Líquida de Gel Filtração, Quantificação de Proteína, Espalhamento de luz e Potencial Zeta;
- b) Avaliar a toxicidade da fração proteica F1 em meio de cultura;

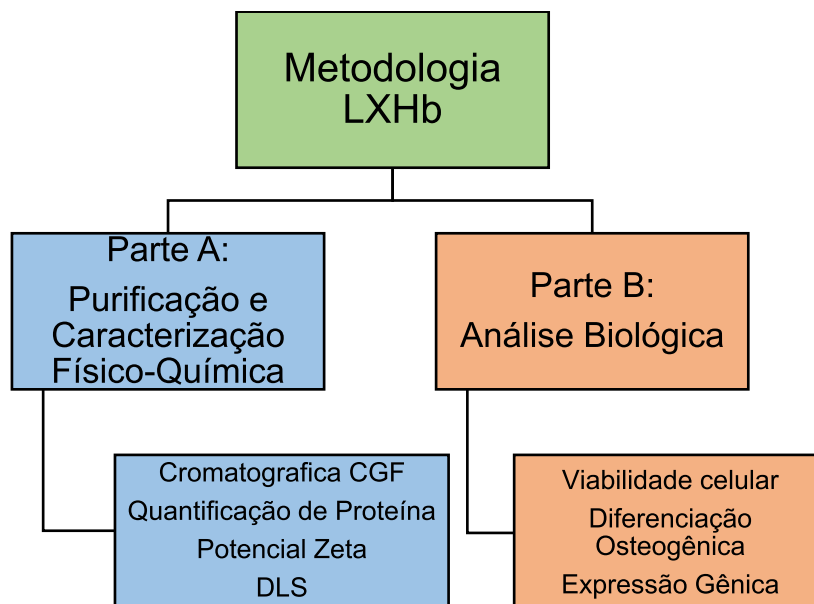
c) Avaliar o estímulo osteogênico da fração proteica F1 em associação com a corrente elétrica nas células tronco da medula óssea animal por meio da avaliação bioquímica, colorimétrica e de expressão gênica.

3. METODOLOGIA

Para a execução da parte prática, o estudo contou com a colaboração do professor Dr. Ricardo Mendonça da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba-MG, que doou gentilmente a fração proteica F1 do LXHb, na forma liofilizada.

A metodologia deste trabalho baseou-se em duas vertentes: Parte A) purificação e caracterização físico-química, por meio de técnicas de Cromatografia de Gel Filtração (CGF), Quantificação de Proteína por Analisador Elemental, Potencial Zeta, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS); Parte B) análise biológica por viabilidade celular, diferenciação osteogênica e expressão gênica, conforme descrito no fluxograma abaixo (**Figura 4**). A parte A foi realizada no Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR) e no laboratório de Biomoléculas da Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - Câmpus de Registro-SP e a parte B no laboratório de Cultura Celular da Fundação Hermínio Ometto de Araras-SP.

Figura 4- Fluxograma da metodologia utilizada no presente estudo.



Fonte: elaborado pela Autora.

3.1 Parte A: Purificação e Caracterização físico-química da fração F1

3.1.1 Obtenção do soro

De acordo com Mendonça (2004), o látex natural extraído da seringueira *Hevea brasiliensis* pelo processo de incisão em espiral foi cedido pelo Instituto de Ciências e tecnologias da UNESP de Presidente Prudente – SP, contendo 5% de amônia (1 mol.L⁻¹) como estabilizante. O soro foi obtido da diluição com ácido acético a 5%, na proporção de 1:2 (v/v). A solução foi agitada cuidadosamente com um bastão de vidro até a completa coagulação espontânea da borracha. A solução ficou em repouso absoluto por 30 minutos, para que o processo de retração do coágulo se iniciasse. O soro total de aspecto límpido e amarelado foi decantado.

O restante do soro foi obtido após a compressão mecânica do coágulo. Deste material, retiraram-se alíquotas para realização dos testes de atividade biológica. O pH do soro foi elevado para pH 9 com NH₄OH 1 mol.L⁻¹, determinando-se a quantidade de base utilizada para cálculo aproximado da força iônica final, essencial para reprodutibilidade nos procedimentos cromatográficos. Devido à precipitação de proteínas durante o processo de ajuste do valor de pH o soro precisou ser filtrado em filtros de poro 1 µm (Millipore).

3.1.2 Obtenção da fração F1 por Cromatografia em DEAE-Sepharose

De acordo com Mendonça (2004), para a separação das frações do soro, utilizou-se a técnica de cromatografia de troca iônica. Foi utilizada uma coluna de vidro (20 cm x 2,2 cm) preenchida com matriz DEAE-Sepharose (Sigma-Aldrich), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,8). Uma alíquota do soro foi descongelada e aplicada na coluna em uma câmara fria com temperatura de 8°C. Em seguida, foi realizada a eluição com tampão bicarbonato de amônio 0,01 mol.L⁻¹ em gradiente crescente de concentração de NaCl (0 mol.L⁻¹; 0,25 mol.L⁻¹; 0,5 mol.L⁻¹; 1,5 mol.L⁻¹ de NaCl).

Foi empregado um fluxo de 1mL.min⁻¹ e o eluato coletado em tubos de ensaio através de um coletor (Gilson®), monitorado por um espectrofotômetro Micronal® no comprimento de onda de 280 nm. O material identificado de acordo com seu perfil cromatográfico foi separado em três frações, Fração 1 (FrHB1), Fração 2 (FrHB2) e Fração 3 (FrHB3), correspondentes ao pico I, pico II e pico III da **Figura 2**,

respectivamente, e em seguida cada fração foi submetida à diálise contra água destilada, liofilizadas e armazenadas a -80°C .

3.1.3 Cromatografia de Gel Filtração (CGF)

Para a separação das proteínas presentes na fração proteica F1 do LXHb, empregou-se a técnica de cromatografia líquida por exclusão de tamanho em gel de filtração. Foi utilizada uma coluna de vidro do tipo Superdex 200 10/300 (30 cm x 10 mm) em cromatógrafo líquido AKTA Plus (General Electric), equilibrada com tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 7,4). Uma alíquota de $100 \mu\text{L}$ da fração F1 a 10% (p/v), diluída em tampão Tris-HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 (100 mg.mL^{-1}) foi aplicada no cromatógrafo por meio de um loop de $100 \mu\text{L}$, acoplado a um filtro de poro $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore).

Foi empregado um fluxo de $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$ e o eluato foi coletado em tubos de ensaio através de um coletor (Gilson®), monitorado por um espectrofotômetro Micronal® com comprimento de onda de 280 nm. O material foi identificado de acordo com seu perfil cromatográfico e centrifugado a 13.000 rpm por 10 min em centrífuga refrigerada, para obtenção de um concentrado de amostra. Em seguida, foi armazenado sob congelamento a -20°C para posteriores avaliações.

3.1.4 Quantificação de proteína por Analisador elementar CNS

A quantificação proteica da fração F1 foi realizada por meio do Analisador elementar CNS, 928 (LECO) disponível no parque tecnológico do Instituto de Estudos Avançados do Mar - IEAMar, Pólo de Registro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Para a determinação da quantidade de nitrogênio presente na fração F1, foi analisado 92,75 mg da amostra, pesada em barcas de cerâmica. O equipamento foi acionado pelo software, onde se padronizaram as vazões dos gases de combustão e de arraste, O_2 ($0,1 - 0,5 \text{ L/análise}$) e He ($500/1000 \text{ L.min}^{-1}$), respectivamente. A temperatura de trabalho foi de 1350°C .

O padrão utilizado como referência para a calibração (standard), com % de nitrogênio mais próximo do esperado para a amostra de látex foi o SOIL LCRM- PART nº 502-697 (Carbono $3,05 \pm 0,03\%$, nitrogênio $0,251 \pm 0,00\%$ e enxofre $0,0037 \pm 0,006\%$). Realizou-se uma curva de padronização com concentrações crescentes e em triplicata do padrão (50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg e 250 mg). E, posteriormente, a leitura de duas amostras do padrão, em massa aproximada (100,01 e 100,13 mg) da

quantidade real disponível de amostra de látex para realização do *Drift* (instabilidade) antes da leitura efetiva da amostra.

As colunas de detecção foram montadas em função da modalidade selecionada, dentro da capacidade do equipamento e do gás resultante da combustão e, assim, coletou-se uma alíquota de 3 mm para análise de amostra e calibração.

A detecção dos gases, por um detector de condutividade térmica, foi realizada na respectiva ordem: N₂, CO₂ e SO₂. Os resultados das análises foram calculados pelo próprio software e apresentados em %massa. Foi utilizado o fator de conversão de proteína (*protein factor*) de 6,25 em relação ao teor de N presente na amostra, conforme descrito pelo método de Kjeldahl (LOCATELLI, 2018). O resultado foi exportado em forma de gráfico pelo próprio software do equipamento.

3.1.5 Determinação do Potencial Zeta e do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para a determinação do Potencial Zeta e do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) da fração proteica F1 liofilizada foi utilizado o software Zetasizer Advance Pro, Malvern S4700 versão 1.27 (ARIYAWIRIYANANA *et al.*, 2013). Todas as determinações foram realizadas após 10 leituras de cada amostra e a construção dos gráficos pelo programa OriginPro 8.5 (EUA).

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e nas seguintes condições: (1) diferentes concentrações da fração F1 (1%; 0,1% e 0,01%) em tampão PBS pH 7,4 a 0, 24 e 48h após o preparo da amostra; (2) F1 a 0,01%, em tampão PBS pH 7,4, com adição crescente de NaCl (0 a 50 mmol.L⁻¹ de NaCl); (3) F1 a 0,01% diluído em tampão acetato-fosfato-borato 30 mmol.L⁻¹ em diferentes valores de pH (na faixa de pH 3 a 10). Nas condições 2 e 3 as amostras foram analisadas logo após o preparo das diluições. Para as leituras de DLS e Potencial Zeta, todas as amostras foram filtradas em filtros com poros de 0,2 µm.

As determinações de DLS foram realizadas por intensidade, número e volume de partículas espalhadoras.

As análises de F1 a 0,01% (0,1 mg.mL⁻¹), em pH 7,4 (tampão fosfato-salino), também foram realizadas com adição de cloreto de sódio (NaCl) com gradiente descontínuo e crescente (0 mmol; 5 mmol; 10 mmol; 20 mmol; 30 mmol e 50 mmol.L⁻¹), após preparo do estoque de NaCl a 0,5 mol.L⁻¹. Para as análises de diluição a

0,01% em diferentes pH, utilizou-se tampões a 3; 5; 7.4; 8; 9 e 10, todas as leituras foram feitas em seguida às diluições ($t = 0h$).

Foram analisados os coeficientes de difusão para cada concentração de F1 de acordo com a relação Stokes-Einstein (**Equação 1**), na qual o diâmetro hidrodinâmico das partículas apresenta-se como uma grandeza inversamente proporcional ao coeficiente de difusão.

$$d_i = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

(1)

Onde, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do solvente, d é o diâmetro hidrodinâmico calculado das nanopartículas e D é o coeficiente de difusão.

3.2 Parte B: Análise biológica

3.2.1 Cultura Celular

Para o desenvolvimento deste trabalho, todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética nº 014/2022 e conduzidos em ambiente estéril (fluxo laminar), assim como os materiais utilizados. As células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos Wistar (com aproximadamente 90 dias) foram extraídas do fêmur. Os animais foram eutanasiados por meio de anestesia com Cloridrato de Ketamina 10% (60 mg.kg⁻¹ peso), Cloridrato de Xilazina 2% (20 mg.kg⁻¹ peso) até anestesia profunda, seguido de deslocamento cervical. O fêmur foi extraído, eliminando-se todo músculo e tecido conjuntivo associados, e transferido para um tubo cônico de 50 mL contendo 15 mL de meio de transporte. Os fêmures dos tubos cônicos foram transferidos para um novo tubo com etanol a 70%, onde permaneceram por 5 minutos.

A uma seringa de 20 mL com meio de cultura Alpha MEM 10% foi anexada uma agulha 21G. O fêmur foi segurado com uma pinça para a realização do corte das epífises com uma tesoura estéril. Por meio da técnica de *flushing*, a agulha da seringa foi inserida na diáfise e toda a medula óssea foi lavada (com o meio Alpha MEM 10%) em um novo tubo cônico de 15 mL. O tubo foi centrifugado por 10 min a 1.300 rpm, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio Alpha MEM 10%

(suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% L-glutamina e 1% de antibiótico- antifúngico).

Toda suspensão celular foi transferida para uma garrafa de cultura de 75 cm² com 9 mL de meio α -MEM 10% e mantidas na estufa em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar a 37 °C. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e as passagens ou subcultivos foram realizados quando a cultura atingiu 80% de confluência. As células foram empregadas na experimentação em 4^a, 5^a ou 6^a passagens.

3.2.2 Caracterização das CTMs

Para avaliação da multipotência das CTMs da medula óssea, induziu-se, *in vitro*, por 14 dias, a diferenciação em adipócitos e osteoblastos. As CTMs (1x10⁴ células) foram distribuídas nas placas de cultura de tecido contendo 24 poços, em três grupos experimentais: cultivadas em meio osteogênico, meio adipogênico e meio basal.

Nos poços destinados à diferenciação em adipócitos, adicionou-se o meio indutor de adipogênese (meio α -MEM com 10% SFB, 1 μ M de dexametasona, 10 μ g/mL de insulina, 100 μ M de indometacina, 1% de glutamina e 1% de antibiótico). Nos poços destinados à diferenciação osteogênica, adicionou-se o meio indutor de osteogênese (meio α -MEM suplementado com 7,5% de SBF, 0,1 μ M de dexametasona, 200 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerolfosfato, 1% de glutamina e 1% de antibiótico), como previamente descrito por CAETANO *et al.*, 2018. Alguns poços foram cultivados em meio basal para controle (meio α -MEM suplementado com 7,5% de SBF, 1% de glutamina, 1% de antibiótico).

As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e os meios de cultura foram trocados 3 vezes por semana. Após 14 dias do início do processo de diferenciação *in vitro*, todos os poços de cultura foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS). Os poços com diferenciação adipogênica foram lavados também com etanol a 70%.

Os poços destinados à diferenciação adipogênica foram corados com Sudan IV 2% e os poços de diferenciação osteogênica; com o Vermelho de Alizarina (ARS) 0,2%, baseando-se na coloração do cálcio durante o processo de mineralização (POH *et al.*, 2016). Em microscopia invertida, foram adquiridas imagens, no intuito de visualizar os processos de diferenciação.

3.2.3 Plaqueamentos das CTMs

Cerca de 1×10^4 células foram suspensas em 500 μL de meio de cultura α -MEM suplementado com 10% de SBF, 1% L-glutamina e 1% de antibiótico- antifúngico e semeados em cada poço da placa de cultura de 24 poços. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C. Após 24 horas de adesão celular, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de meio α -MEM 7,5% ou meio osteogênico, de acordo com o ensaio proposto.

3.2.4 Aplicação da fração proteica F1

A fração proteica F1 foi ressolubilizada em tampão PBS, em pH 7,4 nas seguintes concentrações:

- ✓ 1% (10 mg.mL^{-1} de F1)
- ✓ 0,1% (1 mg.mL^{-1} de F1)
- ✓ 0,01% (0,1 mg.mL^{-1} de F1)

Após 24 horas do plaqueamento das CTMs e adesão celular, foi adicionado 10 μL de cada solução de F1 mencionada acima em cada poço de cultura, contendo 1 mL de meio, para o cultivo nas concentrações finais da fração F1 de:

- ✓ 0,01% (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de F1)
- ✓ 0,001% (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de F1)
- ✓ 0,0001% (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de F1)

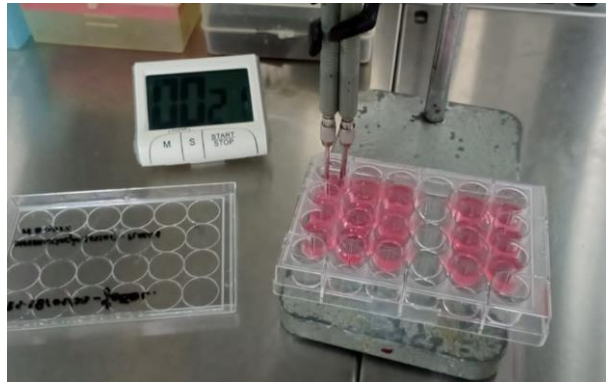
3.2.5 Aplicação da Estimulação Elétrica

A aplicação da estimulação elétrica (ES) foi realizada nas culturas de células de CTMs de forma direta e contínua, utilizando um equipamento transcutâneo de baixa intensidade (Physiotonus Microcurrent, BIOSET®, Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda., Rio Claro, SP, Brasil), (**Figura 5**).

Após as 24 horas de adesão celular, os poços das placas foram divididos e nomeados de acordo com os períodos e intensidades de aplicação da ES, a saber: aplicações 2 vezes por semana durante 60s, 150s e 300s; na intensidade de 10 μA .

Dois eletrodos de metal, acoplados ao equipamento, foram previamente imersos em etanol a 70% por 10 minutos, secos com gaze estéril e submersos no poço com meio de cultura, sem atingir o fundo, onde as células estavam aderidas. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias.

Figura 5- Aplicação da estimulação elétrica nos poços da placa de cultura.



Fonte: própria.

3.2.6 Análise de viabilidade celular - método MTT

A análise da viabilidade celular das CTMs foi determinada pelo ensaio colorimétrico MTT (Sigma-Aldrich). As células metabolicamente ativas foram capazes de reduzir o composto químico 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (amarelo e solúvel em água) em cristais roxos de formazan (insolúvel em água), solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO).

Em placas de cultura com 24 poços, as CTMs foram cultivadas e suspensas em 500 μL de meio de cultura α -MEM 10% e incubadas na estufa com 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$. Após 24 horas de adesão celular, o meio foi retirado dos poços e substituído por meio basal α -MEM 7,5% (suplementado com 7.5% de SBF, 1% L-glutamina e 1% de antibiótico- antifúngico). Foram preparados 5 grupos para cada uma das três concentrações da fração F1: i. F1 associado à ES por 60s; ii. F1 associado à ES por 150s; iii. F1 associado à ES por 300s; iv. apenas F1; v. controle (sem F1 e sem ES).

Todos os grupos experimentais foram realizados em triplicata. Durante os 7 dias de experimentação, o meio de cultura foi trocado e suplementado por 3 vezes e a estimulação realizada 2 vezes.

Ao término desses dias, todo meio de cultura foi removido dos poços da placa, lavados com tampão PBS e suplementados com 300 μL de solução estoque de MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em PBS). As placas foram incubadas por 2 horas, em ausência de luz. Após a incubação, retirou-se a solução de MTT e foi adicionado 300 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) para que os cristais se dissolvessem. A densidade ótica foi obtida utilizando leitor de ELISA *Biotek* em comprimento de onda a 540 nm. A quantidade de células viáveis foi proporcional ao valor de absorbância. Os resultados

foram obtidos considerando células do grupo controle (sem ES e sem F1) como 100% de viabilidade.

3.2.7 Diferenciação osteogênica das CTMs

A diferenciação osteogênica das CTMs foi determinada pela mineralização promovida pelo cálcio, por meio do método colorimétrico (corante vermelho de alizarina – ARS 0,2%).

Após adesão celular em placas de cultura de 24 poços, as CTMs foram cultivadas em 1 mL, por poço, de meio de cultura indutor de osteogênese (meio α -MEM suplementado com 7,5% de SBF, 0.1 μ M de dexametasona, 200 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β - glicerolfosfato, 1% de glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina), como previamente descrito (CAETANO *et al.*, 2018).

Os grupos experimentais foram semelhantes aos descritos no ensaio de viabilidade (item 2.7) e realizados em triplicata. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. A cada semana, o meio de cultura foi trocado e suplementado por 3 vezes e a estimulação realizada duas vezes.

Após os 14 dias de ensaio, o meio foi descartado e os poços lavados, cuidadosamente 3 vezes com PBS pH 7,4 e, então, corados com ARS 0,2% por 20 minutos a temperatura ambiente. O corante foi retirado e os poços lavados com PBS 2 vezes. Em microscopia invertida, foram adquiridas imagens, no intuito de visualizar o processo de mineralização por cálcio.

Posteriormente, foi adicionado 300 μ L de ácido acético a 10% e a densidade ótica foi obtida utilizando leitor de ELISA *Biotek* em comprimento de onda a 450 nm. A quantidade de mineralização foi proporcional ao valor de absorbância. Os resultados foram obtidos considerando células do grupo controle (sem ES e sem F1) como 100% de diferenciação osteogênica.

Também foram realizados ensaios de diferenciação osteogênica apenas com aplicação da estimulação elétrica (i. aplicação de ES por 60s; ii. aplicação de ES por 150s; iii. aplicação de ES por 300s; iv. sem aplicação de ES - controle) e apenas com o emprego da fração proteica F1 (i. F1 a 0,01%; ii. F1 a 0,001%; iii. F1 a 0,0001%; iv. sem F1 – controle).

3.2.8 Expressão gênica

Foram investigados os genes relacionados à osteogênese pela técnica de RT-PCR em tempo real (**Tabela 1**). As amostras de CTMs cultivadas foram coletadas pelo processo de tripsinização e o isolamento do RNA foi realizado com o reagente TRIzol™ (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A concentração das amostras de RNA e sua qualidade foram mensuradas em espectrofotômetro, levando em consideração as razões A260/280 e A260/230.

O cDNA foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA total com o kit *High Capacity* (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante e utilizado como amostra em uma reação de 10 µL contendo água *nuclease free*. Os valores foram normalizados com o gene endógeno *Eif2b1*. Os resultados foram calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 1 - Ensaios TaqMan utilizados na técnica RT-qPCR.

Genes	Funções
<i>Runx2</i>	Diferenciação de CTMs em osteoblastos imaturos
<i>Bmp2</i>	Auxilia na formação óssea e mineralização
<i>Alp</i>	Mineralização
<i>Col1a1</i>	Confere resistência e elasticidade
<i>Camk2</i>	Promove a expressão de genes relacionados a osteoclastogênese
<i>Ltype</i>	Promove o influxo de Ca ²⁺

Fonte: elaborada pela Autora.

3.2.9 Análise Estatística

Para as avaliações de viabilidade e diferenciação celular foram considerados 3 poços da placa de cultura para cada grupo experimental. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Posteriormente, para uma melhor análise dos resultados, foi utilizado o teste de análise de variância *One-way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* e *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn* para determinação das diferenças existentes entre os grupos experimentais. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 5% ($p < 0.05$). Os testes estatísticos, bem como a construção dos gráficos, foram realizados pelo programa GraphpadPrism 8.0 (EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Parte A

4.1 Purificação e Caracterização físico-química da fração F1

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização da fração proteica F1 do LXHb através das análises de Cromatografia de Gel Filtração, Quantificação proteica, Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta. Como mencionado anteriormente, o intuito deste trabalho foi avaliar a pureza da fração F1 do LXHb, definir o teor proteico de F1 e avaliar a estabilidade do tamanho das partículas, bem como, as cargas de superfície da fração, com a presença do cloreto de sódio (NaCl) e com a variação do pH.

4.1.1 Cromatografia de Gel Filtração (CGF)

Com o intuito de melhor caracterizar a fração proteica F1 do LXHb, realizou-se a cromatografia de Gel Filtração, afim de se observar as proteínas presentes, mediante separação por exclusão de tamanho. Na **Figura 6**, é possível constatar que a fração proteica não se comporta como uma substância pura, principalmente, por apresentar diferentes picos, alargados e com valores de absorbância variáveis, reafirmando que esta fração F1 do LXHb é uma biomolécula instável, formada por partículas de tamanhos distintos. É possível observar, principalmente, a presença de dois picos de absorbância, indicados na figura abaixo por setas, que correspondem a duas populações de partículas proteicas.

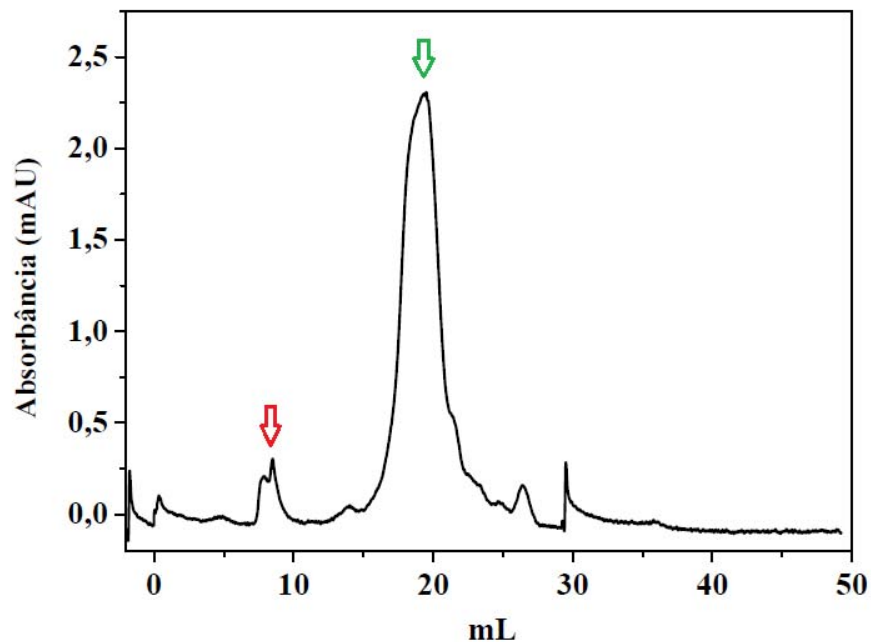
Considerando que essa técnica permite a separação das moléculas pelo tamanho e que as maiores biomoléculas eluem da coluna de gel em maior velocidade, bem como, aplicando a equação de Lambert-Beer (**Equação 2**), onde a absorbância é diretamente proporcional à concentração do analito, compreende-se que a primeira população, indicada pela seta vermelha, apresenta tamanho de partícula maior, porém absorbância e concentração menores. Já a seta verde indica a população de proteína com menor tamanho, mas absorbância e concentração maiores, confirmando o resultado de maior contribuição (%) dessas partículas na análise por espalhamento de luz.

$$A = \varepsilon bC$$

(2)

Onde, A é a absorvância, ε é o coeficiente de absorvidade molar, b é o caminho ótico e C é a concentração do analito.

Figura 6 – Cromatograma da purificação da fração proteica F1 do látex 100 mg.mL⁻¹ obtido em colula de gel de filtração superdex 200PG, em tampão Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4 a 25°C acoplada ao cromatógrafo líquido AKTA Pure (General Electric).



Fonte: elaborada pela Autora.

Estas frações foram coletadas e posteriormente serão analisadas por eletroforese monodimensional e espectrometria de massas, com o intuito de avaliarmos as purezas e as massas molares destas biomoléculas.

4.1.2 Quantificação de proteína por Analisador elementar CNS (C–CNS) - Leco 928

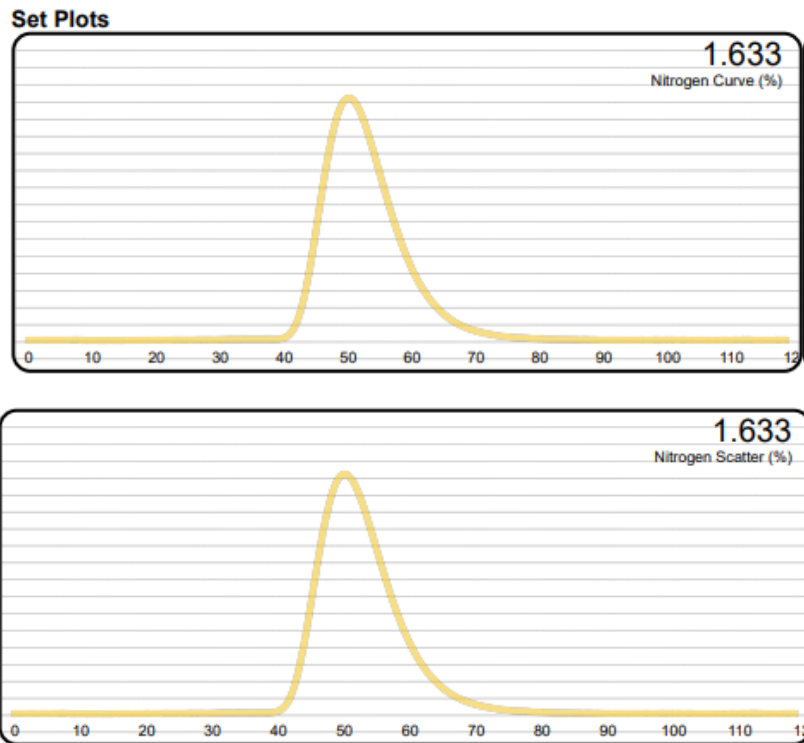
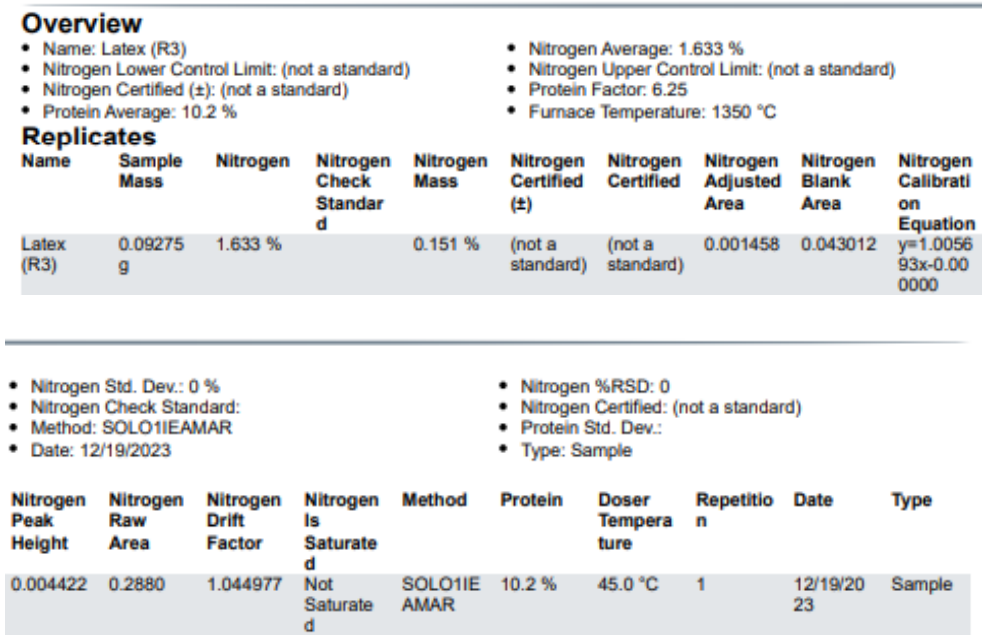
Por meio dos resultados processados pelo software do Analisador elementar CNS-928, os quais estão apresentados na **Figura 7**, foi possível constatar que a fração proteica F1 é constituída, em massa, por 1,633% de nitrogênio, sendo assim, 10,2% de proteína, baseado no fator de conversão 6,25 (LOCATELLI, 2018). Por meio dessa porcentagem, é possível observar que a quantidade de proteína não é tão expressiva, não configurando essa fração como totalmente ou em grande parte proteica. Sendo assim, é possível compreender que a terminologia desse composto

angiogênico como fração proteica tem como foco a sua ação biológica, já comprovada por diferentes estudos (MENDONÇA, 2004) e por esse trabalho, não se referindo, então, a sua composição química.

Segundo Duan *et al.* (2006), o látex é rico em diferentes compostos, como sais minerais, lipídios, hidratos de carbono, sistemas de membranas complexas e as proteínas. Os resultados de quantificação já comprovados na literatura referem-se à quantificação proteica do látex total e do soro que, segundo Agostini (2009), correspondem a 1,8% e 48%, respectivamente.

Os dados da fração proteica corroboram com resultados encontrados em experimentos similares da albumina sérica bovina (BSA) da Sigma-Aldrich $\geq 98,0\%$ de pureza. Ao realizar a análise por meio do software CNS, constatou-se o teor de massa de 99,6% da BSA.

Figura 7- Resultado da quantificação proteica por %/massa de nitrogênio na amostra da fração F1, gerado pelo software do Analisador elementar CNS (C-CNS) - Leco 928.



Fonte: Software do Analisador elementar CNS (C-CNS) - Leco 928 (2023).

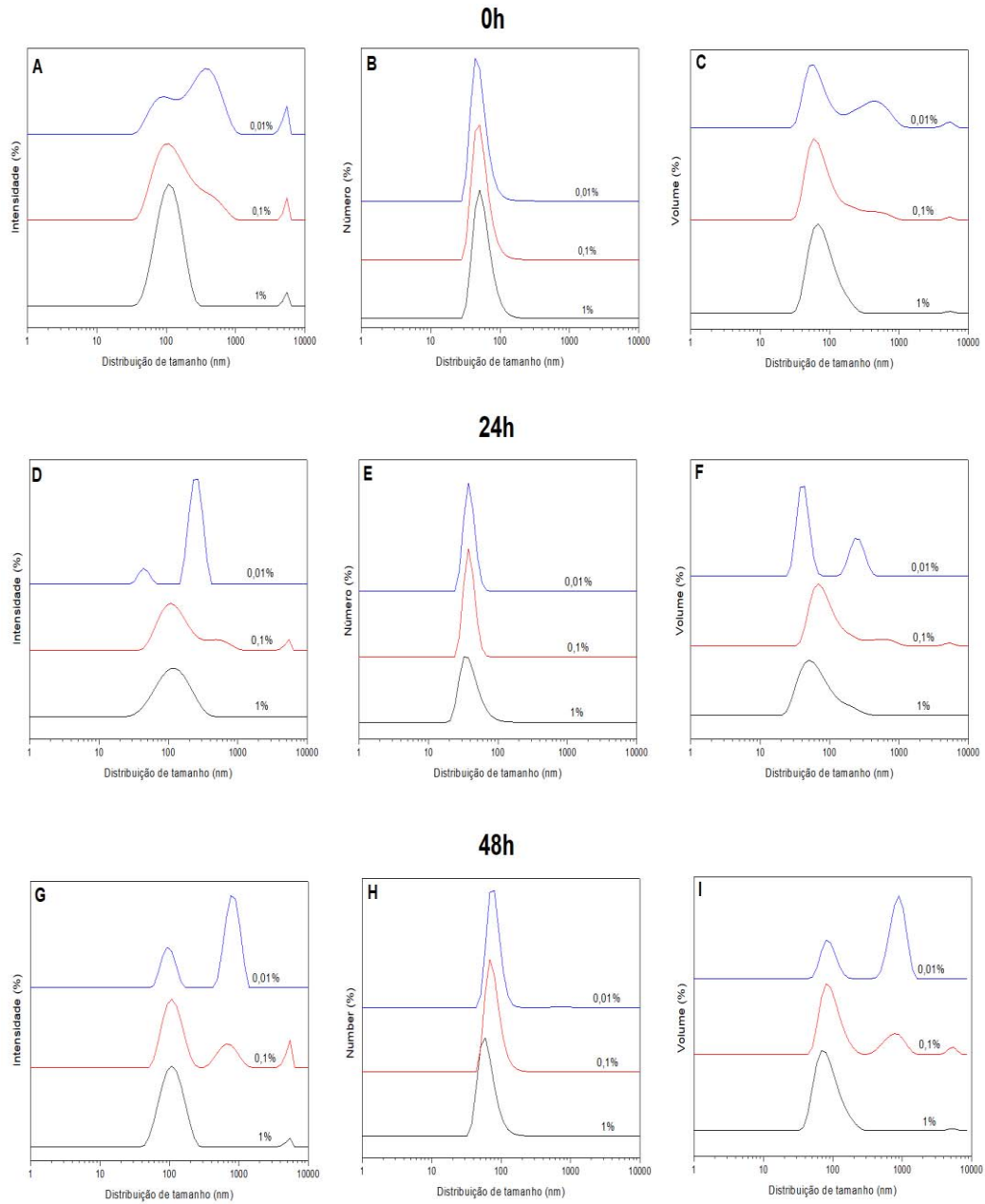
4.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz e Potencial Zeta em diferentes concentrações de F1 analisadas em função do tempo após a diluição

As distribuições de tamanho por intensidade, número e volume de partículas espalhadoras da fração proteica F1 do LXHb em pH 7,4 são apresentadas na **Figura 8**. Na **Tabela 2**, são apresentados estes dados de forma sumarizada. Nota-se que partículas/agregados ≥ 100 nm dominam o sinal por intensidade em todas as amostras analisadas, de modo que a distribuição por intensidade e volume da partícula indicam majoritariamente o estado de aglomeração/agregação das partículas de látex (MENÉNDEZ-MANJÓN; BARCIKOWSKI, 2011; SILVA, 2017). Todavia, ao analisar os resultados de DLS por distribuição de número, percebe-se que tais partículas/aglomeradas estão presentes em menor quantidade, indicando que a maioria das partículas apresentam diâmetros ≤ 100 nm. Para os ensaios a 0h após diluição, os resultados por intensidade apresentaram populações com maior contribuição em 123,2 nm (98,4%) para F1 a 1%; 164,2 nm (79,8%) para F1 a 0,1% e 336,0 nm (78,5%) para F1 a 0,01%. Condizendo com os resultados de Silva (2017) – 20 a 5000 nm - e de Ariyawiriyanan *et al.* (2013) – 440 a 805 nm, indicando que a diminuição da concentração de F1 promove o aumento do diâmetro das partículas.

O índice de polidispersão fornece informações sobre a homogeneidade de distribuição dos tamanhos e está relacionado com o movimento browniano das partículas solubilizadas (PECORO, 2000). Os valores de polidispersão variaram entre as concentrações, corroborando com a afirmação de Thepchalerm *et al.* (2014) de que o látex é um sistema polidisperso. Os resultados demonstraram que F1 a 1% apresentou polidispersão menor em todos os tempos de análise, o que sugere um sistema mais homogêneo aumentando-se a concentração de látex.

Desta forma, os resultados descritos acima corroboram com os resultados do índice de polidispersão (PDI). Ao analisar as amostras recém diluídas (0 h) em tampão PBS pH 7,4 em função da concentração observa-se que amostras mais concentradas apresentam uma menor polidispersão quando comparada com as de menores concentrações (0,31; 0,42; 0,54 para as concentrações de 1; 0,1 e 0,01 % respectivamente). Vale salientar que o mesmo comportamento é observado para as amostras que foram analisadas após 24 e 48 horas pós preparo. Sugerindo que as amostras apresentam uma certa estabilidade em função do tempo.

Figura 8 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A; D; G), número (B; E; H) e volume (C; F; I) da fração proteica F1 do LXHb nas concentrações de 1% (10 mg.mL^{-1}); 0,1% (1 mg.mL^{-1}); 0,01% ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) nos tempos 0h (A; B; C); 24h (D; E; F) e 48h (G; H; I) após diluição em tampão fosfato-salino (pH 7,4).



Fonte: elaborada pela Autora.

Tabela 2 - Tamanho da partícula espalhadora (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão da fração F1 do LXHb obtidas por DLS nas concentrações de 1%; 0,1% e 0,01% em função do tempo de diluição em pH 7,4. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando os três tempos de diluições diferentes.

Tempo (h)	F1 (%)	Intensidade		Número		Volume		Coeficiente Difusão ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Índice de polidispersão (PDI)
		(nm)	%	(nm)	(%)	(nm)	(%)		
0h	1%	123,2	98,4	63,7	100,0	92,3	99,4	4,42	0,31
		5227,0	2,1			5309,0	0,8		
	0,1%	164,2	79,8	73,7	100,0	132,8	71,4	2,67	0,42
		1187,0	22,7			1221,0	33,0		
	0,01%	336,0	78,5	46,3	100,0	257,9	43,8	2,00	0,54
		3369,0	16,0			1516,0	33,9		
24h	1%	123,5	97,6	54,5	100,0	85,2	99,3	4,69	0,30
		4962,0	3,2			5099,0	0,9		
	0,1%	118,7	75,1	60,0	100,0	86,8	89,4	2,96	0,41
		1080,0	23,2			1122,0	10,0		
	0,01%	342,2	82,6	85,5	100,0	58,4	56,6	1,76	0,61
		64,2	16,8			352,9	43,1		
48h	1%	122,5	99,2	58,9	100,0	88,8	99,7	4,97	0,26
		5006,0	1596,0			5134,0	0,5		
	0,1%	118,3	58,6	89,6	100,0	106,3	70,2	1,88	0,46
		396,7	39,8			419,8	29,1		
	0,01%	799,6	70,1	557,9	100,0	850,5	65,7	0,52	0,70
		96,0	28,4			87,3	33,6		

Fonte: elaborado pela Autora.

Analisando os resultados obtidos do tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmica), dos valores de índice de polidispersão (PDI) e coeficiente de difusão ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) (**Tabela 2**) observa-se que todas as concentrações de fração F1 analisadas por intensidade e volume apresentaram uma distribuição bimodal para tamanho das partículas, assim como descrito por Silva (2017). Por número, todas as concentrações obtiveram uma distribuição unimodal. Os diâmetros efetivos encontrados apresentaram-se na faixa de 30 a 5500 nm, muito próximos aos descritos na literatura por Blackley (1997) de 20 a 5000 nm.

O tempo de análise, após diluição, não interferiu de forma significativa na média dos valores de PDI e de difusão para nenhuma das concentrações. Todos os valores de Potencial Zeta foram nulos, sugerindo que o ponto isoelétrico da fração proteica F1

está por volta de pH 7,4, o que de certa forma favorece a agregação/aglomeração das partículas nestas condições.

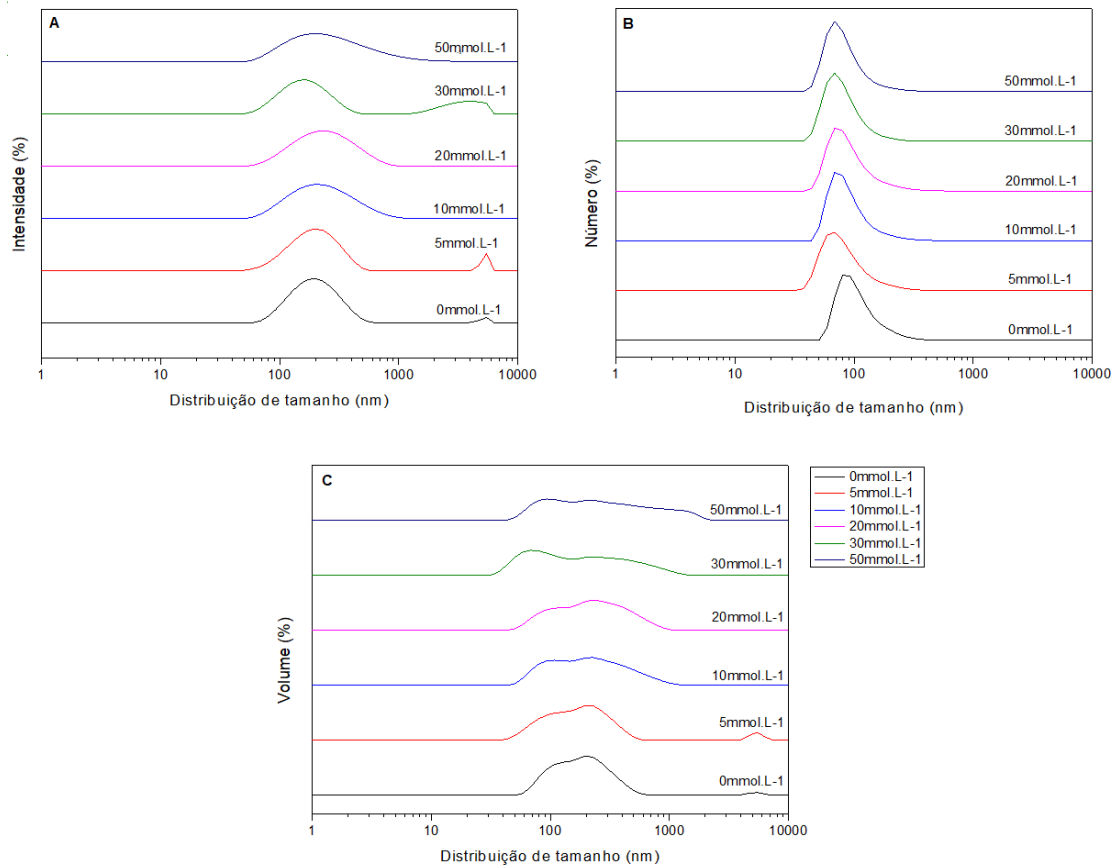
Pela **Tabela 2**, também é possível observar que, ao se diminuir a concentração de F1, o diâmetro das partículas aumenta e os valores de coeficiente de difusão diminuem, corroborando com a correlação dessas grandezas demonstrada pela relação Stokes-Einstein (**Equação 1**).

4.1.4 DLS e Potencial Zeta para F1 0,01% em presença de NaCl

De acordo com os resultados descritos na **Tabela 3** e apresentados na **Figura 9**, é possível observar que não houve alteração na distribuição bimodal por intensidade e volume, assim como na unimodal por análise de número de partículas. Os diâmetros hidrodinâmicos analisados por intensidade e volume não apresentaram alteração, permanecendo em uma faixa de 30 a 5500 nm. Na análise por número, que corresponde a grande maioria das partículas presentes em solução, na faixa de concentração de NaCl de 0 a 20 mmol.L⁻¹, as partículas apresentaram $D_h \leq 100$ nm. Acima de 30 mmol.L⁻¹, na análise por número de partículas espalhadoras, observa-se uma grande contribuição de partículas maiores, apesar de não ser observado um aumento significativo dos valores de PDI.

Os valores de Potencial Zeta analisados para as amostras da fração proteica F1 do LXHb a 0,01 % na presença de diferentes concentrações de NaCl não apresentou alteração, permanecendo nulo. Sugerindo que, nas condições analisadas, a agregação entre as partículas é favorecida.

Figura 9 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A), número (B) e volume (C) da fração proteica F1 do LXHb a 0,01% ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em presença de cloreto de sódio (NaCl) a 0; 10; 20; 30 e 50mmol.L⁻¹, em tampão fosfato-salino (pH 7,4).



Fonte: elaborada pela Autora.

Tabela 3 - Potencial Zeta e tamanho (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para [F1] = 0,01% em função da concentração de cloreto de sódio, em pH 7,4. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando as três medidas independentes.

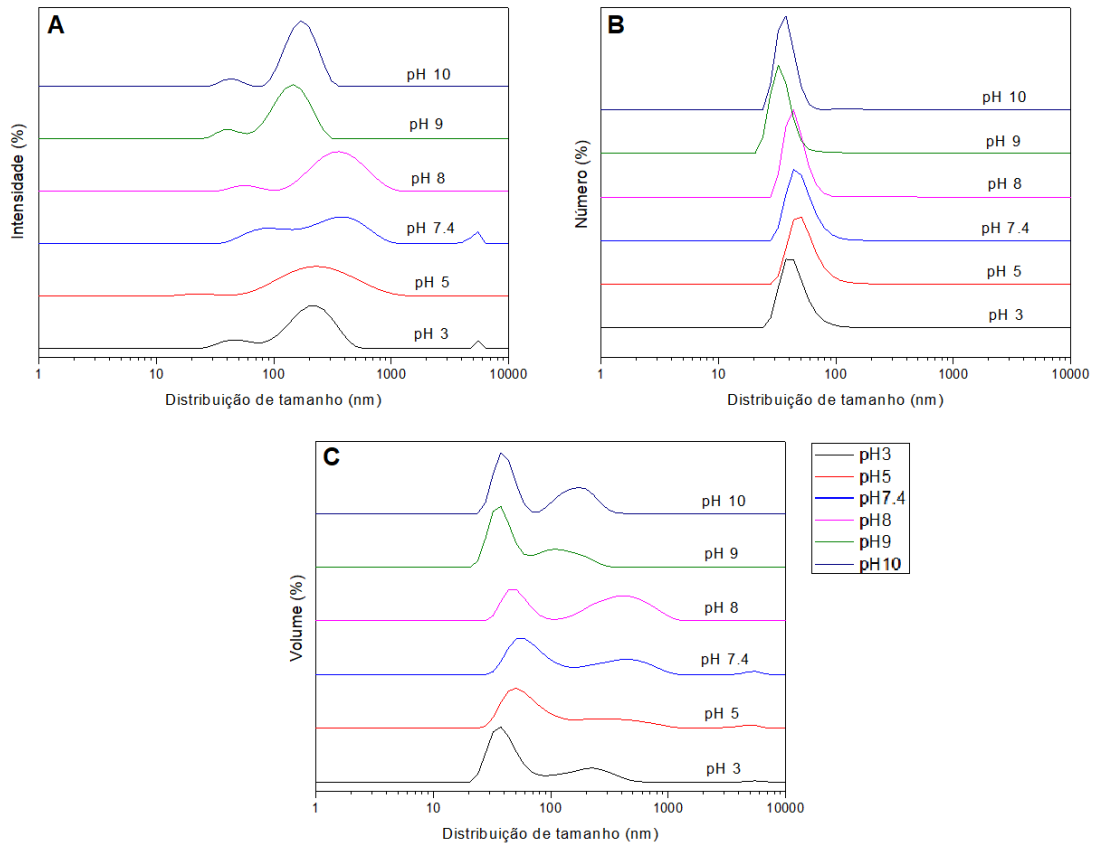
F1	NaCl	Intensidade		Número		Volume		Coeficiente Difusão	Índice de polidispersão
(%)	(mmol.L-1)	(nm)	%	(nm)	(%)	(nm)	(%)	($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	(PDI)
0,01%	0mmol.L-1	224,1	94,7	44,1	100,0	66,3	57,2	2,74	0,32
		3973,0	5,1			884,4	23,8		
	5mmol.L-1	270,3	86,2	53,0	100,0	110,8	54,0	1,69	0,51
		4031,0	13,2			943,0	39,0		
	10mmol.L-1	264,9	95,9	55,5	100,0	81,9	51,9	2,76	0,45
		4374,0	6,2			387,5	38,6		
20mmol.L-1	262,6	99,6	98,1	100,0	236,6	91,2	2,58	0,28	
	4529,0	2,7			322,1	60,0			
30mmol.L-1	268,8	97,0	43,3	100,0	57,5	56,3	2,79	0,41	
	34,2	13,8			288,2	37,0			
50mmol.L-1	253,2	95,9	28,8	100,0	158,7	58,7	2,20	0,34	
	2467,0	4,9			954,1	46,6			

Fonte: elaborada pela Autora.

4.1.5 DLS e Potencial Zeta de F1 0,01% em diferentes valores de pH

A análise de DLS (**Figura 10**) para distribuição do tamanho das partículas foi realizada com intuito de observar a influência do valor do pH no tamanho efetivo das partículas de látex solubilizadas em tampões com variação de pH (3; 5; 7,4; 8; 9 e 10).

Figura 10 - Distribuição do tamanho de partículas por intensidade (A), número (B) e volume (C) da fração proteica F1 do látex natural a 0,01% ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) diluída em tampões em diferentes valores de pH (3; 5; 7.4; 8; 9 e 10).



Fonte: elaborada pela Autora.

Tabela 4 - Potencial Zeta e tamanho (nm), representatividade de espalhamento no sistema (%), coeficiente de difusão e índice de polidispersão de populações obtidas por DLS para [F1] = 0,01% em função do pH. Os valores indicados foram divididos por análise de intensidade, número e volume de partículas espalhadoras de luz, considerando as três medidas independentes.

F1	pH	Intensidade		Número		Volume		Coeficiente Difusão ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)
		(nm)	%	(nm)	(%)	(nm)	(%)			
0,01%	3	232,5	94,0	110,0	100,0	205,0	61,7	1,85	0,43	10,02
		2177,0	8,0			58,6	56,5			
	5	324,5	94,2	34,1	100,0	521,0	55,0	2,37	0,40	4,26
		4700,0	7,0			4558,0	28,5			
	7	405,9	78,5	56,1	100,0	495,8	43,8	2,00	0,54	0
		5121,0	16,0			68,5	33,9			
	8	432,5	96,9	46,1	100,0	529,8	78,8	1,82	0,30	-45,36
		5012,0	4,7			5100,0	31,9			
	9	150,7	96,6	33,0	100,0	120,3	79,8	2,77	0,34	-48,26
		4850,0	8,0			5086,0	35,4			
	10	298,0	96,9	38,6	100,0	312,4	76,9	2,24	0,31	-55,9
		45,6	8,3			42,0	61,3			

Fonte: elaborada pela Autora.

O diâmetro hidrodinâmico da fração proteica F1 do LXHb no pH 3,0 apresentou um valor de PDI de 0,43 e na análise por distribuição de número de partícula espalhadora o valor de D_h foi de 110,0 nm, com Potencial Zeta de +10,02 mV. Acima do pH 5,0 o tamanho da partícula (na distribuição por número de partícula espalhadora) foi na faixa de 30 a 56 nm, já na análise por intensidade e volume o D_h ficou na faixa de 150 a 5000 nm.

Na **Tabela 4**, é possível observar que a variação de pH alterou os valores de Potencial Zeta. O aumento do valor de pH de 7,4 para 8, 9 e 10, favoreceu valores negativos de Potencial Zeta, indicando grande estabilidade coloidal nessas condições analisadas, uma vez que nessa faixa de pH 8-12, o látex apresenta-se na forma de um sistema estável, assim como descrito por Silva (2017). Os valores variaram, aproximadamente, de -45 a -56 mV, próximos aos apresentados por Silva *et al.* (2015). Em pH 3 e 5, afirma-se que o sistema é instável.

O coeficiente de difusão apresentou uma pequena diminuição em pH 8 e a polidispersão foi menor na faixa de pH de 8 a 10, o que confirma a presença de um sistema coloidal estável e, assim, menos polidisperso.

Parte B

4.2 Análise biológica

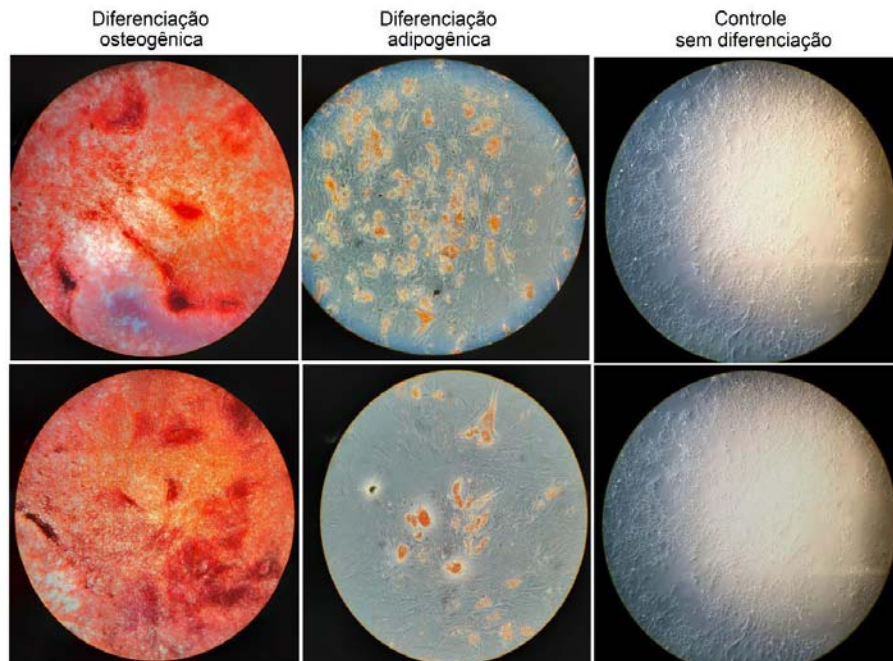
4.2.1 Caracterização das CTMs

As CTMs foram submetidas à indução da diferenciação adipogênica e osteogênica por 14 dias, por meio de resposta celular aos indutores de adipogênese e osteogênese. Para controle do ensaio, algumas células foram cultivadas em meio basal α -MEM 7,5%.

A **Figura 11** apresenta imagens obtidas por microscopia invertida com aumento final de 100x, após coloração das células. Na diferenciação osteogênica, o corante vermelho de alizarina (ARS 0,2%) cora o processo de mineralização por cálcio, enquanto o Sudan IV cora as gotículas de lipídios formadas dentro da célula após a diferenciação adipogênica.

Por meio das imagens, é possível observar que as células se diferenciaram tanto em osteoblastos, quanto em adipócitos, de forma expressiva, se comparadas ao controle.

Figura 11 - Diferenciação *in vitro* das células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea em osteoblastos (diferenciação osteogênica), em adipócitos (diferenciação adipogênica) e grupo controle (sem diferenciação) em microscopia com aumento final de 100x.



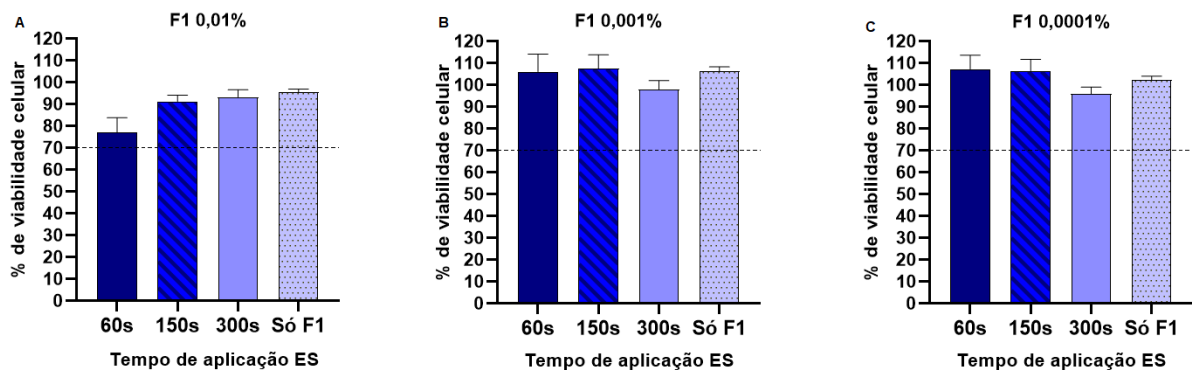
Fonte: própria.

Os resultados de caracterização descritos corroboram o potencial de diferenciação osteogênica das CTMs. O fácil isolamento e a multipotencialidade dessas células, como descrito por Li (2020), permitem a elaboração desses ensaios *in vitro* para o estudo das biomoléculas e dos bioativos considerados capazes de promoverem a diferenciação osteogênica (STEGEN *et al.*, 2020).

4.2.2 Análise de viabilidade celular - método MTT

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método MTT, onde as células viáveis são capazes de metabolizar o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio e reduzi-lo a cristais de formazan. As células foram cultivadas por 7 dias em meio basal (α -MEM 7,5%). Para quantificação da viabilidade, solubilizou-se os critais em DMSO para a leitura da densidade ótica por espectrofotometria, a taxa de viabilidade foi calculada considerando o grupo controle (sem ES e sem F1) com 100% de células viáveis (**Figura 12**).

Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade (MTT) das CTMs submetidas ao cultivo com a aplicação da fração proteica F1 em diferentes concentrações e da estimulação elétrica 2 vezes na semana nos tempos de aplicação de 60s, 150s e 300s, à 10 μ A, após 7 dias. (A) Aplicação de F1 a 0,01%. (B) Aplicação de F1 a 0,001%. (C) Aplicação de F1 a 0,0001%. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).



Fonte: elaborada pela Autora.

Após a caracterização das CTMs, foi avaliada a viabilidade celular frente à aplicação da fração F1 e da estimulação elétrica, isoladamente e em associação. Os resultados demonstraram que, empregando a maior concentração de F1 - 0,01% (**Figura 12A**), todos os grupos experimentais apresentaram as menores taxas de viabilidade celular, todas inferiores ao controle (100%). Nessa concentração, a viabilidade maior (95%) foi do grupo apenas suplementado com a fração proteica.

Quando associado F1 e ES, o menor tempo de aplicação (60s) resultou no menor número de células viáveis (77%), se comparado às demais durações de ES.

Nas concentrações de F1 a 0,001% e 0,0001% (**Figura 12B e 12C**), observa-se similaridade no padrão de resultados. Em ambas concentrações, a aplicação apenas da fração e a associação da mesma com ES por 60s e 150s apresentaram taxas de viabilidade acima de 100%. Porém, a associação, nessas duas concentrações, elevou a taxa de viabilidade, quando comparado ao grupo não estimulado. O grupo com duração de ES por 300s apresentou a menor taxa (0,001% - 97,8% e 0,0001% - 95,7%), inferior ao controle.

Não houve, no entanto, diferenças significativas entre os grupos experimentais. Assim, é possível observar, em todos os grupos, que as três concentrações de fração proteica F1 (0,01%; 0,001% e 0,0001%) e os três tempos de duração da aplicação de ES (60s; 150s e 300s) apresentaram taxa de viabilidade acima de 70%, o que implica em não citotoxicidade *in vitro* às CTMs.

4.2.3 Diferenciação osteogênica das CTMs

As CTMs foram cultivadas, por 14 dias, em meio osteogênico suplementado com a fração proteica F1 do látex natural (0,01%; 0,001% e 0,0001%) e estimulado pela microcorrente (60s; 150s e 300s). A diferenciação osteogênica foi avaliada pela mineralização de cálcio por meio do corante vermelho de alizarina (ARS 0,2%). A **Figura 13** descreve as taxas de mineralização, após leitura da densidade ótica por espectrofotometria a 450 nm, todos os valores foram calculados considerando o controle (sem ES e sem F1) como sendo 100% de mineralização.

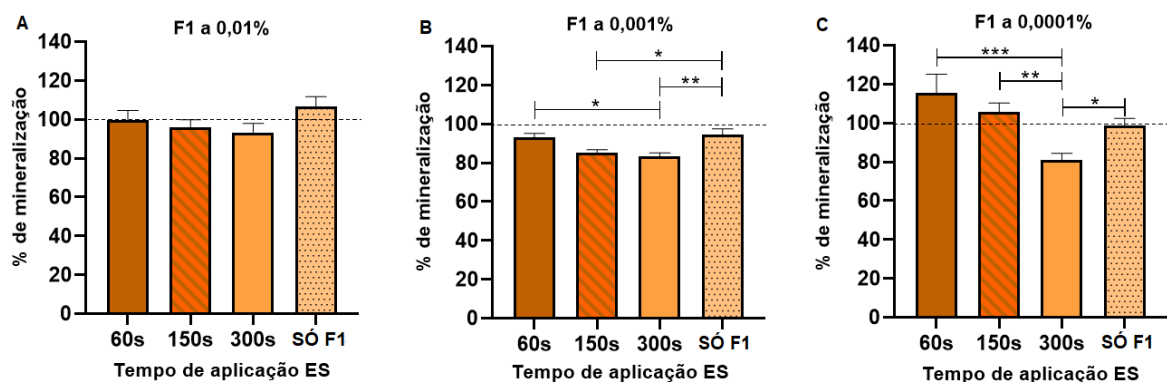
Observa-se que, para as três concentrações de F1, a associação com ES apresentou o mesmo perfil de resultados: o aumento da duração de aplicação da estimulação resultou em menor mineralização, portanto, em menor diferenciação osteogênica. Os grupos suplementados com F1 a 0,01% (**Figura 13A**) não apresentaram diferença estatística significativa e a maior taxa de mineralização foi apresentada pelo grupo não estimulado (106%).

Empregando a concentração intermediária (**Figura 13B**), é possível observar que não houve taxas superiores ao controle em nenhum grupo experimental. Porém, aplicando ES por 60s, houve um aumento de 10% na mineralização se comparado à ES por 300s. A suplementação apenas com F1 resultou em diferenciação superior à apresentada pela associação de F1 com ES 150s e 300s ($p < 0,05$).

Os grupos suplementados com F1 a 0,0001% (**Figura 13C**) apresentaram taxas superiores a 100% em associação a ES por 60s e 150s, com melhor resultado no menor tempo de aplicação (116%). O aumento da duração de ES para 300s, diminui em 35% a taxa de mineralização, comparado à ES 60s, em 25% à ES 150s e em 18% se comparado ao grupo não estimulado ($p < 0,05$). Visivelmente, por meio da microscopia, também foi possível observar essa mineralização mais intensa pela alizarina ao menor tempo de ES (**Figura 14**).

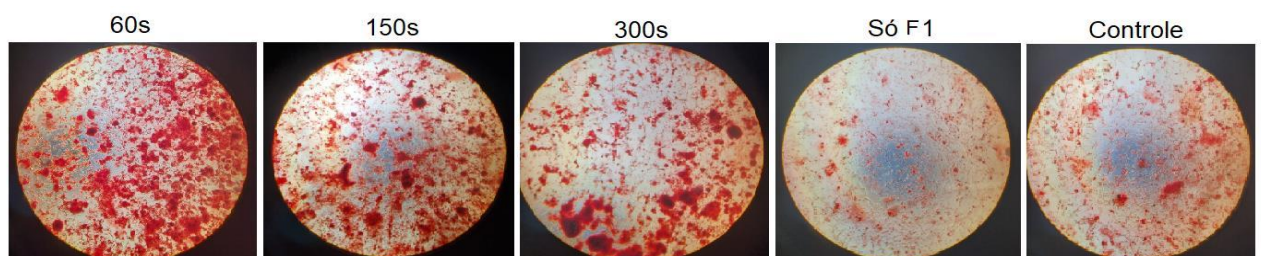
Em todos os grupos houve mineralização com taxas acima de 80%, indicando que a utilização de meio indutor osteogênico, a suplementação com a fração nas três concentrações e a aplicação da ES nos 3 tempos de duração contribuíram positivamente para a diferenciação osteogênica das CTMs isoladas da medula óssea.

Figura 13 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea e cultivadas em meio indutor osteogênico sob estimulação elétrica e aplicação de fração proteica P1. A) Aplicação de F1 a 0,01%. B) Aplicação de F1 a 0,001%. C) Aplicação de F1 a 0,0001. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 14 - Imagens de microscopia (aumento final de 100x) do ensaio de mineralização com CTMs derivadas da medula óssea e cultivadas em meio osteogênico com proteína F1 a 0,0001% e aplicação de eletroestimulação.



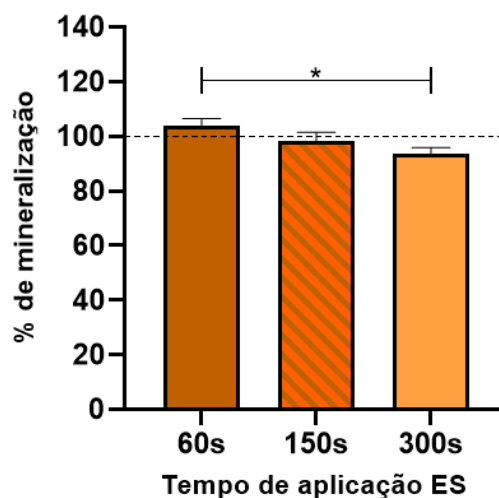
Fonte: própria.

Para análise aprofundada dos resultados, realizou-se ensaio de mineralização apenas com a aplicação da estimulação elétrica e apenas com o emprego da fração proteica F1, afim de se observar a indução da diferenciação osteogênica. Conforme **Figura 15** e **Figura 16**, é possível observar um perfil decrescente da taxa de mineralização e, assim, da diferenciação osteogênica, em função do aumento da duração de aplicação da estimulação e um perfil crescente dessa taxa em função da diminuição da concentração de F1.

Aplicando a microcorrente por 60s, a taxa de mineralização apresentou um aumento de 10% ($p < 0,05$) e, suplementando o meio com a fração proteica a 0,0001%, observou-se taxa de mineralização 30% maior em relação à F1-0,01%, corroborando com os resultados do ensaio de diferenciação osteogênica com emprego de F1 e ES em associação.

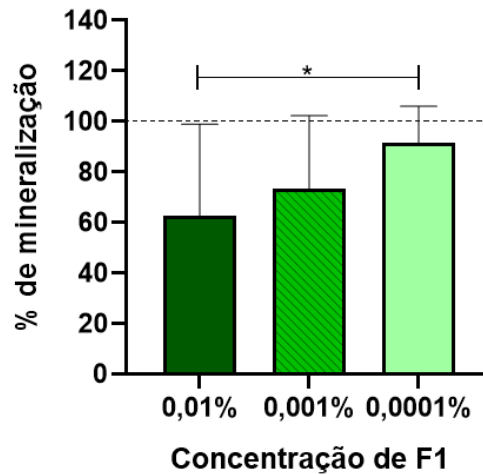
Empregando apenas a estimulação nas CTMs, as taxas de mineralização foram mais altas do que nos grupos apenas suplementados com a fração. Porém, em associação, alguns grupos apresentaram as maiores taxas dentre todos os ensaios, indicando que, a ES e a fração não são citotóxicas para a célula, assim como demonstrado nos ensaio de viabilidade (**Figura 12**) e que a associação de ES+F1 intensificou o estímulo para a diferenciação osteogênica.

Figura 15 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea e sob estimulação elétrica. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pela Autora.

Figura 16 - Ensaio de mineralização de CTMs *in vitro* derivadas da medula óssea em meio osteogênico com proteína F1. Teste estatístico *One-way ANOVA*, pós-teste *Tukey* e teste *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pela Autora.

Apesar de diversos estudos analisarem as respostas das CTMs frente ao emprego da ES, os mecanismos pelos quais a estimulação interage com as células ainda não foram compreendidos, indicando a necessidade de maior investigação e padronização do modo de aplicação, como valor de amperagem e tempo de duração (GRIFFIN; BAYAT, 2011).

De modo geral, os trabalhos que utilizam a fração F1 do látex natural mostraram que ela desempenha papel importante na diferenciação osteogênica por meio de sua atividade neoangiogênica e de aumento da permeabilidade vascular (FERREIRA *et al.*, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2004). O uso de F1 a 0,01% em *scaffolds* de grafeno e policaprolactona acelerou o processo de proliferação das células tronco derivadas do tecido adiposo e aumentou o processo de diferenciação osteogênica (CAETANO *et al.*, 2018). Mrue *et al.* (2004) utilizou uma biomembrana feita com o látex da *Hevea brasiliensis* para a cicatrização de úlceras dérmicas agudas provocadas em orelha de coelhos e observou epitelização precoce, presença de fibras colágenas organizadas e neovasos.

As CTMs são células indiferenciadas e não especializadas, de fácil isolamento, capazes de se diferenciarem em novas células, podendo gerar novo tecido (LIN *et al.*, 2019). Diversos trabalhos procuram analisar o potencial de diferenciação osteogênica das CTMs, derivadas do tecido adiposo ou da medula óssea. Esses estudos obtiveram resultados promissores quanto à diferenciação induzida nessas células por meio do

emprego da estimulação ou da fração F1 (CAETANO *et al.*, 2018; STEGEN *et al.*, 2015). Diante disso, esse trabalho buscou analisar a viabilidade e o potencial de diferenciação osteogênico das CTMs isoladas da medula óssea, frente ao emprego da ES e da fração proteica F1 em associação.

Em nossos resultados, foi possível analisar a viabilidade das CTMs pelo ensaio MTT, conforme a ISO 10993 (*International Standard Organization*). Ao serem estimuladas por 60, 150 e 300s e cultivadas em meio com F1 a 0,01%, 0,001% e 0,0001%, não houve citotoxicidade em nenhum dos grupos experimentais, com valores superiores a 70% de células viáveis. A taxa de viabilidade apresentou um aumento ao se diminuir a concentração de látex e o tempo de aplicação da ES a 10 μ A. Mendonça (2008) também avaliou a viabilidade do LXHb nas concentrações de 0,1 mg.mL⁻¹ (0,01%) e 0,01 mg.mL⁻¹ (0,001%) em fibroblastos HEK293T por 48 h e concluiu que o látex não era citotóxico, assim como Andrade (2012) que analisou a viabilidade de fibroblastos 3T3-NIH e queratinócitos humanos por 24 h utilizando a fração proteica F1 na concentração de 0,01%. Caetano *et al.* (2018) concluiu que a concentração de 0,01 e 100 μ g aumentaram o processo de migração e proliferação celular. Corroborando com os presentes resultados, esses autores concluíram que a fração proteica do látex é viável para o reparo tecidual *in vitro*.

A citotoxicidade da estimulação também foi avaliada por Baek *et al.* (2022) após tratamento das hADMSCs com plasma associado à estimulação elétrica por 1 h em quatro amplitudes diferentes (10 μ A, 50 μ A, 100 μ A e 200 μ A), mostrando que a estimulação elétrica entre 10 μ A e 50 μ A não apresentou citotoxicidade e não exibiu alteração na proliferação em relação ao grupo controle.

Pelos ensaios de mineralização, foi demonstrado que a associação de F1 e ES resultou na maior taxa de diferenciação osteogênica no grupo 0,0001% e 60s, visivelmente percebida pela maior deposição de cálcio nesse grupo experimental, após coloração por alizarina 0,2%, diferente do observado dos ensaios separados somente com ES ou somente com F1

Nesse estudo presente, a aplicação de estimulação por 300s obteve resultado inverso ao dos estudos acima mencionados, tanto quando empregada isoladamente, quanto em associação à fração proteica, visto que a taxa de mineralização e, portanto, de diferenciação osteogênica, sofreu uma diminuição significativa nesse maior tempo, em comparação ao 60s e 150s. Tal resposta pode estar vinculada à associação utilizada nesse estudo em comparação aos trabalhos supracitados,

possivelmente indicando que as células mesenquimais estudadas podem diminuir seu potencial de diferenciação quando estimuladas por um tempo maior e suplementadas com a maior concentração da fração F1, desencadeando respostas menos favoráveis à diferenciação osteogênica.

A utilização da menor concentração de fração proteica F1, como melhor resultado para a deposição de cálcio, pode ser comprovada pelos resultados de viabilidade celular. Visto que a maior concentração de látex apresentou a menor taxa de viabilidade para as CTMs. Nos resultados com grupos de F1 a 0,01%, a maior porcentagem de mineralização e de células viáveis foi observada no grupo não estimulado. Assim como descrito por Moraes (2017) que, ao analisar a atividade indutora da proliferação celular de fibroblastos da linhagem McCoy, após emprego da fração F1 do látex natural, observou o aumento na proliferação celular exercido por F1 a 0,01%, em comparação a F1-1% e 0,1%. E que as lesões, tratadas com F1 a 0,01%, reduziram desde o primeiro dia de tratamento, permanecendo constante ao longo dos dez dias, indicando que nessa concentração o reparo tecidual é mais efetivo.

Moraes *et al.*, (2024), ao comparar a ação do soro do LXHb (0,01% p/v) e da fração proteica F1 nas concentrações 0,01, 0,1 e 1% p/v em cultivo celular de fibroblastos McCoy e cicatrização de feridas em camundongos Balb-C, observaram que F1 a 0,01% p/v estimularam o processo de cicatrização, acelerando a regeneração do tecido e promovendo o fechamento mais rápido da ferida, em comparação ao grupo controle. A proteína F1 0,01% aumentou, também, a quantidade de colágeno produzida pelos fibroblastos.

Por meio da caracterização físico-química foi possível constatar que a fração proteica F1 apresentou 10,2% de proteína em sua massa total. Sendo assim, essa fração não é considerada pura e é constituída por outras substâncias que ainda não foram detectáveis. Esses compostos podem estar relacionados a respostas antagônicas à osteogênese ou até mesmo podem se comportar como moléculas competidoras pelo sítio de ligação das proteínas angiogênicas. Como consequência, essa hipótese pode surgir que, ao se elevar a concentração de F1 0,0001% para 0,01%, a concentração desses outros compostos ocorra simultaneamente. Em concentrações mais baixas de F1 (0,0001%), não desencadeiam efeitos negativos perceptíveis nos ensaios de viabilidade e mineralização, mas, em quantidades maiores, interferem na taxa de células viáveis e no poder de diferenciação. Desta

forma, se faz necessária a realização de estudos futuros para o aprofundamento de tais teorias.

4.2.4 Expressão Gênica

Para investigar os efeitos da estimulação elétrica e da fração proteica F1 para a diferenciação óssea, foi avaliada a expressão dos genes vinculados à osteogênese (*Alp*, *Ltype*, *Runx2*, *Col1a1*, *Bmp2*, *Camk2*). A **Figura 17** representa os gráficos de expressão relativa desses genes de interesse dos grupos de estudo: controle; 60s 0,001%; 60s 0,0001%; 300s 0,001%; 300s 0,0001%. Escolhidos por apresentarem diferenças estatísticas mais significativas nos ensaios de mineralização (**Figura 13**).

O gene *Alp* (fosfatase alcalina) é responsável pela expressão da enzima ALP, considerada um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Schouten *et al.*, 2009). Pode-se observar que não houve diferença significativa na expressão de *Alp* entre todos os grupos (**Figura 17A**). Nas associações com F1 a 0,001%, a aplicação por 300s apresentou maior expressão do gene, enquanto com F1 a 0,0001%, o menor tempo apresentou o melhor resultado de todos os grupos, corroborando com os resultados de diferenciação osteogênica que demonstraram maior taxa de mineralização no grupo 60s 0,0001% (**Figura 13**). Isso indica que, por apresentarem maior expressão desse marcador, obtiveram maior influxo de fosfato para o processo de mineralização e assim de osteogênese.

O *Runx2* é um regulador na formação óssea, mediando a ativação e/ou repressão temporal do crescimento celular. Observa-se, no gráfico (**Figura 17C**), que o aumento do tempo de aplicação de ES diminuiu a expressão do gene nas duas concentrações de F1. Os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa entre si e, principalmente, em relação ao controle, tal resposta pode estar associada ao tempo experimental. O RNA foi extraído após o cultivo das células por 14 dias para que a osteogênese fosse concluída, ultrapassando, desta forma, o período de maior expressão do gene *RUNX2*, conforme descrito por Takarada *et al.* (2015). Esse gene apresenta maior expressão durante o processo inicial de diferenciação osteogênica da célula tronco mesenquimal, compreendendo a fase de ossificação intramembranosa até o estágio de pré-osteoblasto, assim como demonstrado por Fontana (2009).

O gene *Bmp2* é responsável por expressar a proteína morfogenética óssea BMP-2, um marcador que estimula crescimento, desenvolvimento do sistema

esquelético e da regeneração óssea, por meio da diferenciação das células progenitoras mesenquimais em osteoblastos (KIM; CHOE, 2011).

Os resultados do gráfico abaixo (**Figura 17B**) demonstraram que o aumento do tempo de aplicação da ES diminuiu a expressão do gene *Bmp2* nas duas concentrações de F1. Contudo, os grupos estimulados por 60s apresentaram uma alta expressão desse gene, sendo que a associação de 60s com F1 0,001% obteve um aumento significativo em relação ao grupo controle, indicando que, quando há emprego da estimulação com a fração proteica, fica evidente o maior estímulo das células tronco mesenquimais para a diferenciação.

O *Col1a1* é o gene responsável pela expressão da proteína estrutural colágeno tipo 1, constituinte de 80% do teor proteico dos ossos (stephen *et al.*, 2014). Os resultados da **Figura 17D** mostraram que os grupos estimulados por 300s apresentaram maior expressão de *Col1a1*, com diferença significativa entre 300s 0,001% e o grupo controle, indicando, assim, que a ES por um tempo maior, associada à fração em concentração mais elevada, estimulou de forma mais intensa a expressão desse gene. Os grupos estimulados por 60s obtiveram expressão menor, porém bem próximas entre si, sugerindo que, nesse tempo de aplicação, a concentração de F1 não foi um fator determinante.

O gene *Ltype* é responsável pela expressão do canal de cálcio (voltagem dependente), importante regulador do influxo de íon cálcio nas células ósseas (VIEIRA, 2011). Conforme ilustrado na **Figura 17E**, a expressão do *Ltype* foi maior no grupo de 60s 0,001% e apresentou seu menor valor no grupo 300s 0,0001%, sendo inferior também ao controle. O aumento da duração de ES de 60s para 300s e a diminuição da concentração de F1 de 0,001% para 0,0001% decresceram os valores da expressão relativa.

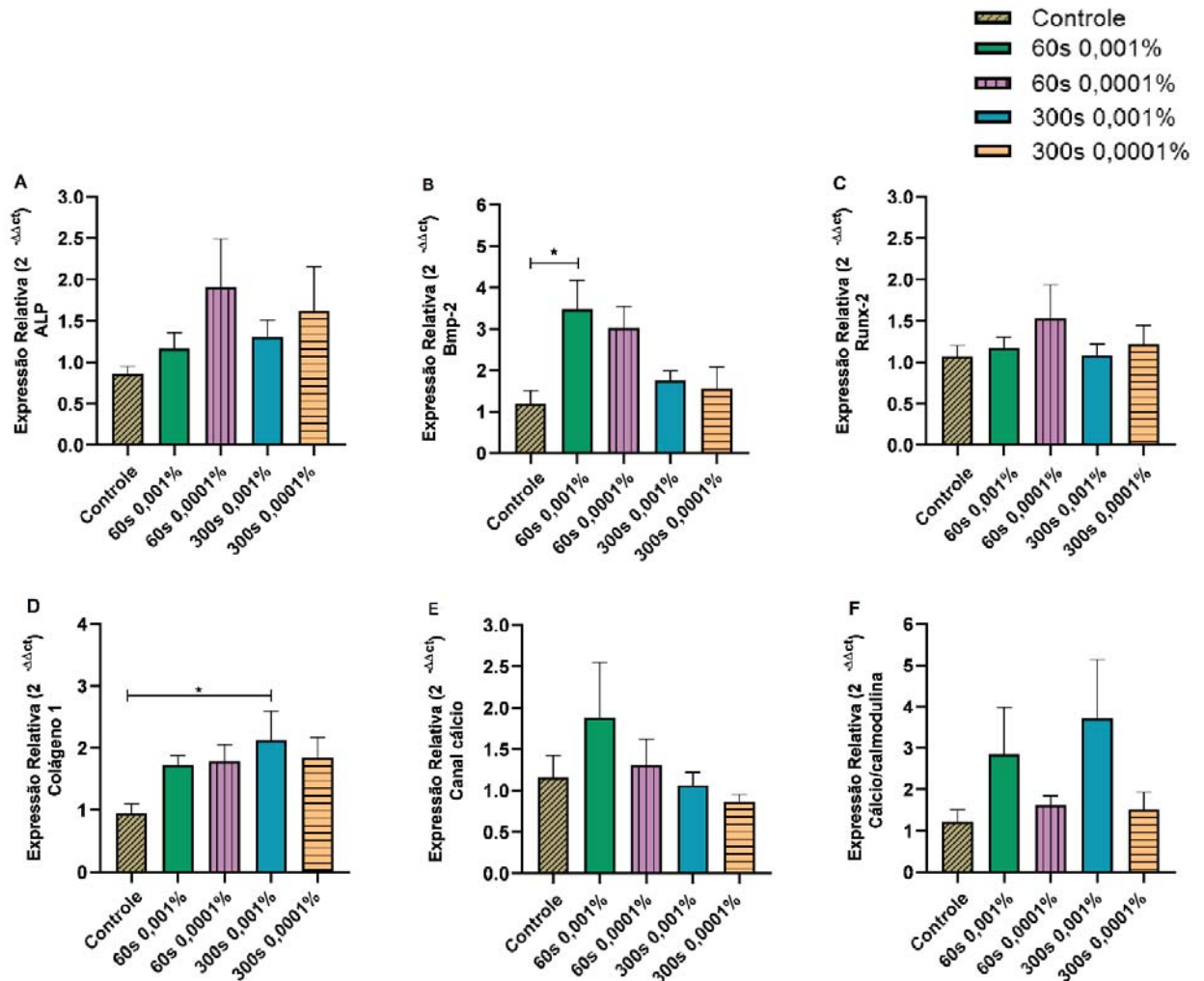
O produto do gene *Camk2* é a proteína citoplasmática calmodulina (CaM). A ligação Ca^{2+} /CaM promove a sinalização da calcineurina, que aumenta a sinalização de genes ligados à diferenciação osteogênica (MOON; LEE; KWON, 2022). Os resultados da **Figura 17F** demonstram que o grupo 300s 0,001% apresentou a maior expressão do gene *Camk2*, seguido do grupo 60s 0,001% e, por último, os grupos em associação com a menor concentração de F1, que apresentaram valores bem próximos entre si.

Dessa forma, é possível observar que, para F1 a 0,001%, o aumento da duração de estimulação refletiu positivamente nos resultados, indicando que a

estimulação por 300s estimulou mais o canal de cálcio voltagem dependente, aumentando o influxo de Ca^{2+} para o citosol, desencadeando uma melhor sinalização para a expressão de calmodulina (cálcio dependente).

Os resultados também podem sugerir que a fração proteica interferiu na sinalização celular, ligando-se a algum receptor de membrana ou a alguma molécula no citosol ou, até mesmo, ao próprio canal de cálcio, estimulando um maior influxo desse íon para a ativação do gene *Camk2*. Correlacionando esses resultados com as taxas de mineralização (**Figura 13**), é possível observar que para ES 300s com F1 0,001% a diferenciação foi maior do que na mesma duração de estimulação com F1 a 0,0001%, indicando que houve maior influxo de cálcio, expressão aumentada do gene *Camk2* e, assim, maior mineralização.

Figura 17 - Expressão relativa de (A) ALP, (B) BMP2, (C) RUNX2, (D) COL1A1, (E) LTYPE, (F) CAMK2 ($2^{-\Delta\Delta ct}$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (os níveis de significância foram estabelecidos em * $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo Autora.

A diferenciação osteogênica, que compreende o surgimento de células especializadas e a formação do tecido mineralizado, é responsável pelo reparo ósseo. O processo de cura de uma fratura é composto por três fases que se sobrepõem: inflamatória, reparativa e remodelagem. Na fase inflamatória, os macrófagos são recrutados para promover a limpeza do tecido e, também, secretar moléculas que ajudam a promover a angiogênese no local de fratura. Na fase reparativa, a via de sinalização Wnt/ β -catenina regula a diferenciação osteoblástica. A remodelagem ocorre por estímulos mecânicos no esqueleto ao longo da vida (BARLETTA *et al.*, 2020).

A via Wnt/ β -catenina pode ser dividida em uma via de sinalização canônica Wnt, que depende da função da β -catenina (via Wnt/ β -catenina) e atua no reparo de fraturas ósseas, e as vias Wnt não canônicas que operam independentemente da β -catenina e possuem efeitos osteogênicos opostos dependendo do estágio de maturação das células tronco (BARLETTA *et al.*, 2020). A ativação da via Wnt/ β -catenina pode promover a expressão do gene *Runx2*, que está envolvido na formação do osso imaturo, induzindo a diferenciação celular e aumentando a quantidade de osteoblastos imaturos. Porém, no decorrer da diferenciação, é necessário que sua expressão seja reduzida, para que haja o aparecimento de osso maduro (TAKARADA *et al.* 2015).

Rinco (2021), ao investigar a resposta osteogênica *in vitro* de células tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) em associação a grânulos de BCP, observou que não houve diferença significativa da expressão do *Runx2* em nenhum grupo experimental após 7 e 14 dias de experimento, assim como nos resultados desse estudo. Desta forma, é notório que a participação desse gene é desnecessária em osteoblastos já maduros, fazendo com que, durante o processo de maturação óssea, ocorra uma diminuição da sua expressão (KOMORI, 2010).

O gene *Bmp2* expressa a BMP-2, uma proteína que induz a diferenciação osteoblástica e a formação óssea a partir da ativação de moléculas de sinalização intracelular como Smad, Runx2 e osterix (LIU *et al.*, 2016) e é capaz de induz a expressão de proteínas não colágenas e de alguns marcadores como ALP e colágeno tipo 1 (HELAEHIL *et al.*, 2023). Souza (2017) já havia observado que em fraturas de periósteo da calvária de ratos Wistar, tratadas com látex da *Hancornia speciosa*, houve diminuição da expressão de *Bmp2* no decorrer dos experimentos, devido à produção de esclerostina pelos osteócitos, que é uma proteína capaz de competir com a BMP-2, interrompendo assim a sinalização óssea. Pode-se deduzir, então, que o tempo maior de estimulação (300s) foi capaz de induzir a expressão de esclerostina na membrana das células ósseas, diminuindo a expressão desse gene de interesse.

O ALP é considerado um marcador precoce, auxiliando, principalmente, na maturação do pré-osteoblasto em osteoblasto diferenciado (Schouten *et al.*, 2009). Baek *et al.* (2022) também observaram que, após aplicar ES a 10 μ A em células mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano, houve aumento da expressão de *Alp* no sétimo e, principalmente, décimo quarto dia. Assim como Moon *et al.* (2022)

constatarem que, estimulando células de ratos com 3 voltagens distintas (1 V.cm^{-1} ; $0,5 \text{ V.cm}^{-1}$; $0,05 \text{ V.cm}^{-1}$), a expressão de *Alp*, em todos os grupos, apresentava também maior expressão e/ou diferença significativa no 7° e 14° dia, em comparação ao controle.

O pré-osteoblasto é um estágio intermediário, que expressa tanto *Stro1*, *Alp*, *Ppr* e *Col1a1*, e está comprometido com a linhagem osteoblástica com extensa capacidade replicativa (STEPHEN *et al.*, 2014). Para a constituição da maior resistência do osso, os canais de cálcio, expressos pelo gene *Ltype*, quando estimulados, permitem a deposição de cálcio para formação do complexo de hidroxiapatita, conferindo resistência ao osso recém formado e possibilitando, também, o reparo para casos de fratura óssea (VIEIRA, 2011).

Leppik *et al.* (2020) comprovou que a ES, aplicada em células tronco mesenquimais, estimulou diretamente o canal de cálcio voltagem dependente do tipo L, presente na membrana plasmática, provocando respostas regulatórias através de enzimas, como a calmodulina. Sendo um canal de voltagem dependente, sua atividade está ligada diretamente à polarização da membrana celular. Quando a célula é estimulada, sugere-se que há despolarização e mudança da conformação dos canais e das proteínas, o que implicaria em mudança do influxo de cálcio (THRIVIKRAMAN *et al.*, 2018).

Após o estímulo do canal de cálcio e a entrada do íon Ca^{2+} no meio intracelular, a ligação do mesmo promove a mudança conformacional da enzima calmodulina, expondo resíduos hidrofóbicos que promovem a interação desse complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ com proteínas, desencadeando processos de fosforilação para importantes funções biológicas na diferenciação celular (SODERLING, 1999).

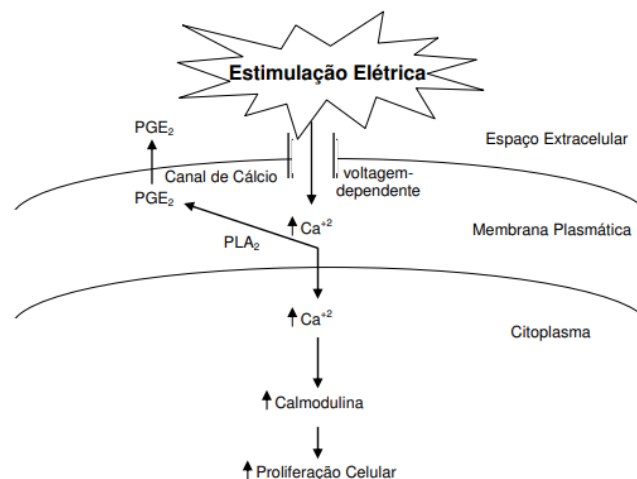
Moon *et al.* (2022) também observaram em suas análises com estimulação elétrica, que a expressão de todos os genes relacionados com a sinalização de cálcio foram superiores ao grupo controle, tal como nos resultados desse estudo (**Figura 17**). A ES aumentou a concentração de cálcio intracelular, induzindo a mineralização após 14 dias de experimento. HELAEHIL *et al.* (2023) também constataram que a expressão gênica foi aumentada pela ativação dos canais de cálcio e da via da calmodulina devido à terapia ES nos grupos de 30 e 60 dias.

Leppik *et al.* (2020) observaram que a estimulação elétrica melhorou a cicatrização óssea, estimulando a via cálcio-calmodulina, fatores de crescimento e citocinas. Também constataram que houve aumento de cálcio intracelular pelo

estímulo dos canais de cálcio e pela ativação de receptores especializados de canais na superfície do retículo endoplasmático, que liberam o íon Ca^{2+} estocado nas vesículas, influenciando, assim, a expressão gênica para diferenciação.

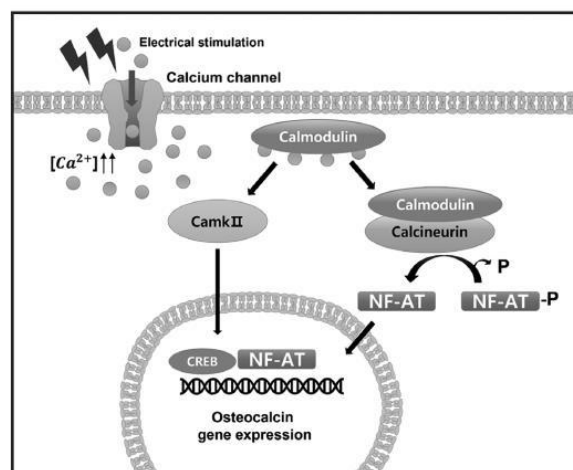
Entretanto, não foi possível estabelecer uma única correlação entre resultados de expressão do gene *Ltype* com o *Camk2*, pois, alterando a duração da microcorrente ou a concentração da fração, as respostas foram divergentes entre si. Contudo, foi possível sugerir que a concentração intracelular de cálcio direcionou a distribuição subcelular da calmodulina, bem como, promoveu sua associação com a proteína alvo e ativação de alvos específicos no seu estado conformacional, conforme descrito nas **Figura 18** e **Figura 19** (CHIN; MEANS, 2000).

Figura 18 – Mecanismo de ação da estimulação elétrica em cultura de células semelhantes a osteoblastos.



Fonte: BRIGHTON; POLLACK (1984).

Figura 19 - Via de sinalização do cálcio.



Fonte: MOON; LEE; KWON, (2022).

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, e de acordo com a literatura consultada, a fração proteica F1 do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* é um biomaterial que constitui um sistema polidisperso. Nos ensaios de DLS em pH 7,4, a fração não apresentou variação do tamanho ao longo do tempo, com menor índice de polidispersão na maior concentração de 1%, principalmente com a adição de NaCl a 20mmol.L⁻¹. Por outro lado, na análise por número de partícula espalhadora observa-se que o tamanho médio das partículas nas três concentrações analisadas (1, 01 e 0,01%) apresentaram tamanho menores que 100 nm, caracterizando um sistema mais estável.

A nova metodologia para a quantificação proteica por combustão no Analisador Elementar CNS apresentou alta sensibilidade e detectou 10,2% de proteína na massa total de F1. Os resultados de cromatografia em gel de filtração corroboraram com os de DLS, indicando a presença de duas populações com tamanhos distintos. Estudos futuros de aprofundamento fazem-se necessários para maior caracterização dessas proteínas constituintes da fração F1, afim de se conhecer peso molecular e estrutura química.

Para as análises biológicas, foi possível isolar as células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos Wistar e, *in vitro*, estimular a proliferação e diferenciação celular.

O emprego da fração F1 em concentrações de 0,01%, 0,001% e 0,0001% e da estimulação elétrica a 10 μ A por 60s, 150s e 300s não exibiu citotoxicidade *in vitro* e estimulou a diferenciação osteogênica das células tronco.

Os resultados de expressão gênica mostraram que a associação da estimulação elétrica com a fração proteica F1 estimulou a expressão dos marcadores ósseos das fases iniciais, principalmente, no grupo 60s-0,0001%. Os genes relacionados ao processo de mineralização, especialmente à via Ca²⁺/CaM, foram mais expressivos nos grupos F1-0,01%.

Células tronco estimuladas com microcorrente 10 μ A por 60s e suplementadas com F1 a 0,01% apresentaram a maior taxa de mineralização em comparação aos demais grupos e ao controle (sem F1 e sem ES), abrindo perspectivas sobre essa associação como tratamento futuro e biotecnológico para reparo ósseo na engenharia tecidual.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, D.L.S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. Orientador: Aldo Eloizo Job. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração de Materiais Poliméricos, Híbridos e NanoEstruturados da Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente - Unesp, Presidente Prudente, 2009. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94503/agostini_dls_me_bauru.pdf?sequence=1. Acesso em: 18 jun. 2022.

ANDRADE, T. A. M. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. Orientador: Marco Andrey Cipriani Frade. 2012. 185 f. Tese - Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-22022012-094819/publico/TeseVersaoCorrigidaAPOSDEFESATiagoAndrade.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2022.

ARIYAWIRIYANAN, W.; NUINU, J.; SAE-HENG, K.; KAWAHARA, S. The Mechanical Properties of Vulcanized Deproteinized Natural Rubber. **Energy Procedia**, [S.L.], v. 34, p. 728-733, 2013. Elsevier BV.

BAEK, S.; PARK, H.; IGCI, F. D.; LEE, D. Electrical Stimulation of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on O₂ Plasma-Treated ITO Glass Promotes Osteogenic Differentiation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 20, p. 12490, 18 out. 2022.

BALABANIAN, C.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; Lacerda, S. A., BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, n. 4, p. 201-205, 2006.

BARLETTA, P. H. A. A. S.; BARRETO, I. C.; MORAES, L. M. C.; PEREIRA, E. S. C. Reparo inicial de defeito ósseo crítico na calvária de rato após aplicação de ondas vibratórias. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 311, 24 set. 2020.

BLACK, C. R.; GORIAINOV, V.; GIBBS, D.; KANCZLER, J.; TARE, R. S.; OREFFO, R. O. Bone Tissue Engineering. **Curr Mol Bio Rep**, v. 1, p. 132– 140, 2015.

BLACKLEY, D. C. Artificial latices. **Polymer Latices: Science and technology Volume 2: Types of latices**, p. 391-440, 1997.

BRIGHTON, C. T.; POLLACK, S. R. **Method for preventing and treating osteoporosis in a living body by using electrical stimulation non-invasively**. United States Patent. Patent number n. 4,467,808, 28 ago. 1984.

CAETANO, G. F.; WANG, W.; CHIANG, W.H.; COOPER, G.; DIVER, C.; BLAKER, J.J.; FRADE, M.A.; BÁRTOLO, P. 3D-Printed Poly(ϵ -caprolactone)/Graphene

Scaffolds Activated with P1-Latex Protein for Bone Regeneration. **3D Printing And Additive Manufacturing**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 127-137, jun. 2018.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 322- 328, 2000.

DARULIZA, K. M. A.; YANG, K. L.; LAM, K. L.; Priscilla, J. T.; SUNDERASAN, E.; ONG, M. T. Anti-*Candida albicans* activity and brine shrimp lethality test of *Hevea brasiliensis* latex B-serum. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 10, 2011.

DINIZ, M. F. **Purificação de fatores de coagulação e imunoglobulinas a partir de plasma humano por cromatografia líquida**. Orientador: Elisabeth Cheng. 2019. 34 f. Monografia de Conclusão – Curso de Especialização Biotecnologia para a Saúde: Vacinas e Biofármacos do Instituto Butantan, São Paulo, 2019. Disponível em: https://repositorio.butantan.gov.br/bitstream/butantan/3847/1/TCC_Mirela%20F%20Diniz.pdf. Acesso em: 18 dez. 2023.

DUAN, C. F; NIE, Z. Y; ZENG, R. Z. Establishment of 2DE system and primary analyses on the membrane proteins of rubber particles in *Hevea brasiliensis* by MALDITOF. **Chinese Journal of Tropical Crops**, n. 27, p. 22–29, 2006.

FERREIRA, M.; MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J.; MULATO, M. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Brazilian Journal Of Physics**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 564-569, set. 2009.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. D. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. Orientador: Geraldo A.S. Passos. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-06042009-120819/publico/MestradoVanessaFontana.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.

GAO, C.; PENG, S.; FENG, P.; SHUAI, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. **Bone research**, v. 5, n. 1, p. 1-33, 2017.

GRAY, M. G.; LACKEY, B. R.; PATRICK, E. F.; GRAY, S. L.; HURLEY, S. G. Multiple Integrated Complementary Healing Approaches: Energetics & Light for bone. **Medical hypotheses**, v. 86, p. 18-29, 2016.

GINEBRA, M. P.; MONTUFAR, E. B. Cements as bone repair materials. In: **Bone repair biomaterials**. Woodhead Publishing. p. 233-271, 2019.

GRIFFIN, M.; BAYAT, A. Electrical stimulation in bone healing: critical analysis by evaluating levels of evidence. **Eplasty**. 2011.

GUERRA, N. B.; PEGORIN, G. S.; BORATTO, M. H.; BARROS, N. R. G., OLIVEIRA, C. F.; HERCULANO, R. D. Biomedical applications of natural rubber latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Materials Science And Engineering: C**, v. 126, p. 112126, jul. 2021.

HAO, L.; HARRIS, R. Customised implants for bone replacement and growth. In: **Bio-materials and prototyping applications in medicine**. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 79-107.

HELAEHIL, J. V.; HELAEHIL, L. V.; ALVES, L. F.; HUANG, B.; SANTAMARIA-JR, M.; BARTOLO, P.; CAETANO, G. F. Electrical Stimulation Therapy and HA/TCP Composite Scaffolds Modulate the Wnt Pathways in Bone Regeneration of Critical-Sized Defects. **Bioengineering**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 75, 6 jan. 2023.

HERCULANO, R. D.; MUSSAGY, C. U.; GUERRA, N. B.; BRASIL, G. S. P.; FLORIANO, J. F.; BURD, B. S.; SU, Y.; SASAKI, J. C. S.; MARQUES, P. A. C.; SCONTRI, M.; MIRANDA, M. C. R.; FERREIRA, E.S.; PRIMO, F. L.; FERNANDES, A.; FORSTER, S.; MA. C.; LOPES, P. E. L.; SANTOS, L. S.; SILVA, G. R., MENDONÇA, R. J. Recent advances and perspectives on natural latex serum and its fractions for biomedical applications. **Biomaterials Advances**, [S.L.], v. 157, p. 213739, fev. 2024.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE BIOLOGIA E BIOESTATISTICA. Censo demográfico 2017: resultados preliminares - São Paulo disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>. Último acesso em: 28 de novembro de 2020.

KIM, M.; CHOE, S. BMPs and their clinical potentials. **BMB reports**, v. 44, n. 10, p. 619, 2011.

KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. **Cell Tissue Res**, v. 339, n. 1, p. 189-95, Jan. 2010

LEI, B.; GUO, B.; RAMBHIA, K. J. Hybrid polymer biomaterials for bone tissue regeneration. **Frontiers of medicine**, v. 13, n. 2, p. 189-201, 2019.

LEITE, M.N. **Eficácia do soro do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* na cicatrização de escoriações cutâneas em ratos**. Orientador: Marco Andrey Cipriani Frade. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Médicas', Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-06012017-111547/publico/MarcelNaniLeiteMEORig.pdf>. Acesso em: 23 maio 2022.

LEPPIK, L.; OLIVEIRA, K. M. C.; BHAVSAR, M. B.; BARKER, J. H. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, p. 1-14, 2020.

LI, J.; LIU, X.; CROOK, J. M.; WALLACE, G. G. Electrical stimulation-induced osteogenesis of human adipose derived stem cells using a conductive graphene-

- cellulose scaffold. **Materials Science and Engineering: C**, v. 107, p. 110312, 2020.
- LIN, H.; SOHN, J.; SHEN, H.; LANGHANS, M. T.; TUAN, R. S. Bone marrow mesenchymal stem cells: aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. **Biomaterials**, [S.L.], v. 203, p. 96-110, maio 2019.
- LIU, Y.; BEYER, A.; AEBERSOLD, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. **Cell**, [S.L.], v. 165, n. 3, p. 535-550, abr. 2016.
- LOCATELLI, T. Determinação de proteínas em suplementos alimentares. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 03, p. 21-47, ago. 2018.
- MENDONÇA, R.J. **Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis***. Orientador: Joaquim Coutinho Netto. 2004. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica: Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17131/tde-10052021-115953/publico/001411279.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.
- Mendonça, R. J. **Purificação e caracterização de uma proteína angiogênica indutora de fibroplasia e cicatrizante presente no Látex Natural da Seringueira *Hevea brasiliensis***. Orientador: Joaquim Coutinho Netto. Tese – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001691968>. Acesso em: 24 maio 2022.
- MENÉNDEZ-MANJÓN, A.; BARCIKOWSKI, S. Hydrodynamic size distribution of gold nanoparticles controlled by repetition rate during pulsed laser ablation in water. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 9, p. 4285–4290, 2011.
- MIRON, R. J.; ZHANG, Y. F. Osteoinduction a review of old concepts with new standards. **Journal of dental research**, v. 91, n. 8, p. 736-744, 2012.
- MISHRA, R.; RAINA, D. B.; PELKONEN, M.; LIDGREN, L.; TAGIL, M.; KUMAR, A. Study of *in vitro* and *in vivo* bone formation in composite cryogels and the influence of electrical stimulation. **International journal of biological sciences**, v. 11, n. 11, p. 1325, 2015.
- MORAIS, P. C. R.; FLORIANO, J. F.; GARCIA, C. G. P.; CHAGAS, A. L. D.; MUSSAGY, C. U.; GUERRA, N. B.; BRASIL, G. S. P.; VICENTINA, K. F. D.; ROCHA, L. B.; OLIVEIRA, C. J. F.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. T. S.; CAETANO, G. F.; LI, B.; SANTOS, L. S.; HERCULANO, R. D.; MENDONÇA, R. J. Comparing the wound healing potential of natural rubber latex serum and F1-protein: an *in vivo* approach. **Biomaterials Advances**, [S.L.], v. 157, p. 213754, fev. 2024.
- MORAIS, P. C. R. **Avaliação do efeito do soro total e de frações obtidas do látex da Seringueira (*Hevea brasiliensis*) na cicatrização de feridas em modelo experimental**. Orientador: Ricardo José de Mendonça. 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interdisciplinar em Biociências Aplicadas, área de concentração: Produtos naturais e sintéticos bioativos, Uberaba, 2017. Disponível em:

<https://bdtd.uftm.edu.br/bitstream/tede/519/5/Dissert%20Pamela%20C%20R%20Morais.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.

MOON, H.; LEE, M.; KWON, S. Effect of direct current electrical stimulation on osteogenic differentiation and calcium influx. **Korean Journal Of Chemical Engineering**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 344-351, 16 jan. 2022.

MRUE, F; NETTO, J. C., CENEVIVA, R., LACHAT, J. J., THOMAZINI, J. A., TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Mat Res**, p.277-83, 2004.

MUBARAK, A.; ISMUN, A.; RAZAK, S. B. A.; ARIFFIN, M. M. Antifungal activity of *Hevea brasiliensis* fresh latex and rubber processing effluent in relation to polyphenol composition and polyphenol oxidase activity as a possible protection approach against fungal disease. **Malaysian Applied Biology**, v. 47, n. 4, 2018.

NALESSO, P. R. L.; VEDOVATTO, M.; GREGÓRIO, J. E. S.; HUANG, B.; VYAS, C.; SANTAMARIA-JR, M.; BARTOLO, P.; CAETANO, G. F. Early In Vivo Osteogenic and Inflammatory Response of 3D Printed Polycaprolactone/Carbon Nanotube/Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Composite Scaffolds. **Polymers**, [S.L.], v. 15, n. 13, p. 2952, 5 jul. 2023.

PECORA, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. **Journal Of Nanoparticle Research**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 123-131, 2000. Springer Science and Business Media LLC.

POH, P. S. P.; HUTMACHER, D. W.; HOLZAPFEL, B. M.; SOLANKI, A. K.; STEVENS, M. M.; WOODRUFF, M. A. *In vitro* and *in vivo* bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds. **Acta Biomaterialia**, [S.L.], v. 30, p. 319-333, jan. 2016

RINCO, U.G.R. **Avaliação *in vitro* da capacidade de diferenciação osteogênica de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos cultivadas em grânulos de hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato**. Orientadora: Vivien Thiemy Sakai. Co-orientador: Ricardo Garcia Mureb Jacob. 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Odontologia: Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2021. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/bitstream/tede/1847/5/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20de%20%20Ugo%20Guilherme%20Roque%20Rinco.pdf>. Acesso em: 24 maio 2022.

SCHOUTEN, C.; BEUCKEN, J.J.V.; JONGE, L.T.; BRONKHORST, E.M.; MEIJER, G.J.; SPAUWEN; P.H.; JANSEN, J.A. The effect of alkaline phosphatase coated onto titanium alloys on bone responses in rats. **Biomaterials**, v. 30, n. 32, p. 6407-6417, 2009.

SILVA, E. P.; HUANG, B.; HELAEHIL, J. V.; NALESSO, P. R. L.; BAGNE, L.; OLIVEIRA, M. A.; ALBIAZETTI, G. C. C.; ALDALBAHI, A.; EL-NEWEHY, M.; SANTAMARIA-JR, M. In vivo study of conductive 3D printed PCL/MWCNTs scaffolds with electrical stimulation for bone tissue engineering. **Bio-Design And Manufacturing**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 190-202, 5 jan. 2021.

SILVA, M.J. **Estudo da influência da composição química nas propriedades da borracha natural dos novos clones de seringueira RRIM 711, RRIM 926 e RRIM 937.** Orientador: Luiz Henrique Capparelli Mattoso. 2017. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química: Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia Programada de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/9908/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: 24 maio 2022.

SILVA, M. J.; SPINELLI, R. O.; MORENO, R. M. B.; SCALOPPI JÚNIOR, E. J.; GONÇALVES, L. H. C.; MATTOSO, L. H. C.; MARTINS, M. A. **CARACTERIZAÇÃO DA BORRACHA NATURAL DOS NOVOS CLONES DE SERINGUEIRA DA SÉRIE PB 300.** 13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 2015, Natal. Natal: Embrapa, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/180629/1/Caracterizacao-da-borracha-natural-dos-novos- clones-de-seringueira-da-serie-PB-300..pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.

SODERLING, T. R. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Trends Biochem Sci**, v. 24, p. 232-236, 1999.

SOUNDARYA, S. P; MENON, A. H.; CHANDRAN, S. V.; SELVAMURUGAN, N. 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.

SOUZA, I. G. **Avaliação do efeito osteoindutor do látex da *Hancornia speciosa* em calvária de ratos.** Orientador: Pedro Duarte Novaes. 2017. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2017. Disponível em: [file:///C:/Users/Rafaela%20Canassa/Downloads/1_Sousa_IngridGrazielle_M%20\(4\).pdf](file:///C:/Users/Rafaela%20Canassa/Downloads/1_Sousa_IngridGrazielle_M%20(4).pdf). Acesso em: 24 maio 2022.

STEGEN, S.; VAN GASTEL, N.; CARMELIET, G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**, [S.L.], v. 70, p. 19-27, jan. 2015.

STEPHEN J; SHUKLA A; DALAL A; GIRISHA K M; SHAH H; GUPTA N; KABRA M.; DABADGHAO P; PHADKE S R. Mutation spectrum of COL1A1 and COL1A2 genes in Indian patients with osteogenesis imperfecta. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.164A, p.1482–1489, 2014.

TAKARADA, T; NAKAZATO, R; TSUCHIKANE, A; FUJIKAWA, K; IEZAKI, T; YONEDA, Y. Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. **Development**, p. 143(2):211–8, 2015.

TANG, D.; TARE, R. S.; YANG, L. Y.; WILLIAMS, D. F.; OU, K. L.; OREFFO, R. O. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 83, p. 363-382, 2016.

THEPCHALERM, C.; WISUNTHORN, S.; VAYSSE, L.; KIATKAMJORNWONG, S.; NAKASON, C.; BONFILS, F. Mesostructure Evolution during Storage of Rubber Films from Washed Cream Latex and Skim Latex. **Advanced Materials Research**, [S.L.], v. 844, p. 417-420, nov. 2014.

THRIVIKRAMAN, G.; BODA, S. K.; BASU, B. Unraveling the mechanistic effects of electric field stimulation towards directing stem cell fate and function: A tissue engineering perspective. **Biomaterials**, v. 150, p. 60-86, 2018.

VIEIRA, L. L. L. M. **Canais iônicos na expansão de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano**. Orientadora: Oleg Vladimirovich Krasilnikov. Co-orientador: Márcia Bezerra da Silva. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Bioquímica e Fisiologia: Universidade Federal de Pernambuco, 2011. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1741/1/arquivo3132_1.pdf

ZAMANI, Y.; AMOABEDINY, G.; MOHAMMADI, J.; SEDDIQI, H.; HELDER, M. N.; ZANDIEH-DOULABI, B.; KOOLSTRA, J. H. 3D-printed poly (ϵ -caprolactone) *scaffold* with gradient mechanical properties according to force distribution in the mandible for mandibular bone tissue engineering. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 104, p. 103638, 2020.

ZHANG, J.; LI, M.; KANG, E. T.; NEOH, K. G. Electrical stimulation of adipose-derived mesenchymal stem cells in conductive *scaffolds* and the roles of voltage-gated ion channels. **Acta biomaterialia**, v. 32, p. 46-56, 2016.