Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Gabriela M. Monteiro Lobato

Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos

Versão original da dissertação defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

26/02/2019

Gabriela M. Monteiro Lobato

Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M 772 e

Monteiro Lobato, Gabriela Matheus
Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos / Gabriela Matheus Monteiro Lobato. - São Paulo, 2019.
160 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Catalani, Luiz Henrique

1. Matriz Extracelular. 2. Hidrogel. 3. Engenharia de Tecidos. I. T. II. Catalani, Luiz Henrique , orientador.

Gabriela M. Monteiro Lobato
Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Geralmente, iniciamos projetos tendo em mente apenas o objetivo final e como isso pode nos auxiliar num cenário maior. Delimitamos uma sequência linear de pequenas metas intermediárias, criamos cronogramas alucinados e começamos a executar em batelada, até nos depararmos com os "imprevistos". E é nessa hora que todo nosso minucioso planejamento vai por água abaixo. Percebemos que precisamos tomar caminhos alternativos, desistir de algumas coisas, sair da zona de conforto. Outras vezes, notamos que nossas pequenas conquistas diárias abrem portas para diversas outras opções, e que nossa sucessão de tarefas recém planejadas são obsoletas e pouco representativas em relação ao projeto e que não vamos dar conta sozinhos.

E ao longo de todos esses imprevistos, notamos que há sempre alguém por perto para ajudar, para dar uma palavra de incentivo, dar sugestões (boas e ruins), ou até mesmo para atrapalhar. E no fim, o produto de tanto esforço ganha traços únicos e inesperados, característicos de cada uma das pessoas minimamente envolvidas.

Quase três anos depois, eu gostaria de agradecer e dedicar essa dissertação à minha família: meus pais, Robson e Júlia, minha avó Esmeralda e meu irmão Lucas, que muito batalharam para eu ter uma educação de excelência. Que sempre me ensinaram a buscar a melhor versão de mim e não ficar parada esperando o destino bater na porta. Pelo carinho, pelos conselhos, pelas broncas e por sempre me trazerem café quando eu estou trabalhando.

À minha segunda família: Aline, Karen, Mariana, Fábio, Daiane, Felipe, Raul e Daniel Jamaica, por sempre me adicionarem em seus planos e pela compreensão que tiveram em todas as vezes que não pude sair porque tinha que estar lab. Pelo apoio e pelo entusiasmo que apresentaram todas as vezes que tentei explicar meu projeto. Pela troca de experiências, pelo carinho incondicional mesmo a distância e por sempre estarem presentes.

Aos grandes amigos que encontrei ao acaso na USP, e que ganharam uma porção imensa do meu coração: Laura, Daniel e Yanirys, por viverem esse mestrado comigo. Por compartilharem as mesmas emoções, dúvidas e angústias, vibrarem nas minhas conquistas e discutir soluções para os problemas. Pela bagunça, pelo sushi, pelas cervejas, pelas caronas, pelas festas, por trazer cor ao marasmo do dia-a-dia e pela amizade de uma vida em 3 anos.

Ao meu orientador, Lique, pelo incentivo à criatividade, pela liberdade de trabalho e pensamento e por sempre estar disponível para discutir e tirar dúvidas. Por ensinar a ter um pensamento crítico e sempre procurar um caminho alternativo e inovador. Por se preocupar mais com a formação dos alunos do que com os resultados, confiar no meu trabalho e pela

autonomia concedida. Por me dar a oportunidade de trabalhar com um grupo sensacional: Isabela, Rachele, Giovanne, Marco, Rafael, Denisse, Raja, Fernando, Diego, Alliny e Joca, que contribuíram diariamente para execução e polimento do projeto. À CNPq e à FAPESP pela bolsa e investimento.

Aos professores do IQ-USP, que sempre se disponibilizaram a me auxiliar, tanto tirando dúvidas quanto emprestando equipamentos e reagentes. Em especial à Prof. Flávia Winck pela colaboração nos ensaios proteômicos, pelos conselhos para vida e por ser um modelo profissional.

Por fim, ao meu namorado Pedro, que perdeu inúmeros fins de semana e feriados para me ajudar na análise de dados e ensinando estatística. Por me lembrar que todo resultado é um resultado e que independente da hipótese inicial, nosso papel como cientista é tentar interpretá-los da melhor maneira possível. Por sempre me ajudar a manter a calma, a auto - estima e por pensar no meu bem-estar, até quando essa não é minha prioridade. Por ser um porto seguro em dias de tormenta e o melhor companheiro de Netflix/Switch.

Olhando para trás, notei que o caminho pré-determinado em 2016 não é nem um esboço do que realmente aconteceu. O projeto cresceu de alguns lados, encurtou em outros, ganhou a minha cara e de todas as outras pessoas mencionadas anteriormente. O crescimento ocorreu não apenas por conta do mestrado, mas por todos os problemas e pessoas encontradas no meio do caminho, afinal **“o importante é a viagem e não o destino”.**

“When you find yourself

on the side of the majority,

you should pause and reflect”

Mark Twain

Resumo

Monteiro Lobato, G. M. Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos. 2019. 160 pags. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os implantes utilizados para regeneração tecidual ainda falham na tentativa de mimetizar as propriedades da matriz extracelular (ECM), o que compromete a viabilidade e aplicabilidade do material. Além disso, permanece o desafio de desenvolver um método de aplicação minimamente invasivo para evitar danos teciduais adicionais (Badylak et al., 2015; Crapo et al., 2011; Xing et al., 2014). Assim, o objetivo do projeto é desenvolver um hidrogel injetável composto de ECM de pericárdio, tendão e osso bovino enzimaticamente digerida e reticulada com glutaraldeído, ésteres ativados de NHS e derivados de polietilenoglicol (PEG). O protocolo de digestão foi modificado de Willians (Williams et al., 2015), utilizando tripsina, pepsina e colagenase. A quantificação de GAGs e peptídeos mostrou que, independentemente do substrato e enzima utilizados, o processo em etapas gerou uma maior concentração de estruturas em relação ao processo contínuo. Adicionalmente, a análise de dicroísmo circular mostrou que o processo em etapas preservou mais estruturas secundárias. O perfil proteico das ECMs foi analisado como descrito em Flores (Flores et al., 2016), e foi verificado que ele é altamente diverso e tecido - específico. A ECM do pericárdio possui 94 tipos diferentes de proteínas, seguidas pela ECM do tendão (48) e pela ECM óssea (35), sendo o colágeno α1 (1) e o colágeno α2 (1) presentes em todas elas. Além disso, os produtos digeridos ECMp aumentaram a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea a osteoblastos maduros. A cinética do processo de gelificação, bem como as propriedades mecânicas do gel são dependentes do tipo de agente reticulante, assim como da concentração da gelatina. Este novo material é altamente personalizável e adaptável à aplicação biológica desejada.

Palavras chave: Engenharia de Tecidos, Hidrogel, Matriz Extracelular.

Abstract

Monteiro Lobato, G. M. Gelation study of extracellular matrix digestion products for tissue engineering. 2019. 160 pags. Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo.

The implants used for tissue regeneration still fail to mimic properties of extracellular matrix. It compromises the material viability and applicability. Furthermore, the challenge to manufacture a minimally invasive delivery system for it to avoid extra tissue damage still remains (Badylak et al., 2015; Crapo et al., 2011; Xing et al., 2014). Thus, the project goal is to develop an injectable hydrogel composed of pericardium, tendon and bovine bone ECM enzymatically digested and crosslinked with glutaraldehye, activated esters of NHS and polyethylene glycol (PEG) derivatives. The digestion protocol was modified from Willians (Williams et al., 2015), using trypsin, pepsin and collagenase as lytic enzymes. GAGs and peptides quantification showed that regardless of the substrate and enzyme, the stepwise process yields a higher amount of GAGs and peptides in comparison with the continuous process. In addition, circular dicroism analysis showed that the stepwise process preserves more secondary structures of proteins. ECMs protein profile was analyzed as in Flores (Flores et al., 2016) and verified that it is the highly diverse and tissue-specific. Pericardium ECM has 94 different types of proteins, followed by tendon ECM (48) and bones ECM (35), being collagen α1(1) and collagen α2(1) present in all of them. Furthermore, the ECMp digested products enhanced bone marrow mesenchymal stem cells proliferation and differentiation in mature osteoblast. The kinetics of the gelification process, as well as mechanical properties of the gel is dependent of the type of crosslinker and concentration of gelatin. This new material is highly customizable and adaptable to the biological application.

Key words: Tissue Engineering, Hydrogel, Extracellular Matrix.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECM - matriz extracelular

GAGs - glicosaminoglicanos

VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular

bFGF - fator de crescimento fibroblástico básico

TGF-β - fator de transformação de crescimento β

MSC - células tronco mesenquimais

ESM - células tronco embrionárias

NHS-AA - ácido adípico ativado com N-hydroxisuccinimida

EDC - 1-etil- 3-(3-dimetil aminopropil) carbodiamida hidroclorídrico

FTIR - espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

UV-vis - espectroscopia no Ultravioleta e visível

DC - dicroísmo circular

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

GPC - cromatografia por permeação a gel

ECMt - ECM proveniente de tendão de Aquiles bovino

ECMo - ECM proveniente de osso cortical bovino desmineralizado

ECMp - ECM proveniente de pericárdio bovino

PBS - solução salina tamponada com fosfato

DMMB - azul de dimetilmetileno

BCA - ácido bicinconínico

BSA - albumina de soro bovino

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

DTT - ditiotritol

IAA - iodoacetamida

LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada com espectrômetro de massas em tandem

CID - dissociação induzida por colisão

LFQ - *label-free quantification*

MPT - modificações pós-traducionais

ALP - fosfatase alcalina

ARS - coloração vermelho de alizarina

GO - *gene ontology*

DMEM - *dubelco's modified eagle medium*

DMEM/F-12 - dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12

α-MEM - *minimum essential eagle medium, α modification*

SFB - soro fetal bovino

SHED - células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos

BMMSC – células-tronco mesenquimais de medula óssea

Mw - massa molecular ponderal média

SLRP - *small leucine-rich proteoglycans*

BMP - proteínas morfogênicas ósseas

PDGF - fatores de crescimento derivados de plaquetas

Runx2 - *Runt-related transcription fator 2*

ERK - *extracelular signal-regulated kinase*

PPAR-γ - receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ

MAPK - proteínas quinase ativada por mitógenos

MKP1 - proteínas quinase fosfatada 1 ativada por mitógenos

BSP - sialoproteínas do osso

OC - osteocalcina

TGFBI - *transforming growth factor-β-induced protein ig-h3*

Índice de Figuras

Figure 1. *Os três modos de regulação de funções celulares pela ECM: estímulos mecânicos, regulação por fatores solúveis no meio e interação entre suporte e célula baseado em moléculas de adesão celular (alterada de 12).* *19*
Figure 2. *Método de preparação de hidrogel a partir da técnica de foto reticulação (alterado de 22).* *28*
Figure 3. *Mecanismo de ação da técnica de BCA.* *41*
Figure 4. *Comparação estrutural entre Biureto e uma cadeia peptídica hipotética.* *41*
Figure 5. *Barplot da concentração de peptídeos após a digestão de ECMt, ECMo e ECMp com colagenase, pepsina e tripsina de forma contínua (vermelho) e em etapas (azul). O asterisco (*) indica a diferença estatísticas dos tratamentos.* *42*
Figure 6. *Barplot da concentração de GAGs após a digestão de ECMt, ECMo e ECMp com colagenase, pepsina e tripsina de forma contínua (vermelho) e em etapas (azul). O asterisco (*) indica a diferença estatísticas dos tratamentos.* *44*
Figure 7. *Esquema da reação de desidratação entre aminoácidos e formação da estrutura primária das proteínas. Enovelamento em padrões bem determinados, devido a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias peptídicas (estrutura secundária), seguido por enovelamento da cadeia (estrutura terciária), obtido pela interação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, algumas proteínas se associam a outras para ter função biológica (estrutura quaternária).* *45*
Figure 8. *Regiões de absorção do espectro de DC e cromóforos característicos de proteínas42.* *46*
Figure 9. *Espectros de DC para digeridos de ECMt após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contínua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).* *49*
Figure 10. *Espectros de DC para digeridos de ECMo após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contínua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).* *51*
Figure 11. *Espectros de DC para digeridos de ECMp após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contpinua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).* *53*
Figure 12. *Gel de SDS-PAGE do produto de digestão em etapas de (A) ECMt com tripsina, (B) ECMt com colagenase, (C) ECMt com pepsina, (D) ECMp com tripsina, (E) ECMp com colagenase, (F) ECMp com pepsina, (G) ECMo com tripsina, (H) ECMo com colagenase e (I) ECMo pepsina.* *55*
Figure 13. *Diagrama de Venn das proteínas identificadas em ECMt, ECMo e pericárdio ECMp por análise de Espectrometria de Massas, baseada na abordagem proteômica shutgun.* *58*
Figure 14. *Diagrama de Venn das proteínas contendo MPT identificadas em ECMt, ECMo e ECMp por análise de Espectrometria de Massas, baseada na abordagem proteômica shutgun.* *62*
Figure 15. Esquema da diferenciação de MSC nas linhagens osteoblásticas e adiposas, assim como o papel dos fatores de crescimento na regulação de cada processo. Runx2, Osterix e MSX2 levam a diferenciação para preosteoblástos, enquanto PPAR-γ leva a diferenciação em adipócitos e supressão da osteogênese. Além disso a PPAR-γ altera perfil de expressão de fatores secretados em adipócitos de medula, levando a perda de massas óssea (Msx2 - muscle segment homeobox homolog of 2; C/EBPs - CCAAT-enhancer-binding proteins; IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; Noc - gene noctorium; HSC – células tronco hematopoiéticas) (Kawai, 2012). *64*
Figure 16. *Etapas de diferenciação das MSCs em osteócitos, assim como a lista de marcadores celulares para cada etapa (Miron, 2012).* *65*
Figure 17. *Reação de hidrólise do p-nitrofenill-fosfato catalisado pela enzima ALP, formando fosfato inorgânico e o produto amarelado (p-nitrofenol), que pode ser quantificado através da leitura em UV-vis em λ = 405nm.* *66*
Figure 18. *Barplot da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) nos dias 9, 14 e 21, referente a quantificação da atividade de ALP em SHEDs, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com o digerido de ECMp pelo método contínuo (vermelho).* *67*

***Figure 19**. Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida por tripsina através método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). Barplot da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405 nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL e nos dias 9, 14 e 21. 69*
***Figure 20.** Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida por colagenase através do método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). Barplot da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250µg/mL e nos dias 9, 14 e 21. 70*
***Figure 21.** Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida com pepsina através do método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). Barplot da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL e nos dias 9, 14 e 21. 71*
***Figure 22.** Representação das duas possíveis estruturas nas quais AR interage com íons de cálcio (X corresponde a H ou Na). Formação de sal com dois grupos fenólicos ionizados (difenolato) a esquerda e íon quelado a direita através da interação com um grupo fenólico e o oxigênio adjacente (alterado de Moriguchi, 2003). 73*
***Figure 23.** Barplot referente a quantificação da mineralização em SHEDs pela técnica de ARS, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida (λ = 570nm). 74*
***Figure 24.** Barplot referente a quantificação da mineralização em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 21 dias com meio ostegênico suplementado com ECMp digerida pelo método contínuo (vermelho) e em etapas (azul) (λ = 570nm). 75*
***Figure 25.** Representação da redução as Resazurina em Resofurina em meio celular. 77*
***Figure 26**. Quantificação da adesão celular em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 4h com meio osteogênico contendo ECMp digerida pelo método contínuo e em etapas. Barplot da comparação entre OD das amostras (λemissão = 590nm). 78*
***Figure 27.** Esquema da progressão do ciclo celular. Identificação da sequencia dos complexos ciclina-Cdk responsáveis por programar o início de cada fase do ciclo, assim como regular os eventos críticos de cada uma delas. 79*
***Figure 28.** Quantificação da proliferação celular em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 15 dias com meio de proliferação suplementado com ECMp digerida pelo método contínuo e em etapas. Barplot da comparação entre OD das amostras (λemissão = 590nm). 80*
***Figure 29.** Esquema da via de sinalização de inibição da divisão celular mediada por TGF-β. A ligação do TGF-β ao seu receptor promove a ativação da porção quinase da enzima, levando a fosforilação da Smad, que são então capazes de entrar no núcleo e ligar-se a p promotores e regular a transcrição de genes, como o p21. A proteína p21 inibe a formação do complexo ciclina E/A – Cdk2, levando a inibição do ciclo celular. 81*
***Figure 30.** Mecanismo de ação referente a oxidação de Corey-Kim dividido nas quatro etapas, proporto por Katayama, 1987. (1) formação do composto 1 - ativado de DMS através de uma Sn2 no átomo de bromo; (B) adição do álcool ao meio reacional, levando a formação do composto 2 através de uma Sn2 no átomo de enxofre e, por fim, (C) adição de trietilamina, que promove a eliminação de um próton de um dos grupos metilas ligadas ao enxofre, formando o intermediário de reação 3, que por sua vez rearranja-se e forma o aldeído pretendido. 85*
***Figure 31.** Espectro de absorção (500nm ≤ λ ≤ 620nm) da cinética de reação do PEG-(CHO)2 (0,7mM) com reagente de Schiff, apresentando um pico em λ = 548nm com absorbância igual a 0,13. 86*
***Figure 32.** Espectro de Infravermelho referente ao PEG comercial (azul) e ao PEG(CHO)2 (rosa). Diferentemente do espectro azul, há a banda larga de estiramento da ligação O-H em 3435cm-1, assim como a banda de estiramento da carbonila em 1713cm-1 no espectro rosa, indicando que a oxidação das extremidades do PEG formou um ácido carboxílico. 87*
***Figure 33.** Estrutura do Diepoxi PEG. 88*
***Figure 34.** Mecanismo de reação da esterificação entre o ácido adípico com o NHS em presença de EDC. (1) Iniciado pela protonação do EDC, (2) ataque nucleofílico do carboxilato ao EDC, formando o intermediário instável (O-acilisoureia), (3) possibilitando o ataque nucleofílico na carbonila pelo NHS,*

*formando uma ureia solúvel em água (**composto a**) e o éster ativado (**composto b**) (alterado de Watté, 2017).* *89*
***Figure 35.** Comparação dos espectros de infravermelho do ácido adípico (AA) em laranja com o ativado de NHS em azul.* *90*
***Figure 36.** Estrutura do NHS-AA.* *91*
***Figure 37.** Espectro de 1H RMN do NHS-AA.* *91*
***Figure 38.** Mecanismo de reação para reticulação entre as porções N-terminais dos peptídeos e o PEGDG, através de Sn2 no carbono menos impedido, promovendo abertura do anel epóxido, seguido de protonação do oxigênio, formando o aminoalcool.* *95*
***Figure 39.** Mecanismo de reação de abertura de anel do PEGDG através de atáque nucleofílico da água por Sn2 no carbono menos impedido. Podendo formar um (1) acetal ou (2) promovendo uma reação em cadeia de abertura de anel entre moléculas de PEGDG ou intramolecular.* *95*
***Figure 40.** Mecanismo de reação para reticulação entre as porções N-terminais dos peptídeos e o NHS-AA. O éster ativado sofre substituição nucleofílica na carbonila, formando um intermediário tetraédrico, que é rearranjado, eliminando o NHS e formando a amida final.* *96*

Índice de Tabelas

Tabela 1. *Tipos de géis testados e as concentrações de material proteico utilizado em cada um deles.* *38*
Tabela 2. *Comparação entra as principais estruturas secundárias identificadas pela técnica de CD.* *47*
Tabela 3. *Análise de GPC das amostras de ECM digeridas, mostrando o Mw aproximado dos picos de maior intensidade.* *56*
Tabela 4. *Bandas características da funcionalização do ácido adípico com NHS.* *90*
Tabela 5. *Resultado do tempo de gelificação para as diferentes amostras contendo gelatina e ECMp digerida, assim como o tipo de reticulante utilizado e sua concentração em solução.* *94*
Tabela 6. *Valores de tensão observados para o limite da região linear de viscoelasticidade (LVE), assim como os valores de tensão selecionados para os experimentos de varredura de frequência.* *98*

Sumário

1. Introdução 18

1.1 Propriedades da ECM 21

1.1.1 Propriedades Bioindutivas 21

1.1.2 Propriedades Biomecânicas 22

1.2 Métodos de Processamento 23

1.2.1 Técnicas de descelularização 23

1.2.1.1 Agentes químicos 23

1.2.1.2 Agentes biológicos 24

1.2.1.3 Agentes físicos 25

1.2.1.4 Avaliação 25

1.3 Biomateriais baseados em suportes de ECM 26

1.3.1 Método de reticulação 28

2. Justificativa e Objetivos 31

2.1 Objetivo geral 31

2.2 Objetivos específicos 31

3. Material e Métodos 32

3.1 Reagentes 32

3.2 Métodos 33

3.2.1 Purificação dos reagentes 33

3.2.2 Síntese dos Dialdeídos derivados de PEG pela Oxidação de Corey-Kim 33

3.2.3 Síntese dos Ésteres Ativados de NHS 34

3.2.3.1 Caracterização dos reticulantes 34

3.2.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 34

3.2.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 34

3.2.4 Digestão da ECM 34

3.2.4.1 Análise do produto de digestão 35

3.2.4.1.1 Ensaio com corante azul de dimetilmetileno – DMMB 35

3.2.4.1.2 Ensaio de ácido bicinchoninico - BCA 35

3.2.4.1.3 Análise Estatística 35

3.2.4.1.4 Dicroísmo Circular 35

3.2.4.1.4 Eletroforese em SDS-PAGE 36

3.2.4.1.6 Gel Permeation Chromatography 36

3.2.5 Análise proteômica das ECMs 36

3.2.5.1 Preparação de amostra 36

3.2.5.2 Cromatografia Líquida Acoplada com Espectrômetro de Massas em Tandem (LC-MS/MS) 36
3.2.5.3 Análise de bioinformática 37
3.2.6 Análise de Atividade Biológica *in vitro* 37
3.2.6.1 Preparação de Meio de Cultura 38
3.2.6.2 Diferenciação Osteoblástica 38
3.2.6.2.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) 38
3.2.6.4.2 Coloração vermelho de alizarina (ARZ) 38
3.2.6.3 Ensaio de Proliferação Celular 39
3.2.6.4 Ensaio de Adesão Celular 39
3.2.7 Produção de Hidrogéis 39
3.2.7.1 Caracterização Reológica do Gel 40
4. Resultados e Discussões 41
4.1 Digestão das ECMs 41
4.1.1 Quantificação de peptídeos e GAGs 42
4.1.2 Dicroísmo Circular 46
4.1.3 Padrão de fragmentação 55
4.2 Análise proteômica das ECMs 58
4.2.1 Anotação funcional e enriquecimento da análise do proteoma total 59
4.3 Análise da Atividade Biológica 63
4.3.1 Diferenciação Osteoblástica in vitro 64
4.3.1.1 Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) 67
4.3.1.1.1 Expressão de ALP em SHED 67
4.3.1.1.2 Expressão de ALP em BMMSC 69
4.3.1.2 Coloração com Vermelho de Alizarina (ARS) 73
4.3.1.2.1 Análise de mineralização em SHEDs 74
4.3.1.2.2 Análise de mineralização em BMMSC 76
4.3.2 Adesão e Proliferação in vitro 77
4.3.2.1 Adesão Celular – Alamar Blue 78
4.3.2.2 Proliferação Celular – Alamar Blue 80
4.4 Formação de Hidrogéis 84
4.4.1 Síntese dos Agentes Reticulantes 84
4.4.1.1 Derivados de PEG 84
4.4.1.2 Éster ativado de NHS 89
4.4.2 Análise de Gelificação 93
4.4.2.1 Reticulação dos Géis 93

4.4.3 Reologia 98
4.4.3.1 Varredura de Amplitude 98
4.4.3.2 Varredura de Frequência 100
5. Conclusões 101
6. Referências 103

1. Introdução

A matriz extracelular (ECM) é um material biológico em forma de rede tridimensional que está presente no espaço entre as células de todas as formas de vida multicelular. Ela é produzida, secretada e degradada localmente pelas células que estão em equilíbrio dinâmico com seu microambiente (Badylak, 2007), ou seja, a ECM é constantemente remodelada de acordo com as necessidades celulares (Xing et al., 2015).

Nos humanos, especificamente, a ECM é composta por duas classes principais de macromoléculas:

(a) glicosaminoglicanos (GAGs) – cadeias de polissacarídeos não ramificados compostas por repetições de dissacarídeos; apresentam carga negativa devido a presença de grupos sulfatados e ácidos. As cadeias são rígidas, longas e altamente hidrofílicas, desta forma ocupando um grande espaço e formando géis em concentrações baixas. Podem estar ligadas covalentemente a proteínas, formando proteoglicanos.

(b) proteínas fibrosas, como a família do colágeno, que são moléculas longas rígidas e apresentam estrutura de tripla-hélice e capacidade de se agregar e formar fibras; e a elastina, que é composta por dois tipos de segmentos proteicos intercalados: uma cadeia hidrofóbica, responsável por suas características elásticas, e um segmento de α-hélice, capaz de fazer *cross-link* com moléculas adjacentes.

Além disso, há (c) glicoproteínas, como fibronectina, vitronectina, que contribuem tanto para a organização estrutural da ECM quanto para a adesão e migração celular; e (d) proteínas sinalizadoras, como fatores de crescimento (TGF-beta, bFGF e VEGF) (Badylak, 2007; Badylak et al., 2015; Daley et al., 2008; Takawale et al., 2015), que estão ligadas às proteínas fibrosas, GAGs ou a estrutura proteico de proteoglicanos (Xing et al., 2015). Ou seja, a ECM é mais do que um suporte mecânico: ela apresenta um papel ativo na regulação e sobrevivência das células que estão ali aderidas ou migrando por seu interior (Manabe et al., 2008; Xing et al., 2015).

Os proteoglicanos, geralmente, formam hidrogéis que conferem ao tecido resistência a compressões, ao mesmo tempo que facilita a difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células. As proteínas fibrosas, como o colágeno, que ficam envoltas pelo gel, ajudam a organizar arcabouço estrutural da matriz e fortalecê-la, enquanto a elastina confere resiliência. Entretanto, a combinação dessa diversidade de moléculas em diferentes quantidades dá origem a inúmeros materiais, que apresentam características únicas, desde alta elasticidade, até formas calcificadas.

Os componentes da ECM variam de acordo com os tecidos em que foram produzidos (Bonnans et al., 2014), assim como podem variar devido condições de desenvolvimento e

patológicas (Hoshiba et al., 2016; Samiric et al., 2009). A ECM atua como um substrato para facilitar a adesão de células, para a formação de tecidos e como barreira física entre diferentes tecidos (Daley et al., 2008), além de proporcionar um meio de apoio para vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Badylak, 2007). Adicionalmente, assim como exposto na **Figura 1**, a ECM altera funções celulares através de: estímulos mecânicos a partir de substratos com rigidez diferente e liberação de fatores solúveis (ligação dos fatores às proteínas da ECM) que desencadeiam a sinalização intra- e intercelular, regulando processos como de adesão, sobrevivência, homeostase, proliferação, reparo, morfogênese, migração e diferenciação (Badylak et al., 2015; Daley et al., 2008; Rao Pattabhi et al., 2014).

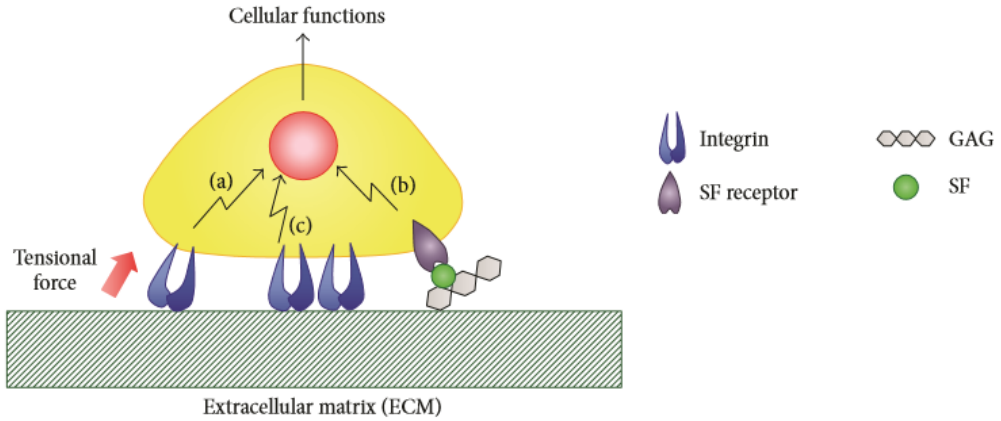


Figure 1. Os três modos de regulação de funções celulares pela ECM: estímulos mecânicos, regulação por fatores solúveis no meio e interação entre suporte e célula baseado em moléculas de adesão celular (alterada de (Rao Pattabhi et al. 2014)).

A engenharia de tecidos, por sua vez, busca regenerar ou substituir tecidos que apresentam funcionamento anormal, através do uso de células semeadas em um suporte desenhado para mimetizar uma ECM original, com o objetivo de restaurar as funções originais do tecido. Entretanto, a composição da ECM é complexa e tecido-específica. Dessa forma, é difícil obter um modelo sintético *in vitro*, que recrie a composição ECM *in vivo.* Para resolver esse problema, utiliza-se a ECM isoladas de tecidos, buscando manter a composição e estrutura da ECM original após algumas técnicas de processamento. A ECM pode ser extraída de diversas fontes alogênicas e xenogênicas, incluindo tecidos do intestino delgado, bexiga urinária, derme, mesotélio pericárdio e válvulas cardíacas. Além disso, esse material pode ser utilizado em diferentes contextos, nas formas de tecido ou órgãos inteiros, *patch*, material de revestimento para substratos de cultura de células (2D) e gel injetável (Rao Pattabhi et al. 2014).

1.1 Propriedades da ECM

A aplicação clínica a partir de um material derivado de ECM dependerá intimamente das propriedades mecânicas e biológicas inerentes ao suporte, assim como capacidade de degradação (Badylak 2007) e potencial imunogênico. Essas propriedades vão guiar o remodelamento da ECM e a regeneração do tecido, pretendida ao longo de seu desenvolvimento.

1.1.1 Propriedades Bioindutivas

O mecanismo pelo qual ocorre o remodelamento de tecidos na presença de ECM ainda não é completamente compreendido (Higuchi et al., 2012). Sabe-se que as propriedades mecânicas do suporte, assim como a sua capacidade de ancoragem de células hospedeiras através de fibras de colágeno, fribronectina e laminina são insuficientes para gerar os resultados eficientes de remodelamento. Dessa forma, acredita-se que existam propriedades bioindutivas que contribuam de maneira sinérgica (Badylak 2007).

Entretanto, é bem descrito os processos que contribuem para esse remodelamento, incluindo a angiogênese, deposição, infiltração, migração e proliferação celular (Gruskin et al., 2012; Higuchi et al., 2012), organização de novas células progenitoras (Wang et al., 2007) e sua diferenciação. Além disso, ocorre a produção e recrutamento de macrófagos M2 para a região de interface entre o tecido e o material. Devido a sua característica imunomodulatória, os macrófagos M2 podem apresentar fenótipos pró- ou anti-inflamatórios. Dessa forma, a regeneração tecidual bem sucedida resultante do remodelamento da ECM, produz um fenótipo anti-inflamatório (Seif-Naraghi et al., 2010b).

Estudos realizados com métodos de degradação de ECM não fisiológicos, tais como a incubação com ácido e exposição ao calor podem causar danos a matriz, liberando um conteúdo de moléculas de baixa massa molecular (5 a 16 kDa) que podem apresentar atividade angiogênica, quimioatrativas e antimicrobiana. Isto é indicação de que a degradação do suporte de ECM é necessário para o remodelamento tecidual. Da mesma forma, se os suportes são resistentes à degradação, a resposta biológica é alterada para um panorama de encapsulamento fibroso e inflamação crónica. Estudos realizados por Reing e colaboradores (Reing et al., 2009) indicam que o uso de agentes biológicos, como papaína e pepsina, duas enzimas presentes em abundância em mamíferos, pode apresentar um padrão de liberação de moléculas ativas mais eficientes do que métodos randômicos. Ao longo do estudo, foi demonstrado que as moléculas derivadas do remodelamento dinâmico da ECM aumentam a migração de células indiferenciadas para a região em que o material está alocado, ao passo que células já diferenciadas foram inibidas (Higuchi et al., 2012; Seif-Naraghi et al., 2013; Takawale et al., 2015).

A degradação da ECM ocorre mediado por enzimas celulares que controlam a liberação de seus constituintes e de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico) e TGF-β (fator de transformação de crescimento β), que são responsáveis pelo desencadeamento das etapas subsequentes da regeneração (Badylak 2007).

1.1.2 Propriedades Biomecânicas

Por ser tecido específica, o local de onde ECM é coletada define suas propriedades mecânicas. Atualmente, materiais derivados de ECM de submucosa de intestino delgado são mais utilizados e estudados devido sua maior rigidez e força (Badylak 2007). Para a escolha do tecido mais adequado para coleta, é importante verificar se o tecido alvo possui alinhamento com as fibras de colágeno da ECM a ser utilizada, favorecendo a aderência das células à lâmina basal, beneficiando as características funcionais e contráteis do material, além de reduzir a taxa de apoptose por desligamento celular da matriz (Ma et al., 2004).

Apesar do amplo estudo realizado em suportes de ECM derivados de animais, ainda existe uma série de problemas que precisam ser solucionados para possibilitar sua aplicação em humanos. Entre esses problemas podemos citar, reação imunitária adversa e risco de transmissão de agentes patogênicos. Na busca por alternativas, os suportes de ECM começaram a ser fabricados a partir de cultura celular. Além que não apresentar os riscos descritos anteriormente, estudos têm mostrado que existe superioridade para a ECM derivada de células em relação a animal, uma vez que aumentam processos celulares presentes no remodelamento, e apresentar versatilidade, uma vez que diferentes tipos de células podem ser utilizados para fabricar diferentes tipos de ECM, com funcionalidade biológica deferentes. Como exemplo, a ECM sintetizada por células tronco mesenquimais (MSC) *in vitro*, mostrou facilitar a proliferação celular e prevenir diferenciação espontânea, além de aumentar o potencial condrogênico e osteogênicos das células colonizadoras (Daley et al. 2008).

Independente da origem do material, a descelularização é um processo necessário para preparar a ECM a partir de tecidos de animais ou células cultivadas. O objetivo da descelularização é maximizar a remoção dos componentes celulares ao mesmo tempo minimizando a perda de propriedades mecânicas e bioindutivas associadas ao material desenvolvido a partir da ECM (Rao Pattabhi et al. 2014).

1.2 Métodos de Processamento

1.2.1 Técnicas de descelularização

O processo de descelularização emprega uma série de agentes e protocolos que apresentam eficácia variada. Uma vez que a ECM é tecido-específica, algumas características do material devem ser analisadas, como quantidade de células presente, densidade, teor de lipídios e espessura, assim como a forma com que a descelularização será empregada, para garantir sua máxima eficácia. É importante salientar que o processo não é totalmente eficiente e que ocorrerá a alterações no conteúdo da ECM, assim como um certo grau de ruptura mecânica. O método mais adequado para o material a ser desenvolvido deve buscar a minimização desses efeitos indesejáveis (Badylak et al., 2015).

Um protocolo de descelularização geralmente é iniciado com a ruptura da membrana celular utilizando tratamentos físicos ou soluções iônicas, seguida da separação dos componentes celulares da ECM utilizando enzimas, solubilização de componentes citoplasmáticos e nucleares com detergentes e finalmente removendo os debris do tecido. Após a descelularização, todos os resíduos químicos devem ser removidos para evitar resposta adversa do hospedeiro (Gilbert et al., 2006).

1.2.1.1 Agentes químicos

Ácidos e bases causam a degradação hidrolítica de componentes do citoplasma e ácidos nucléicos, auxiliando em sua solubilização. Como por exemplo, ácido acético, ácido peracético (PAA), ácido hidroclórico, ácido sulfúrico e hidróxido de amônio[19]. Bases, como por exemplo hidróxido de cálcio e hidróxido de amônio são comumente utilizadas para remover o pelo a partir de amostras da derme durante as fases iniciais da descelularização. No entanto, elas podem eliminar completamente os fatores de crescimento da ECM e reduzir significativamente propriedades mecânicas em relação aos agentes químicos e enzimáticos, através da clivagem de fibrilas de colágeno e o rompimento de suas regiões de reticulação (Crapo et al., 2011; Young et al., 2011).

Choque osmótico com soluções hipertônicas e hipotônicas, como água deionizada, são utilizadas para lise celular. Soluções hipertônicas são capazes de dissociar DNA de proteínas, enquanto soluções hipotônicas podem causar a lise celular por efeitos osmóticos, com alterações mínimas em moléculas da matriz e da organização (Crapo et al. 2011, Gilbert et al. 2006, Young et al. 2011).

Os **detergentes não iônicos** são usados extensivamente devido aos efeitos relativamente brandos a estrutura do tecido. Detergentes não iônicos são capazes de quebrar interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína, mas não afeta interações proteínas-proteína, evitando a perda de funcionalidade (Gilbert et al. 2006).

Detergentes iônicos, são eficazes para solubilização de membranas citoplasmáticas e nucleares, mas tendem a desnaturar proteínas. Os mais utilizados são dodecilsulfato de sódio (SDS), Triton X-200 e desoxicolado de sódio (Gilbert et al. 2006).

Detergentes zwitteriônicos apresentam propriedade dos detergentes iônicos e não iônicos. Eles possuem maior tendência em desnaturar proteínas em relação aos não iônicos (Gilbert et al. 2006).

Solventes orgânicos, como fosfato de tri-*n*-butila (TBS), são utilizados para inativação de vírus no sangue, sem, no entanto, comprometer a coagulação. Entretanto, ele vem sendo utilizado como agente caotrópico para descelularização de tendões e enxertos de ligamento (Gilbert et al. 2006).

1.2.1.2 Agentes biológicos

O **método enzimático** de descelularização inclui o uso de proteases de digestão (tripsina, colagenase, lipase, dispase, termolisina e α-galactosidase), agentes quelantes de cálcio e nucleases. As enzimas podem proporcionar uma elevada especificidade para a remoção de resíduos celulares ou componentes de ECM indesejáveis. No entanto, a remoção completa das células por tratamento enzimático por si só é difícil e resíduos de enzima pode prejudicar recelularização ou provocar uma resposta imunitária adversa (Crapo et al. 2011, Young et al. 2011).

As nucleases (DNAases e RNAases) clivam as ligações internas das sequências de ácidos nucleicos e, consequentemente, ajudam na remoção de nucleotídeos após a lise das células. Enquanto isso, as exonucleases catalisam a quebra da ligação terminal de DNA e RNA acelerando sua degradação (Crapo et al. 2011, Young et al. 2011).

A colagenase pode ser utilizada durante a descelularização, mas apenas quando a preservação da estrutura não é crítica para a aplicação clínica pretendida. Lipases são utilizadas para deslipidização, mas normalmente o tratamento é insuficiente para remover todos os lipídios quando usada sozinha (Crapo et al. 2011, Young et al. 2011).

Agentes não enzimáticos, como de **quelantes** (ácido etilenodiamino-N,N,N',N'-tetraacético – EDTA e ácido bis(2-aminoetil)etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético - EGTA) formam uma estrutura circular que se liga firmemente com moléculas e isolam o íon metálico central (Gilbert et al. 2006), ajudando na dissociação de proteínas da ECM através do sequestro de cátions Ca^{2+} e Mg^{2+}, necessários para a ligação do colágeno à célula e da fibronectina ao receptor Arg-Gly-Asp. Entretanto, sozinhos, eles não são suficientes para a remoção de células superficiais mesmo sob agitação, dessa forma, são utilizados em combinação com enzimas (Gilbert et al. 2006) ou detergentes (Crapo et al. 2011, Young et al. 2011).

1.2.1.3 Agentes físicos

Processamento por **congelamento** é uma forma eficaz de lisar células, uma vez que cristais de gelo são formados, rompendo a membrana celular. Entretanto, a temperatura deve ser controlada com cuidado para os cristais não romperem a ECM. Os conteúdos membranosos e intracelulares resultantes permanecem no tecido, sendo, dessa forma, necessário a utilização de processamentos subsequentes para retirá-los (Gilbert et al. 2006). Um único ciclo de congelamento-descongelamento pode reduzir respostas imunitárias adversas, tais como a infiltração de leucócitos em suportes ECM vascular e não aumentam de forma significativa a perda de proteínas a partir de tecido de ECM. Esse tipo de processamento produz perturbações menores da estrutura ECM (Crapo et al. 2011).

Células na superfície de um tecido ou órgão podem ser removidas por **ação mecânica (força e pressão)**. Entretanto, esse método só é eficiente para tecidos que não são caracterizados como densa organização de ECM. Para ampliar o leque de possibilidades, a ação mecânica pode ser usada em combinação com enzimas, solução salina hipertônica ou agentes quelantes (Crapo et al. 2011).

A **pressão hidrostática** requer relativamente pouco tempo e pode ser mais eficaz do que os detergentes ou enzimas para a remoção de células de vasos sanguíneos e tecidos da córnea, embora a formação de cristais de gelo possa perturbar a estrutura da ECM (Crapo et al. 2011).

Impulsos elétricos de curta duração (**eletroporação/sonicação**) são aplicados em um tecido, o que induz a formação de microporos na membrana celular, levando-a à morte. A agitação e sonicação podem ser utilizados simultaneamente com tratamentos químicos na promoção da lise ou remoção do conteúdo celular remanescente (Crapo et al. 2011, Gilbert et al. 2006).

1.2.1.4 Avaliação

Mesmo após inúmeros procedimentos, ainda há a possibilidade de encontrar material residual na ECM, o que contribui para incompatibilidade do material com o hospedeiro. Embora não seja possível remover 100% de material celular, é possível quantificar os componentes ainda presentes (dsDNA, mitocôndrias, moléculas associadas à membrana) e encontrar um limiar de concentração suficiente para eliciar uma resposta negativa ao material (Crapo et al. 2011, Young et al. 2011).

Os seguintes critérios são suficientes para considerar um material seguro:

- <50 ng dsDNA por mg ECM peso seco;
- <200 pb de comprimento de fragmentos de DNA;
- falta de material nuclear visível em cortes de tecidos corados com 4',6-diamidino-2 fenilindole (DAPI) ou H&E.

1.3 Biomateriais baseados em suportes de ECM

Diferentes tipos de nanofibras são utilizados para uma ampla diversidade de estudos com tecidos artificialmente fabricados, incluindo tecidos cardiovasculares, ósseo e neural. Entretanto, a maioria desses materiais são fabricados sinteticamente, enquanto uma pequena parcela é composta de polímeros naturais híbridos com componentes sintéticos, que, por sua vez, falham na tentativa de mimetizar a morfologia da ECM natural. Com o objetivo de replicar os padrões químicos e biológicos da ECM natural, pesquisadores adotaram a estratégia de fabricar esses materiais através de tecido animal ou cultura celular in vitro (Badylak et al., 2015; Xing et al., 2014).

Apesar de todos os materiais de origem natural mostrarem algum tipo de benefício, nenhum deles conseguiu apresentar uma estrutura fibrosa organizada da ECM, sendo essa uma característica crucial para simular o tecido e influenciar positivamente a resposta do hospedeiro. Para conseguir esse tipo de estrutura, é possível utilizar lâminas celulares em combinação tecnologia de microfabricação (Rao Pattabhi et al. 2014, Xing et al. 2014).

Outra alternativa para medicina regenerativa é a utilização de células tronco embrionárias (ESCs) semeadas em suportes biológicos, auxiliando na recolonização celular. Apesar da capacidade de diferenciar-se em diversos tecidos, as ESCs humanas apresentam uma questão ética e a possibilidade de rejeição imune após transplante, fatos que dificultam sua utilização. Como alternativa, podem ser utilizadas células-tronco mesenquimais (MSC), que são células multipotentes que podem ser obtidas de medula óssea, polpa dentária e tecido adiposo (Higuchi et al. 2012).

As características das células tronco são reguladas não apenas pelas células, mas pelo microambiente ao seu redor. Dessa forma, ao mimetizar o seu microambiente através de um biopolímero é mais fácil levar a célula a diferenciar-se para o tecido desejado, além de aumentar o número de células disponíveis para a reconstrução tecidual. Diversos fatores influenciam nesse processo, como (a) proteínas solúveis como fatores de crescimento e citocinas; (b) interação célula-célula; (c) interação célula-biopolímero e (d) fatores físicos, como a rigidez no material (Higuchi et al. 2012, Rao Pattabhi et al. 2014).

Formas alternativas de materiais de ECM, como pó ou gel, alterarão as propriedades mecânicas do suporte, mas em contrapartida, podem garantir características que facilitem ou aumentem a aplicabilidade clínica, como a possibilidade de injeção do material, tornando o processo minimamente invasivo (Badylak et al. 2015).

Lâminas liofilizadas de tecidos descelularizados podem ser fragmentadas em uma ECM em pó, possuindo ainda algumas poucas características da estrutura original. A formulação em

pó tem a vantagem de poder ser utilizada para aplicação tópica, em suspensão ou combinada sinteticamente com polímeros para criar um suporte hibrido (Badylak et al. 2015).

Alternativas para enxerto ósseo tais como a matriz óssea desmineralizada (DBM), têm sido desenvolvidas para vencer as limitações do auto-enxertos e enxertos. O produto final da desmineralização é um pó que, por comodidade, é incorporado num veículo biocompatível viscoso que proporciona uma suspensão estável de partículas de pó DBM (Gruskin et al., 2012). Os veículos mais utilizados são: hialuronato de sódio, carboximetilcelulose ou glicerol. Estudos realizados com esses veículos e DBM mostraram diferentes respostas osteogênicas, mas não se sabe o motivo exato desse desvio. Podendo ser referente a quantidade de DBM que o veículo pode carregar e/ou a capacidade que o material tem de transportar as partículas até o local em que que encontra o defeito ósseo (Wang et al., 2007).

Muitas vezes o método de aplicação de suportes rígidos de ECM pode causar mais danos que benefícios ao paciente, devido a agressão tecidual proveniente da aplicação invasiva do material. Para tornar o material mais versátil e adequado ao uso, seria interessante a utilização de materiais na forma líquida ou em gel, que podem ser levados ao local da lesão através de um cateter ou uma agulha. A reologia do gel pode ser desenhada a fim de mimetizar a do tecido que deve ser reconstruído. Outra vantagem da utilização do material em gel está nos métodos de processamento, que minimizam ou evitam etapas de purificação, que podem remover os fatores de crescimento e outras moléculas ativas da ECM, evitando alterações excessivas na bioatividade da ECM nativa (Badylak et al. 2015).

Na busca por tratamentos alternativos que pudessem ser utilizados na regeneração de tecidos afetados por infarto no miocárdio, Seif-Naraghi e colaboradores desenvolveram um hidrogel de ECM de miocárdio ventricular porcino descelularizado e digerido parcialmente com pepsina. Os resultados *in vitro* mostraram que o material promove a maturação de hESC, sua diferenciação em células cardíacas e sobrevivência das células progenitoras. Testes *in vivo* utilizando modelo de roedor mostrou aumento na sobrevivência de cardiomiócitos após 1 semana de injeção do material, enquanto em modelo porcino, houve um aumento da área muscular e em áreas de neovascularização após 3 meses de injeção (Seif-Naraghi et al., 2010a, 2010b, 2013).

Apesar dos materiais desenvolvidos até então terem bons resultados referentes as propriedades bioindutivas, muitos dele, principalmente géis baseados em colágeno e ECM, apresentam rápida taxa de biodegradação, assim como baixa resistência mecânica, reduzindo a aplicação do material (Ma et al. 2004). Com o objetivo de desenvolver um material com propriedades mecânicas mais robustas que os desenvolvidos até então, Duan e colaboradores utilizaram a estratégia de reticular colágeno com ácido adípico ativado com N-

hydroxisuccinimida (NHS-AA) resultando em um gel com temperatura de desnaturação (Td) acima de 36ºC (aumento da Td é dose dependente ao NHS-AA). Além disso o módulo elástico medido apresentou-se mais elevado que o módulo viscoso, indicando que o material pode ficar em contato por mais tempo com o organismo hospedeiro (Duan et al., 2014).

Na busca por um modelo *in vitro* que representasse de maneira mais fidedigna a complexidade 3D da ECM cardíaca, Russo e colaboradores propuseram a utilização de géis ou espumas derivadas de ECM ao invés da utilização de matrizes 2D de colágeno ou outros componentes da ECM. Esse material até então utilizado direcionava erroneamente o comportamento celular e consequentemente comprometia os resultados, dificultando a translação do experimento *in vitro* para *in vivo*. O estudo realizado desenvolveu uma espuma de ventrículo esquerdo porcino descelularizado (DLC) tratada de duas maneiras: (a) picada e (b) digerida com α-amilase de *Aspergillus oryzae*; e em seguida reticuladas através da redução de temperatura, com o objetivo de aumentar a resistência do material. Foi analisada a diferenciação celular na espuma, através de imunohistoquímica (IHC) de proteínas marcadores e expressão gênica por RT-PCR. Foi encontrado que o material aumentou a taxa de diferenciação em relação ao controle (colágeno I), indicando que houve um desenvolvimento de um ambiente mais permissivo à diferenciação celular (Russo et al., 2015).

1.3.1 Método de reticulação

Técnicas de reticulação podem ser utilizadas para aumentar a resistência mecânica do material a fim de facilitar sua implantação no hospedeiro. O princípio de reações de reticulação está na modificação de cadeias poliméricas lineares ou ramificadas que são interligadas através de ligações covalentes, produzindo um polímero de alta massa molecular. Diversos métodos foram criados para realizar reticulação física, química e enzimática.

No caso das moléculas de ECM, a técnica gera hidrogéis, estruturas tridimensionais gelificadas através da reticulação física ou química, sendo capazes de absorver grandes quantidades de água (Higuchi et al. 2012).

Reticulação física pode ser induzido por irradiação UV (foto reticulação) ou exposição das moléculas a fontes térmicas. Proteínas da ECM com propriedades termosensíveis de LCST (temperatura de solução crítica inferior) e USCT (temperatura de solução crítica superior), como colágeno e gelatina são facilmente reticuladas através de sua dissolução em água em temperaturas específicas e formar géis a partir do aumento ou diminuição dessa temperatura. Entretanto, a maioria das proteínas e oligopeptídeos derivados da ECM necessitam de outros métodos de reticulação, como os descritos a seguir (Higuchi et al. 2012).

Foto reticulação é baseado na indução da formação de ligações duplas em presença de radiação UV. Moléculas derivadas da ECM apresentam grupos funcionais –OH, -NH_2 e – COOH,

que podem reagir com cloreto de acriloíla, metacrilato de glicidíla e metacrilato de 2-aminoetila, incluindo ligações duplas à estrutura proteica, como exemplifica a **Figura 2**. A polimerização por adição desta estrutura, induzido por luz, calor ou agente químico, gera o reticulado (Higuchi et al. 2012).

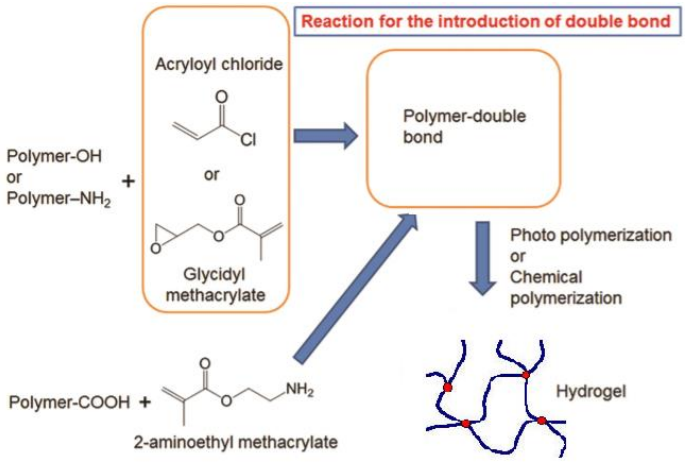


Figure 2. Método de preparação de hidrogel a partir da técnica de foto reticulação (alterado de (Higuchi et al. 2012)).

O tratamento com irradiação UV e tratamento térmico aumentam a resistência do material igualmente, quando usam suportes de colágeno. Para o processo, entretanto, irradiação UV necessita de 15 min ao invés de 3 a 5 dias, quando comparado com o tratamento térmico. Entretanto, luz UV só é efetiva para suportes finos e/ou transparentes, que possibilitam a passagem da irradiação pela estrutura (Badylak et al. 2015).

Hidrogéis de ECM também podem ser preparados através de **reticulação química**. Os reagentes mais utilizados são acoplamento (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)/N-hidroxisuccinimida (EDC-NHS), que promove a ligação de amino grupos como ácidos carboxílicos, suberimidato de 1,6-dimetila dihidrocloreto (DMS), diisocianato de hexametileno (HDI), glutaraldeído e genipina, que produzem a ligação entre amino grupos. Atualmente o glutaraldeído não é mais tão comum para a preparação de hidrogéis destinados a materiais para medicina regenerativa devido a sua toxicidade. Para superar essa barreira a genipina está sendo mais estudada devido a sua baixa toxicidade. Entretanto, esses estabilizadores químicos deixam potenciais resíduos tóxicos no material. Uma alternativa a ligações covalentes é promover a formação de ligações iônicas entre as moléculas de colágeno. Isso pode ser alcançado através de moléculas policatiônicas como quitosana, que formam ligações iônicas entre os grupos amina e carboxila do colágeno. Essas ligações são fortes o suficiente para estabilizar o biomaterial. A maior vantagem desse processo é a preparação em uma etapa, na qual a quitosana é misturada

com o colágeno antes do congelamento a seco, evitando a necessidade de novas lavagens, uma vez que quitosana não é tóxica (Badylak et al. 2015).

A transglutaminase pode ser usada para realizar **reticulação enzimática** para aumentar a resistência enzimática do material. A maior vantagem está na abordagem da utilização de uma técnica de polimerização biológica na qual não há resíduos no material, eliminando o risco de induzir efeitos citotóxicos (Badylak et al. 2015).

2. Justificativa e Objetivos

2.1 Objetivo geral

Materiais destinados à reparação tecidual devem apresentar propriedades mecânicas e biológicas compatíveis com o tecido danificado. Entretanto, a maioria dos produtos encontrados no mercado falham na tentativa de mimetizar a funcionalidade da ECM, devido a sua composição majoritariamente sintética. Com o objetivo de replicar seus padrões químicos e biológicos iniciou-se a fabricação de materiais descelularizados derivados de fonte animal ou cultura celular *in vitro* (Badylak et al. 2015, Xing et al. 2014).

Apesar dessa nova abordagem apresentar alguns benefícios de caráter regenerativo, nenhum deles possuía uma estrutura organizada como a da ECM, sendo essa uma característica crucial para uma resposta positiva do hospedeiro (Rao Pattabhi et al. 2014, Xing et al. 2014). Adicionalmente, da agressão do processo de implante de um suporte rígido, pré-moldado, que em alguns casos, pode levar a danos teciduais desnecessários e inviabilidade clínica. Assim, espera-se que os novos materiais desenvolvidos sejam menos agressivos, apresentados em formas alternativas, como pó ou gel, próprios para processos de injeção.

Desta forma, o projeto busca desenvolver um hidrogel injetável, produzido a partir de ECM digerida enzimaticamente e reticulada com derivados de PEG ou ácido adípico, possibilitando a criação de um material que apresenta uma estrutura mecânica mais rígida e com menor taxa de degradação em relação aos materiais desenvolvidos até então.

2.2 Objetivos específicos

(a) produzir e caracterizar ECM descelularizada digerida a partir de matrizes descelularizadas comerciais originadas de pericárdio bovino, osso bovino e tendão bovino. Esta digestão foi otimizada para as enzimas: colagenase, pepsina e tripsina;

(b) caracterização dos digeridos de ECM quanto a sua atividade biológica, através de ensaios de adesão, proliferação e diferenciação celular;

(c) síntese de ácido adípico NHS-ativado;

(d) estudo da reação de gelificação com agentes reticulantes comerciais e sintetizados;

(e) caracterização físico-química dos hidrogéis obtidos em (d).

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes

Tolueno, trietilamina, acetona, etanol (Synth), tetraidrofurano (THF) e éter etílico (Sigma Aldrich) foram secos e previamente destilados.

N-bromossuccinamida (NBS) e N-hidroxissucinimida (NHS) foram recristalizados e dimetil sulfeto (DMS) e poli(etileno glicol) (PEG) (Sigma Aldrich) foram secos antes de utilizados.

Cloreto de cálcio anidro, pentóxido de fósforo, ácido acético glacial, sulfato de magnésio ($MgSO_4$), hidróxido de potássio (KOH), permanganato de potássio, acetato de etila (Synth), hidreto de cálcio (CaH_2), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de ferro II ($FeSO_4$), sódio e magnésio e iodo (Na^0, Mg^0 e I_2, respectivamente) (Sigma Aldrich) forma utilizados na purificação dos reagentes.

As peneiras moleculares de 4Å (Sigma Aldrich) foram previamente ativadas a 300◦C por 6 horas.

Ácido adípico e 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiamida hidrocloridrico (EDC) (Sigma Aldrich) foram utilizados na síntese dos reticulates conforme recebidos. Fucsina básica, ácido clorídrico, acetaldeído e bissulfito de sódio (Synth) foram utilizados na caracterização dos reticulates sem purificação prévia.

A caracterização do perfil proteômico das ECM foi feito utilizando os seguintes reagente sem purificação prévia: ureia, tioureia, bicarbonato de amônio (Synth), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), iodoacetamida (IAA), ditiotritol (DTT), ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrila, ácido fórmico (Sigma Aldrich), tripsina modificada com grau de sequenciamento (Promega) e discos de sílica C18 (3M).

Os seguintes materiais foram utilizados no procedimento de digestão enzimática sem purificação prévia: patch de pericárdio bovino HP (HpBio), tendão de Aquiles bovino em pó (Alfa Aesar), matriz desmineralizada de osso bovino (Baumer), colagenase derivada de *Clostridium histolyticum*, tipo IA, tripsina derivada de pâncreas porcino, 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,-diol (TRIS) (Sigma Aldrich), pepsina derivada de mucosa gástrica porcina (Alfa Aesar) e cloreto de cálcio (Synth). A caracterização foi feita utilizando *protein ladder page ruler prestained* SM0671 *(*Invitrogen), ProteoSilver: Silver Stain Kit, QuantiPro BCA Assay, condroitina sulfato derivado de cartilagem de tubarão, 1,9 - dimetil-metileno blue (DMMB) e glicina (Sigma Aldrich) e padrões de poliestireno (PS) (Aldrich/Waters).

Para cultura célular foram utilizados os seguintes materiais conforme recebidos: *Minimum essential medium Eagle*, α modification (α-MEM), *Minimum essential medium Eagle:*

Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), soro fetal bovino (SFB), anfotericina B, penicilina, estreptomicina (Gibco), dexametasona, ácido ascórbico, glicerofosfato, p-nitrophenyl phosphate liquid substrate system, corante vermelho de alizarina, cloreto de cetilpiridínio, formaldeído (Sigma Aldrich) e Alamar Blue (Invitrogen).

Gelatina tipo B derivada de pele bovina bloom 75, glutaraldeído, poli(etileno glicol) diglicidil éter 500Da (PEGDG) (Sigma Aldrich) foram utilizados para produção dos géis, sem purificação prévia.

3.2 Métodos

3.2.1 Purificação dos reagentes

O tolueno foi pré-seco em cloreto de cálcio, aquecidos sob refluxo na presença de pentóxido de fósforo e, então, destilado. O armazenamento foi feito com peneiras moleculares de 4Å. O PEG foi purificado por destilação azeotrópica de tolueno. O produto foi analisado em Karl-Fischer (modelo KF Caulometer 831 Ω Metrohm com solução de Hidranal - Sigma Aldrich). A N-bromosuccinimida (NBS) foi recristalizada de ácido acético glacial. O dimetil sulfeto (DMS) foi previamente seco de $MgSO_4$ anidro. A trietilamina destilada de KOH, submetida a refluxo em CaH_2 por 18h e em seguida foi destilada sob refluxo. A acetona foi submetida a 4h de refluxo na presença de permanganato de potássio e em seguida foi destilada. A N-hidroxisuccinimida - NHS foi recristalizada de acetato de etila. O THF foi submetido a refluxo com KOH e destilado de Na^0. Éter etílico foi tratado com $FeSO_4$, destilado de NaOH e em seguida de Na^0. Etanol absoluto foi preparado a partir de refluxo em Mg^0/I_2 e destilado (Armarego, W. L. F. and Perrin, 1996).

3.2.2 Síntese dos Dialdeídos derivados de PEG pela Oxidação de Corey-Kim

Para oxidação das extremidades hidroxílicas do PEG a aldeído foi utilizado a metodologia proposta por Corey-Kim (Corey and Kim, 1972).

Em um balão de fundo redondo com três bocas, 0,06 mol de NBS foi dissolvido em tolueno a 40°C. Em seguida, a solução foi resfriada para 0°C e 0,1 mol de DMS foi adicionado. Após o surgimento de um precipitado branco, o balão foi resfriado a -25°C e uma solução de 0,02 mol PEG e tolueno foi adicionado. A mistura permaneceu sob agitação por mais 2h, seguido pela adição de 0,06 mol de trietilamina em tolueno. O sistema foi então resfriado a temperatura ambiente e o produto foi extraído em éter etílico e rotoevaporado. O produto foi caracterizado por FTIR (Perkin Elmer, mod. Frontier) em pastilha de KBr.

Para identificação da presença do grupamento carbonílico, foi utilizado o método colorimétrico proposto por Stoward e Harris (Harris et al., 1984; Stoward, 1966), no qual o reagente de Schiff em presença de um aldeído muda a coloração da solução de alaranjado para rosa.

Para produção do reagente de Schiff, foi adicionado 0,1g de fucsina básica em 100mL de água a aproximadamente 100°C. Após dissolução dos cristais, adicionou-se 1g de bissulfito de sódio e 1mL de HCl concentrado.

A leitura de absorbância foi feita com o Espectrômetro Cary 50 UV-vis (Varian/Agilent Technologies) dentro do intervalo 500nm ≤ λ ≤ 620mm e comparado com a curva padrão utilizando acetaldeído.

3.2.3 Síntese dos Ésteres Ativados de NHS

A síntese do éster de ativado de ácido adípico foi realizada de acordo com a metodologia de Chen (Chen et al., 2011), no qual o ácido adípico é misturado com NHS na relação de 1:2, utilizando acetona como solvente. Após completa dissolução dos sólidos, foi adicionado 2 equivalentes de EDC com 10% de excesso e a reação foi deixada sob agitação por 24h a temperatura ambiente.

Ao final da reação o produto foi seco em bomba de vácuo em seguida lavado com água gelada para separar a ureia do éster.

3.2.3.1 Caracterização dos reticulantes

3.2.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Para identificação dos grupos funcionais da molécula, foi utilizado espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier no espectrômetro Perkin Elmer, modelo Frontier, da Central Analítica do Instituto de Química. A amostra foi preparada em pastilha de KBr.

3.2.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Análise estrutural da molécula foi feita pela técnica de RMN de 1H, em equipamentos Bruker 300MHz ou 500MHz, modelos AIII300 ou AIII500 da Central Analítica do Instituto de Química da USP.

3.2.4 Digestão da ECM

Foi realizada a digestão de tendão bovino (ECMt), ECM óssea (ECMo - *demineralized bovine cortical bone*) e ECM de pericárdio (ECMp - *bovine pericardium*) om pepsina, tripsina e colagenase.

Inicialmente, ECMp foi lavada três vezes com PBS 1x, liofilizada e moída no moinho de bolas Pulverisette 6 (Fritsch) por 5min com rotação de 600 rpm. Em seguida, o material foi lavado com salina 0,9% antes do início da reação.

A metodologia de digestão enzimática foi baseada no protocolo proposto por Willians (Williams et al. 2015), no qual a ECM foi adicionada em solução enzimática (1mg/mL) na concentração de 10 mg/mL. A digestão foi realizada a temperatura ambiente sob agitação constante de 100 rpm em agitador de rotação orbital. O processo foi realizado de duas maneiras diferentes: (1) de forma contínua, na qual a ECM permaneceu em contato com a solução

enzimática até total degradação; e (2) em etapas, sendo interrompido nos tempos 1h, 3h, 6h, 8h, 24h e 72h.

Para digestão com pepsina utilizou-se uma solução de 0,1M HCl (Seif-Naraghi et al. 2010a). Para digestão com colagenase utilizou-se o tampão TRIS-HCl 10mM com cloreto de cálcio 2mM e pH 7,4 (Sun et al., 2013). E para tripsina, utilizou-se PBS 1x (Ruggiero et al., 2013).

3.2.4.1 Análise do produto de digestão

Ao final do período estipulado para digestão, o material foi centrifugado por 5 min a 10000 rpm e 5°C, para separar a porção solúvel e insolúvel do material. O sobrenadante foi coletado e caracterizado quanto a concentração de peptídeos e glicosaminoglicanos (GAGs) em solução, presença de estruturas secundárias e padrão de digestão.

3.2.4.1.1 Ensaio com corante azul de dimetilmetileno – DMMB

A quantificação de GAGs foi realizada através do ensaio de DMMB descrito no trabalho de Zheng e Levenston (Zheng and Levenston, 2015).

Inicialmente foi preparado o reagente de DMMB: 8mmol de DMMB foi dissolvido em 5mL de etanol. Em seguida, foi adicionado a uma solução contendo 40mM de glicina e 40mM de NaCl e seu volume foi completado para 1L. Para finalizar o pH foi ajustado para 3.

Para leitura da absorbância, 20µL de amostras foi adicionado em 200 µL do reagente DMMB e analisado no leitor de micro-placas Infinite 200 Pro NanoQuant (Tecan) no comprimento de onda λ = 535nm e em seguida comparado com a curva padrão de condroitina.

3.2.4.1.2 Ensaio de ácido bicinchoninico - BCA

Para a quantificação de peptídeos em solução, foi utilizado o kit *QuantiPro BCA Assay* da Sigma-Aldrich, de acordo com as instruções do fabricante. A leitura de absorbância foi feita em λ = 532nm utilizando leitor de micro-placas Infinite 200 Pro NanoQuant (Tecan). A curva padrão foi feita utilizando BSA.

3.2.4.1.3 Análise Estatística

As análises de quantificação de peptídeos e GAGs foram feitas em quadruplicata. Para verificar a normalidade dos dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste T de Student, para verificar a diferença entre os dois grupos (digeridos diretos e em etapas). Para ajuste de p-valor, foi utilizado o método de Bonferroni.

3.2.4.1.4 Dicroísmo Circular

Antes da análise, as amostras digeridas foram filtradas com membrana de 0,22µm da MilliPore. Os espectros foram medidos utilizando o espectropolarímetro Jasco JW720. Foi realizada uma varredura do comprimento de onda entre 190nm $\leq \lambda \leq$ 300nm, velocidade de 20nm/min, *accumulation* de 3, fluxo de nitrogênio de 4L/min.

3.2.4.1.4 Eletroforese em SDS-PAGE

Utilizou-se gel de SDS-PAGE (gel de empacotamento 4% e gel de resolução 12%) em tampão de corrida (24,8mM Trisma, 0,192M glicina e 0,1% w/v SDS) por 40 min a 200V. O gel foi corado com o *kit ProteoSilver Silver Stain*. O tamanho e o número de bandas foram analisados através da comparação com o marcador molecular *Protein Ladder Page Ruler Prestained SM0671.*

3.2.4.1.6 Gel Permeation Chromatography

Os valores de massa molar ponderal média $\bar{M}w$, massa molar numérica média $\bar{M}n$, e índice de polidispersividade (IPD, razão $\bar{M}w \; \bar{M}n /$) foram determinados através de cromatografia por exclusão de tamanho (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) em um cromatógrafo Viscotek 305 TDA (Malvern Instruments), equipado com detector triplo (índice de refração com cela a 35◦C, espalhamento de luz e viscosímetro), *loop* de 200 µL, bomba VE 2001 operando com fluxo 0,3 mL/min e utilizando tampão fostato 100mM com 0,3M NaCl como fase móvel.

Foi utilizada uma pré-coluna Shodex (KW-G 6B) conectadas em série com uma coluna Shodex do modelo KW-803 (8x300 mm, limite de exclusão de 1.000.000 g/mol). A calibração foi feita utilizando proteínas de massas molares conhecidas: Mw 14.300 Da (Lisozima), 25.000 Da (α-quimiotripsina), 54.000 Da (lipoxidase monomero), 69.293 Da (BSA), 108.000 DA (lipoxidase), 138.586 Da (BSA dímero) e 207.879 Da (BSA trímero).

3.2.5 Análise proteômica das ECMs

3.2.5.1 Preparação de amostra

As proteínas das amostras de ECMo, ECMp e ECMt foram solubilizadas em tampão ureia (6M ureia/2M tioureia pH 8) em presença de PMSF e centrifugadas por 10 min a 10000 rpm (4°C) para separar os contaminantes. Em seguida foi realizada redução (5mM DTT por 25min à 56◦C) e alquilação (14mM IAA - por 30 min no escuto à temperatura ambiente), *quenching* da IAA livre (5mM DTT por 15min no escuto à temperatura ambiente). A amostra foi então diluída na proporção 1:5 (v/v) em solução 50mM bicarbonato de amônio. Em seguida, a amostra foi incubada por 16h com tripsina (1:50 w/w) a 37°C. A reação enzimática foi interrompida adicionando TFA na concentração final 0,4%, dessalinizadas em C18 (Empore, 3M) e secas em *speedvac* (Flores et al. 2016).

3.2.5.2 Cromatografia Líquida Acoplada com Espectrômetro de Massas em Tandem (LC-MS/MS)

As amostras de peptídeos foram diluídas em ácido fórmico 0,1% e analisadas no espectrômetro q-TOf Maxis 3G (Brucker Daltonics) acoplado com o cromatógrafo Nano LC Acquity (Waters). Os peptídeos foram separados em duas etapas: (1) a etapa de *trapping* foi realizada utilizando a coluna nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap Symmetry® C18 (180 µm x 20 mm,

5µm), fluxo de 7 µL/min com ácido fórmico 0,1% por 3min; (2) durante a etapa analítica foi utilizada a coluna nanoAcquity UPLC® BEH130 (100 µm x 100 mm, 1.7µm), gradiente de acetonitrila (2-85%) em 0,1% de ácido fórmico em fluxo de 300 nL/min durante 85 min. A voltagem do *eletrospray* (CaptiveSpray) foi de 2 kV e temperatura de 150°C. As análises foram realizadas em *Full scan* (m/z 300-1600), a resolução no equipamento foi ajustada para r= 60.000 e os 20 íons mais intensos, com carga ≥ 2, foram isolados para um *target-value* de 5000 e fragmentados por CID (dissociação induzida por colisão – normalização de energia de colisão de 35%). O limiar para acionar o MS/MS foi definido como 1000 contagens. Foi utilizada exclusão dinâmica com limite de exclusão de 500, duração de exclusão de 60s e repetição de contagem de 1 (Flores et al. 2016).

3.2.5.3 Análise de bioinformática

A análise dos dados brutos foi realizada inicialmente utilizando o algoritmo Andromeda do software MaxQuant versão 1.5.6.5 (Max Plank Institute of Biochemistry) para a identificação de proteínas contra o banco de dados UniProt para *Bos taurus*, 23969 sequências, 25 de setembro de 2017). Os parâmetros de buscas foram ajustados para máximo de dois *missing cleavages*, erro máximo de 40ppm para buscas em MS e 0,01Da para MS/MS. As proteínas foram identificadas por pelo menos 1 peptídeo único.

O proteoma total foi analisado incluindo acetilação, oxidação e hidroxiprolina como modificações variáveis e carbometilações como modificações fixas. Uma segunda análise foi realizada para identificação de peptídeos que possuíssem uma ou mais das seguintes MPT: Cys-Cys, Deaminação (N), Hidroxiprolina, Oxidação (M), Fosfoilação (P) e Sulfação (S) (Byron et al., 2013). Para ambas as análises, a quantificação foi realizada pelo método *label-free* previamente descrito e implementado no software MaxQuant (Cox et al., 2014). Os dados obtidos foram pré-processados para eliminação de identificações de falso-positivos e proteínas contaminantes usando o software Perseus versão 1.3.0.4 (Max Plank Institute of Biochemistry).

Anotação funcional e identificação de proteína foi realizada utilizando o banco de dados UniProt e *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al., 2000). O enriquecimento da análise foi realizado com a ferramenta BiNGO (Maere et al., 2005) presente no *Cytoscape* (Smoot et al., 2011).

3.2.6 Análise de Atividade Biológica *in vitro*

Para análise de atividade biológica da ECM digerida foram utilizadas células tronco mesenquimais de medula óssea (BMMSC) na passagem 2 (cultivada com α-MEM), que foram fornecidas pelo Centro de Terapia Celular (CTC) da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED) na passagem 14 (cultivada com DMEM/F-12).

3.2.6.1 Preparação de Meio de Cultura

- Meio de proliferação padrão: α-MEM ou DMEM/F-12 suplementados com 10% de SFB, 0,25 µg/mL de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL estreptomicina;
- Meio osteogênico: dexametasona (100 nM), ácido ascórbico (50 µg / mL) e β-glicerofosfato (10 mM);
- Meio suplementado com ECM digerida: As amostras de digeridos de ECM (digestão contínua e em etapas) foram liofilizadas e adicionadas no meio de cultura nas concentrações finais de 5 µg/ml, 25 µg/ml e 250 µg/ml. A solução final foi filtrada com membrana de poros de 0,22µm (Millipore).

3.2.6.2 Diferenciação Osteoblástica

MO-58 e SHEDs foram semeadas em placas de 24 poços a uma concentração de $3x10^4$ e $5x10^4$ células/poço, respectivamente, e cultivadas por 48h em meio de proliferação padrão. Após esse período, passou-se a utilizar o meio de cultura osteogênico suplementado com ECM por mais 21 dias (meio osteogênico puro foi utilizado como controle). A cultura celular foi mantida em uma atmosfera umidificada 95% ar e 5% CO_2 a 37°C.

3.2.6.2.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A capacidade de osteogênica foi avaliada nos dias 9, 14 e 21, através da verificação da atividade da enzima fosfatase alcalina. A metodologia utilizada seguiu as indicações do fornecedor (p-*Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System*). No protocolo sugerido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas no escuro por 30 min com 0,25mL de substrato para ALP a 37°C. Em seguida, foi medida a absorbância da solução usando λ = 405nm no leitor de micro-placas Infinite 200 Pro NanoQuant (Tecan).

3.2.6.4.2 Coloração vermelho de alizarina (ARZ)

Adicionalmente, foram realizados experimentos com o corante Vermelho de Alizarina, capaz de detectar a mineralização de fosfato de cálcio nas células. Como descrito em Evans (Evans et al., 2012), nos dias 14 e 21, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas por 20 min utilizando a solução fixadora. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com a solução corante por 5min. A seguir, a solução foi removida, as células foram lavadas e o material corado foi então diluído em a solução de cloreto de cetilpiridínio por 1h, no intuito de quantificar a mineralização através da leitura de absorbância usando λ = 570nm.

- Solução Fixadora: 10% formaldeído em PBS (v/v);
- Solução Corante: 1% Vermelho de alizarina (w/v) e 2% etanol absoluto (v/v) em água, pH 4,2;
- Solução de cloreto de cetilpiridínio 10% (w/v);

3.2.6.3 Ensaio de Proliferação Celular

Para o ensaio de proliferação foi utilizada uma modificação da metodologia de Pattabhi (Rao Pattabhi et al. 2014): MO-58 foram semeadas a uma concentração de $1x10^4$ células/poço em placas de 24 poços e incubadas utilizando meio de proliferação padrão suplementado com ECM e como controle foi utilizado o meio padrão puro. A cultura celular foi mantida em uma atmosfera umidificada 95% ar e 5% CO_2 a 37°C.

A quantificação da atividade metabólica das células em proliferação foi realizada nos dias 3, 7 e 14. Nos quais, foram adicionados o reagente *Alamar Blue* a uma concentração de 10% (v/v) e incubadas novamente de 1h30 a 37°C. Ao final desse período foi feita a leitura da fluorescência do composto em λ = 590nm (Rampersad, 2012).

3.2.6.4 Ensaio de Adesão Celular

O ensaio de adesão celular foi realizado em placas de 24 poços, no qual MO-58 foram semeadas $3x10^4$ células/poços e incubadas com meio de proliferação padrão suplementados com ECM. As células foram mantidas na estufa por 4h a 37°C e 5% CO_2. Em seguida o meio foi removido e a atividades metabólica das células aderidas foi quantificada através do teste de *Alamar Blue*, conduzido assim como descrito acima.

3.2.7 Produção de Hidrogéis

A estratégia utilizada para o desenvolvimento do hidrogel é baseada na reticulação de polímeros, que apresentam grupos funcionais terminais de alta reatividade capazes de ligarem-se com grupos presentes nos resíduos de aminoácidos. No caso, o alvo da ligação foram os amino-grupos.

Devido ao tamanho reduzido dos peptídeos em solução, o material digerido (previamente liofilizado) foi misturado com gelatina tipo B derivada de pele bovina bloom 75, para melhorar a capacidade de gelificação do material. A ECM digerida, juntamente com a gelatina foram dissolvidas em PBS em banho-maria de 50°C.

Foram testadas diferentes concentração de gelatina e ECM, como descrito na **Tabela 1**, utilizando duas abordagens: (1) mantendo a massa de gelatina fixa e adicionando ECM e (2) mantendo a massa final de proteína inalterada. Com o intuito de identificar em qual delas as propriedades mecânicas condizem com a aplicação desejada.

Concentração fixa de gelatina (mg/mL)	Concentração final fixa (80mg/mL)
80mg gelatina + 10mg ECM	70mg gelatina + 10mg ECM
80mg gelatina + 20mg ECM	60mg gelatina + 20mg ECM

Tabela 1. Tipos de géis testados e as concentrações de material proteico utilizado em cada um deles.

Imediatamente após retirada do banho-maria, com a gelatina ainda líquida, foi adicionado os seguintes reticulantes, a temperatura ambiente com: poli(etileno glicol) diglicidil éter (PEGDG) 500Da, NHS-AA (solução saturada em DMSO) e glutaraldeído. A concentração de reticulante em solução variou de 0 a 1:1 v/v para determinar a influência de sua concentração nas propriedades mecânicas do material. Em seguida, o material foi deixado em repouso a temperatura ambiente para gelificação.

3.2.7.1 Caracterização Reológica do Gel

Para verificação das propriedades viscoelásticas do gel, foi realizado uma varredura de amplitude (0,01Pa < tensão (Tau) < 200Pa) utilizando frequência de 0,5Hz, para determinar o intervalo de linearidade do material, no qual a resposta mecânica é constante, mesmo com variação da tensão aplicada. Em seguida, com o valor de tensão obtido no experimento anterior, foi feita uma varredura de frequência (0,08 Hz < f < 15,92Hz), utilizando o equipamento Haake Mars (Modular Advanced Rheometer System) 3 e geometria PP35 e *measuring gap* de 1mm.

4. Resultados e Discussões

4.1 Digestão das ECMs

Dentro da área de medicina regenerativa, biomateriais na forma de suporte mostraram-se capazes de aumentar a sobrevivência celular quando apresentam características similares à ECM do tecido no qual foi implantado. Entretanto, muitos deles são compostos por matrizes a base de colágeno, gelatina, peptídeos de automontagem ou alginato, que possivelmente não possuem as propriedades bioindutivas ideais para o remodelamento tecidual. Dessa forma, novas abordagens utilizando ECM descelularizada foram utilizadas, uma vez que ela apresenta uma composição tecido-específica de proteínas e GAGs (DeQuach et al. 2012).

Após remoção de ácidos nucléicos e antígenos celulares, os biomateriais derivados de ECM descelularizada são consideradas biocompatíveis (Badylak 2007) e capazes de promover o recrutamento celular para o local da lesão, assim como migração, proliferação e diferenciação celular (DeQuach et al. 2012, Reing et al. 2009). Todavia, para diversos tipos de aplicação, o uso de suportes intactos é clinicamente inviável. Com o objetivo de tornar o material menos invasivo, novas formulações e apresentações menos agressivas foram desenvolvidas, como pó ou gel, obtidos a partir de digestão enzimática (DeQuach et al. 2012, Seif-Naraghi et al. 2010a, Wolf et al. 2012, Young et al. 2011) ou formação física de um material pastoso (Cheng et al. 2009).

O objetivo principal desse projeto é a produção de um hidrogel injetável derivado da digestão enzimática de ECM descelularizada e reticulada para obtenção de melhores propriedades mecânicas, assim como um maior tempo de meia vida do material no organismo do hospedeiro.

Inicialmente foi feita a solubilização das ECMs de duas maneiras diferentes: contínua e em etapas, para comparar o método tradicional utilizado na literatura (contínuo) com uma nova abordagem (em etapas) que busca preservar domínios funcionais de proteínas sinalizadoras (fatores de crescimento), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas, que estão ancoradas ao esqueleto estrutural da ECM. Isto se deve ao fato de que a prolongada exposição a enzimas proteolíticas, alta temperatura, agitação e a água podem levar à perda de atividade biológica do material. Por sua vez, no processo de digestão em etapas, evitam-se estes contratempos uma vez que estes fatores de risco são removidos ao se interromper a reação. Para verificar a eficiência do processo em etapas em relação ao processo contínuo foi feita a caracterização dos digeridos quanto à concentração de peptídeos e GAGs em solução, padrão de fragmentação e presença de estruturas secundárias.

4.1.1 Quantificação de peptídeos e GAGs

Através da quantificação de peptídeos e GAGs em solução é possível identificar o quanto as peptidases, assim como os tipos de digestão utilizados, alteram a ECM inicial. Pode-se observa em qual delas há uma maior preservação de estruturas proteicas e de GAGs, responsáveis pelas respostas biológicas que serão analisadas posteriormente em estudos *in vitro*. Adicionalmente, é possível iniciar a caracterização da ECMp, ECMo e ECMt quanto a potencial bioindutivo correspondente a cada uma delas.

Para a quantificação de peptídeos em solução foi utilizada a técnica de BCA. Essa é uma técnica colorimétrica, que identifica a presença de ligações peptídicas em moléculas contendo pelo menos três resíduos de aminoácidos, através da redução do Cu^{2+} a Cu^{+}, que por sua vez é estabilizado por duas moléculas de ácido bicinconínico, formando um complexo de coloração violeta (λ=562nm), como ilustrado na **Figura 3**.

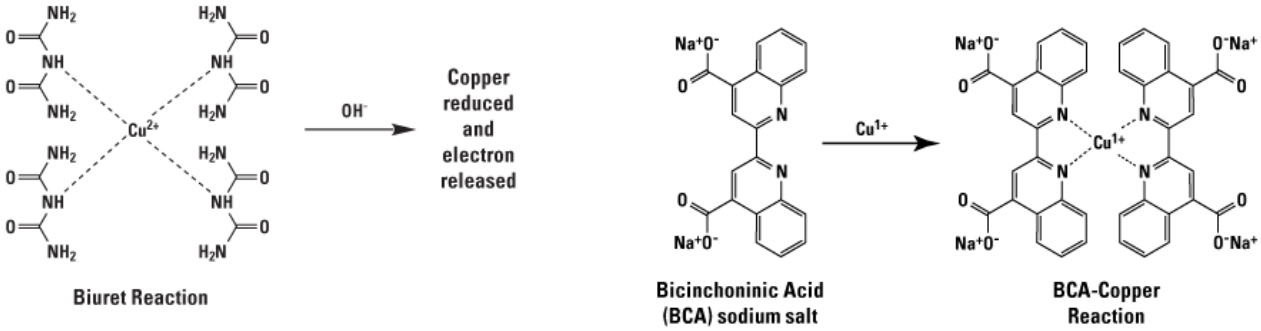


Figure 3. Mecanismo de ação da técnica de BCA.

O mecanismo de ação dessa reação é similar à redução do íon Cu^{2+} pelo Biureto, devido a sua similaridade estrutural com peptídeos (**Figura 4**).

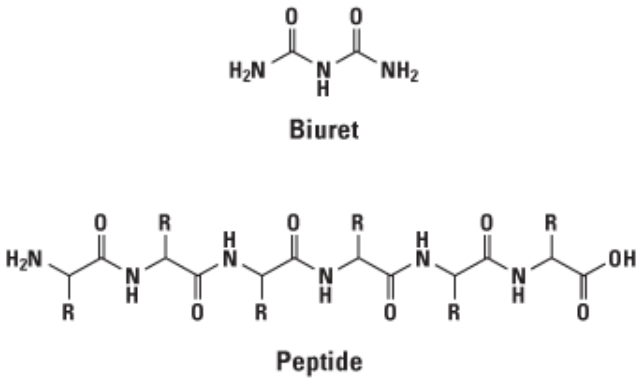


Figure 4. Comparação estrutural entre Biureto e uma cadeia peptídica hipotética.

A **Figura 5** ilustra a concentração final de peptídeos após a digestão de ECMo, ECMp e ECMt com pepsina, tripsina e colagenase, utilizando o tratamento contínuo e em etapas. Foi verificada a diferença entre os tratamentos para cada uma das condições de estudo (enzima x substrato) utilizando o teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos dados, assim poderia ser utilizado o teste-t de Student com ajuste p-valor pelo método de Bonferroni, para verificar se os tratamentos são diferentes entre si. A análise mostrou que apenas a digestão de ECMt por colagenase não apresenta diferença significativa entre os tipos de tratamento, provavelmente devido ao curto período de digestão de 3h.

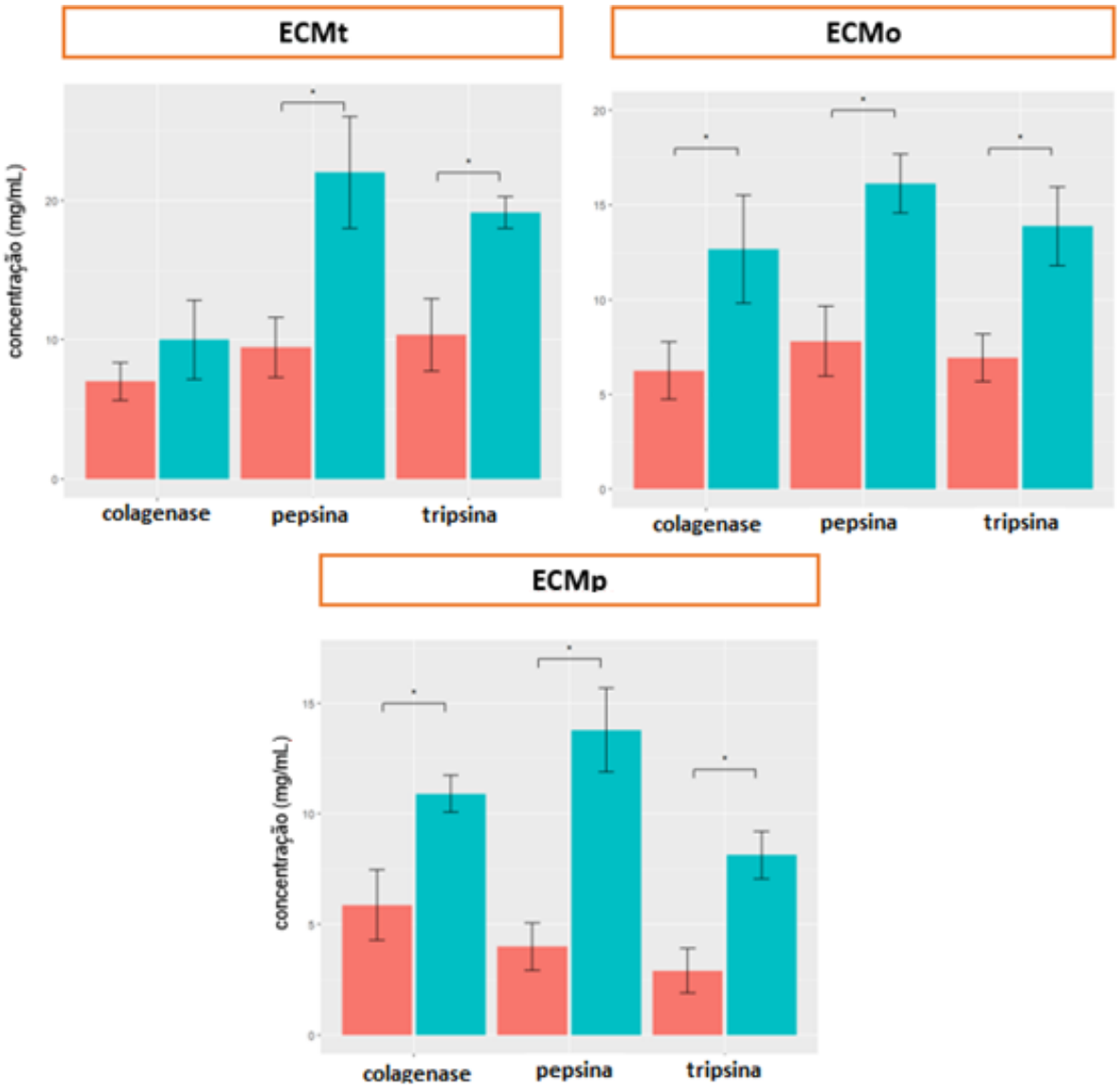


Figure 5. *Barplot* da concentração de peptídeos após a digestão de ECMt, ECMo e ECMp com colagenase, pepsina e tripsina de forma contínua (vermelho) e em etapas (azul). O asterisco (*) indica a diferença estatísticas dos tratamentos (tabela com p-valores presente no **ANEXO I**).

Com exceção da digestão de ECMt por colagenase, em todos ou outros casos observou-se que a digestão em etapas apresenta uma maior concentração de peptídeos em relação a digestão contínua. Uma vez que o racional da técnica é identificar ligações peptídicas, a maior concentração de peptídeos formada após a digestão em etapas pode ser interpretada como a preservação de um maior número de ligações peptídicas em relação a digestão direta, o que indica que menos proteínas foram degradadas nesse processo.

A quantificação das GAGs foi feita através do ensaio de azul de dimetilmetileno (*Dimethylmethylene Blue*, DMMB) e comparadas entre os diferentes substratos, enzimas e o tipo tratamento aplicado na digestão, assim como apresentado na **Figura 6.** A quantificação das GAGs é possível devido ao fenômeno de metacromasia, no qual a coloração azul característica do DMMB é alterada para rosa, quando o ele se liga eletrostaticamente a substratos polianiônicos (Templeton 1988), como as porções O- e N- sulfatada da GAG. Essa alteração é caracterizada pela diminuição da absorção em picos próximos a 590nm (banda β), associada a presença do dímero do corante, e 650nm (banda α), associada com a presença do monômero, assim como aumento em 525nm (banda μ). Quando os níveis de monômero e dímero em solução são alterados devido a interação com moléculas carregadas, a absorção das bancas α e β são reduzidas e a banda μ aparece (Zheng & Levenston 2015).

Sendo assim, não é possível determinar a presença de GAGs que não possuem a porção sulfatada, como é o caso do ácido hialurônico. Entretanto, sua presença no meio não altera a quantificação das demais. Além disso, fragmentos degradados apresentando dissacarídeos não são detectados (Farndale et al. 1982).

GAGs são polímeros de carboidratos de cadeia lineares que estão presentes na superfície celular e na ECM ligadas com proteínas, formando proteoglicanos. Sua capacidade de interagir com um amplo leque de proteínas e sinalizadores celulares (quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento), faz com que as GAGs apresentem papel estratégico em processos como regulação enzimática, adesão celular, crescimento, migração, diferenciação e coagulação (Gandhi & Mancera 2008). Dessa forma, sua presença no produto de digestão foi considerada como um indicador do potencial de atividade biológica do material.

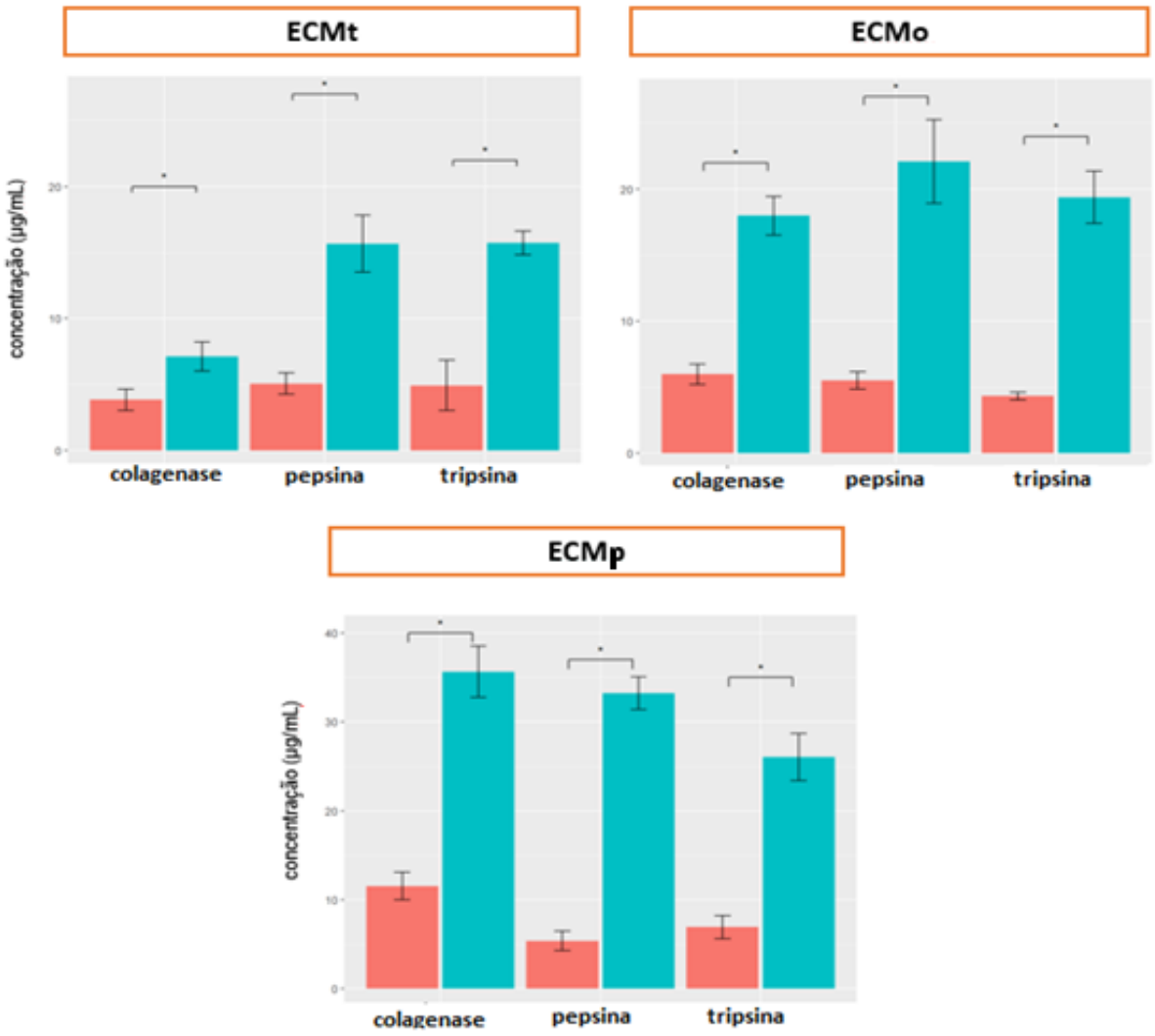


Figure 6. *Barplot* da concentração de GAGs após a digestão de ECMt, ECMo e ECMp com colagenase, pepsina e tripsina de forma contínua (vermelho) e em etapas (azul). O asterisco (*) indica a diferença estatísticas dos tratamentos (tabela com p-valores presente no **ANEXO II**).

A **Figura 6** ilustra a concentração de GAGs em solução referentes às mesmas amostras descritas acima. O mesmo tipo de análise estatística foi realizada para a concentração de GAGs. Assim, verificou-se que o tipo de tratamento empregado possui uma diferença estatisticamente significativa em todos os casos, sendo a digestão em etapas superior a contínua.

Como observado nas **Figuras 5** e **6**, o conteúdo total de ligações peptídicas intactas e GAGs presente após digestão em etapas é estatisticamente maior que no processo contínuo, mesmo sendo ambos derivados de uma mesma massa inicial de substrato. Isso indica uma maior degradação do material de partida, sugerindo uma perda de atividade bioindutiva.

4.1.2 Dicroísmo Circular

Proteínas são formadas através da ligação de aminoácidos por uma reação de desidratação catalisada no ribossomo, formando uma ligação amida entre os resíduos. Dessa forma, ela apresenta uma longa cadeia poliamida (cadeia peptídica) e uma sequência de cadeias laterais, que apresentam diferentes propriedades, e são capazes de realizar ligações não covalentes (ligação de hidrogênio, atrações eletrostáticas e atrações de van der Waals) entre si. Como resultado dessas três interações, as proteínas enovelam-se e formam estruturas tridimensionais variadas. Apesar de cada proteína apresenta uma sequência e um número de aminoácidos diferentes, existem padrões comuns de enovelamento que são geralmente encontrados na maioria delas. São elas: folhas-β e α-hélices, resultantes da formação de ligações de hidrogênio entre os grupos N-H e C=O da cadeia polipeptídica, sem envolver as cadeias laterais (Alberts 2008).

Muitas proteínas ficam expostas ao ambiente extracelular, portanto para minimizar sua desnaturação elas são reticuladas covalentemente. A formação dessa ligação pode ocorrer entre dois aminoácidos de uma mesma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes, através de pontes dissuleto (S-S) entre os resíduos de cisteína. A ponte dissulfeto não altera a conformação final da proteína, ela apenas é um recurso celular (é realizado por enzimas presentes no retículo endoplasmático) para estabilização da estrutura de menor energia (Alberts 2008).

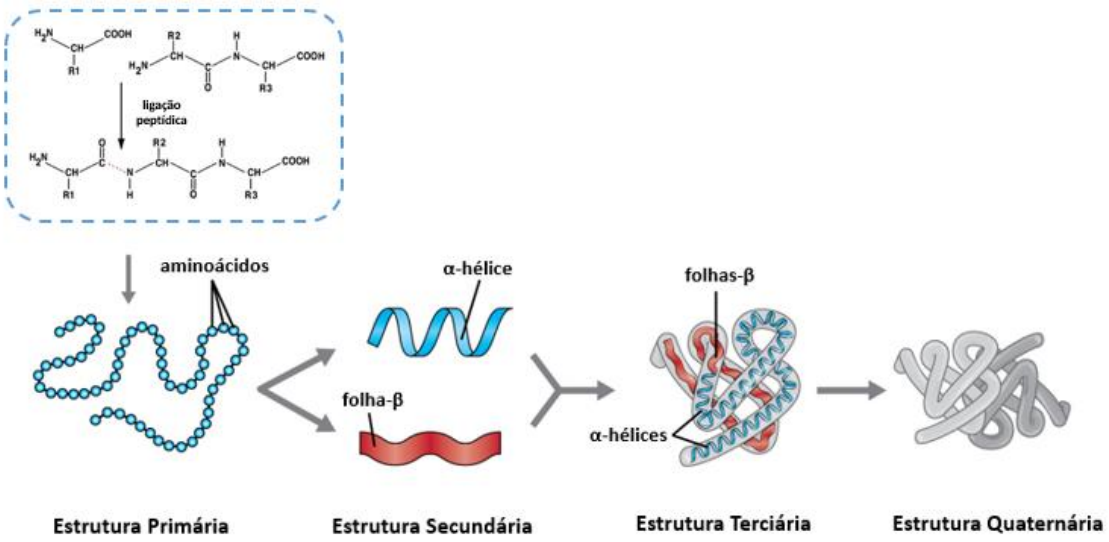


Figure 7. Esquema da reação de desidratação entre aminoácidos e formação da estrutura primária das proteínas. Enovelamento em padrões bem determinados, devido a formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias peptídicas (estrutura secundária), seguido por enovelamento da cadeia (estrutura terciária), obtido pela interação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, algumas proteínas se associam a outras para ter função biológica (estrutura quaternária).

O dicroísmo circular (DC) é definido como a diferença da absorção da luz polarizada circular no sentido horário e anti-horário, e ocorre quando uma molécula possui um ou mais centros assimétricos (grupos de absorção de luz). Essa diferença, resultando na rotação do plano da luz, pode ser medida através de um espectrofotômetro. Existem 20 aminoácidos diferentes compondo uma proteína, sendo que, com exceção da glicina, todos apresentam centros assimétricos. Dessa forma, essa técnica é especialmente utilizada para determinação de estruturas secundárias de proteínas, sua conformação, resposta a alterações ambientais e interações com outras moléculas (Greenfield 2006).

Para proteínas, os cromóforos mais comuns são as ligações peptídicas (λ < 240nm), cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (entre 260 e 320nm) e ligações dissulfeto (banda fraca aproximadamente a 260nm) (Kelly et al. 2005), assim como pode ser observado na **Figura 8**.

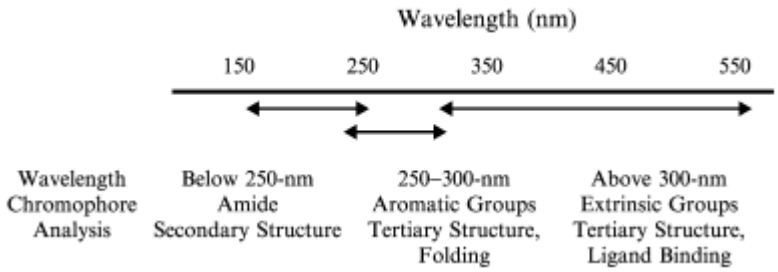


Figure 8. Regiões de absorção do espectro de DC e cromóforos característicos de proteínas.

Essas diferentes conformações espaciais entre os grupos amida determina características únicas, que podem ser detectadas no espectro de DC. Por exemplo, α-hélice apresenta bandas negativas em 222nm e 208nm, assim como uma banda positiva em 193nm. Folha-β apresenta uma banda negativa em 218nm e uma banda positiva em 195nm. Poliprolina tipo II (PPII) apresenta banda positiva aproximadamente em 220nm e outra negativa e 195nm. Em contrapartida, proteínas desnaturadas apresentam uma banda negativa próxima a 195nm (Sreerama & Woody 2004), como é possível observar na **Tabela 2**.

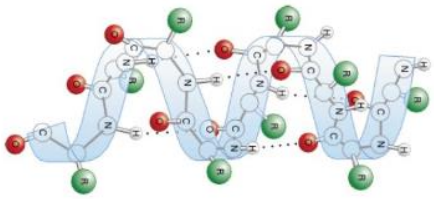
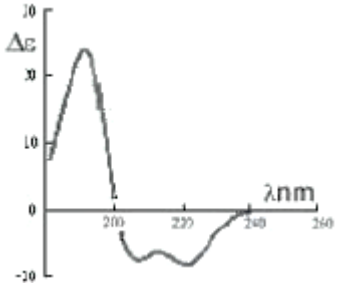
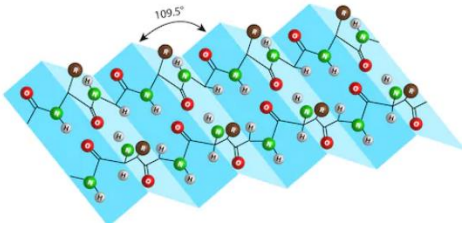
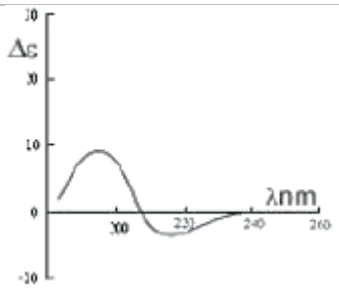
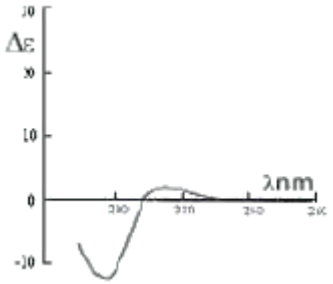
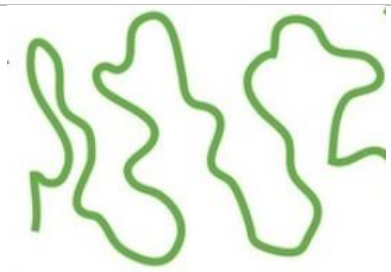
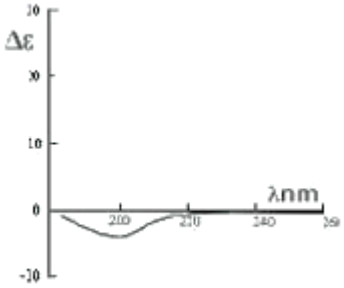
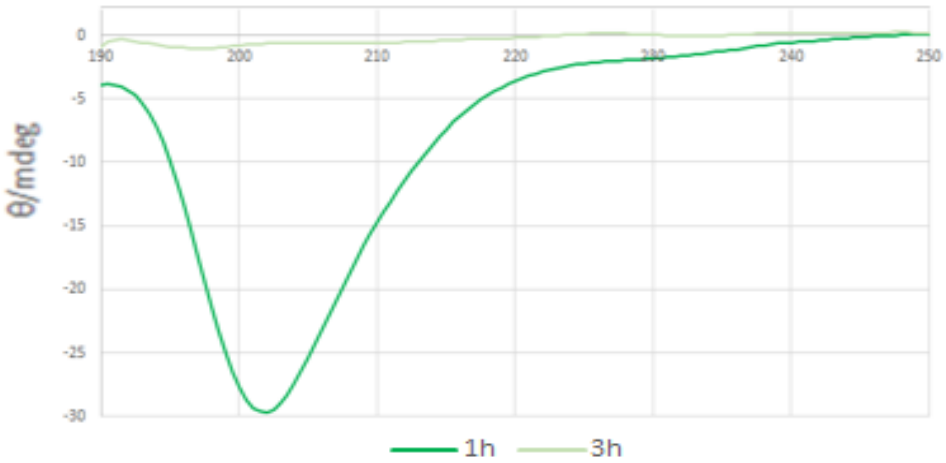
Conformação	Representação gráfica	Espectro de CD
α-hélice		
Folha-β paralelas e antiparalelas		
Poliprolina tipo II (PPII)– tripla hélice		
Estruturas desnaturadas (*randon-coil*)		

Tabela 2. Comparação entra as principais estruturas secundárias identificadas pela técnica de CD.

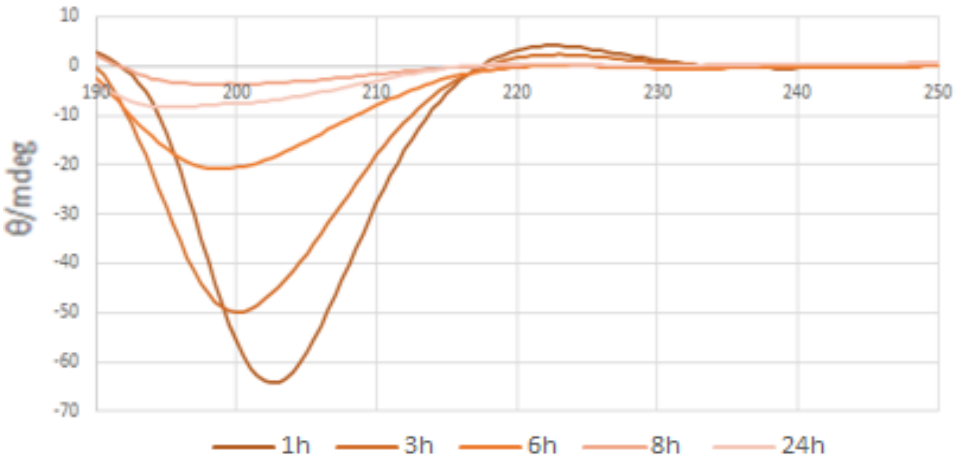
Os produtos de digestão foram analisados quanto à presença de estruturas secundárias após o tratamento contínuo e em etapas, para verificar se há preservação de estruturas secundárias e se elas são diferentes de acordo com o tipo de tratamento e enzima empregado. Dessa forma é possível identificar se as ECMs estão mais ou menos degradadas e se alguma porção ativa está sendo preservada.

Para digestão em etapas ECMt com pepsina e tripsina (**Figura 9.B e 9.C**) há a preservação de PPII na conformação tripla hélice nas primeiras horas de experimento (1h, 3h e 6h), devido à presença da banda positiva aproximadamente em 220nm e outra negativa e 200nm. Essas bandas são aparecem após 8h de digestão ou após digestão com colagenase, estando presentes espectros de *randon-coil* (banda negativa próxima a 195nm), como pode ser observado na **Figura 9.A**. Comparativamente, o espectro da digestão contínua (**Figura 9.D**) apresenta bandas de tripla hélice apenas após digestão com pepsina, caracterizado pela presença do pico laranja próximo a 200nm, indicando que a digestão em etapas conseguiu preservar estruturas para a digestão com tripsina.

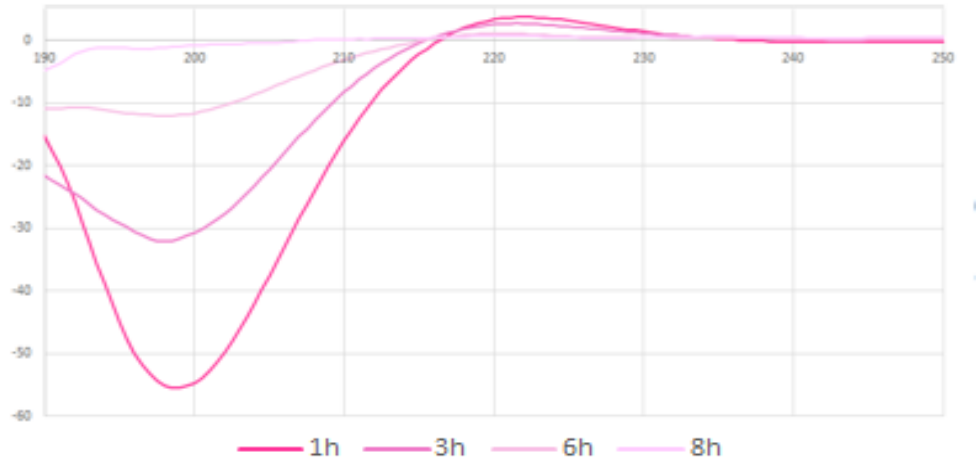
A) Colagenase em etapas



B) Pepsina em etapas



C) Tripsina em etapas



D) Digestão Contínua

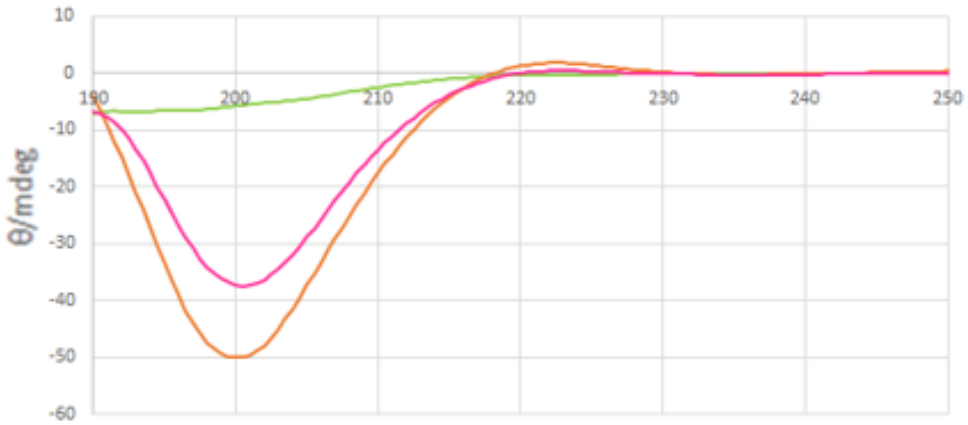
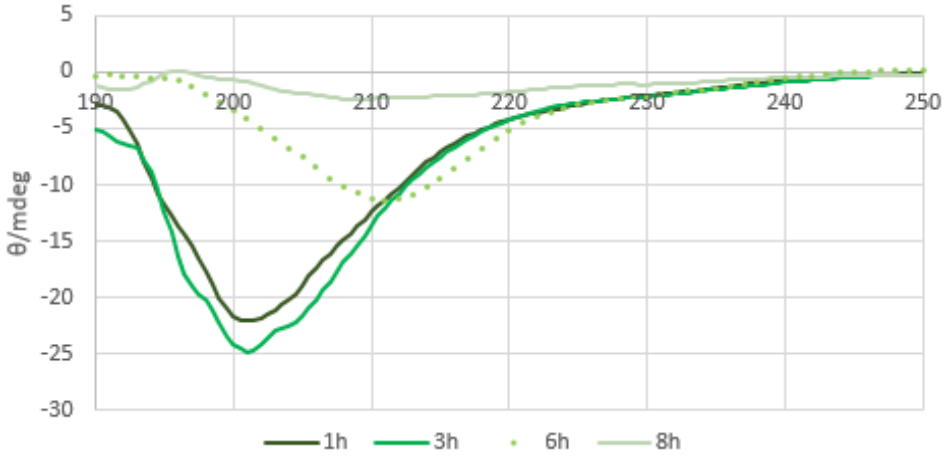


Figure 9. Espectros de DC para digeridos de ECMt após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contínua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).

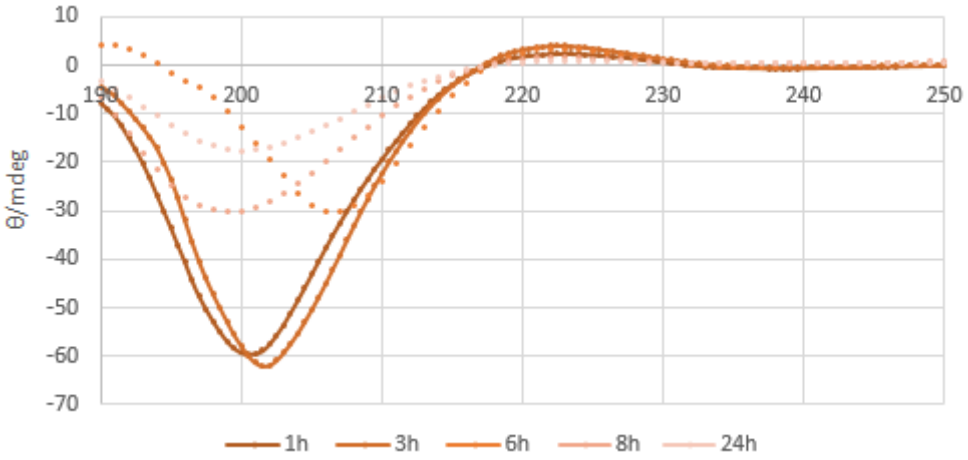
Assim como na digestão em etapas de ECMt, os espectros de ECMo após digestão com pepsina (**Figura 10.B**) mostram a preservação de PPII na conformação de tripla hélice (banda positiva aproximadamente em 220nm e outra negativa em 200nm) nas primeiras horas de experimento (1h, 3h e 6h). Essas bandas não estão presentes após 8h de digestão com pepsina ou após digestão em etapas com colagenase (espectros de *randon-coil,* banda negativa próxima a 195nm) (**Figura 10.A e 10.B**). A digestão com etapas com tripsina (**Figura 10.C**) apresentou na primeira hora de experimento um espectro misto, com bandas de α-hélice, positiva abaixo de 200nm e de tripla hélice, com uma banda negativa próximo de 210nm e outra positiva próxima de 220nm. Comparativamente, o espectro para digestão contínua (**Figura 10.D**) não mostra

nenhuma estrutura secundária íntegra, indicando que a digestão em etapas conseguiu preservar estruturas para a digestão com tripsina e pepsina.

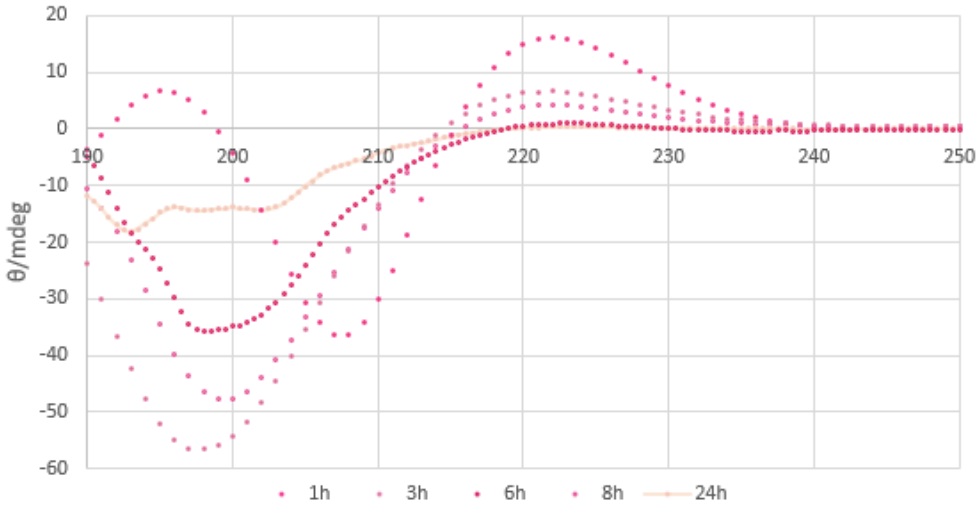
A) Colagenase em etapas



B) Pepsina em etapas



C) Tripsina em etapas



D) Digestão Contínua

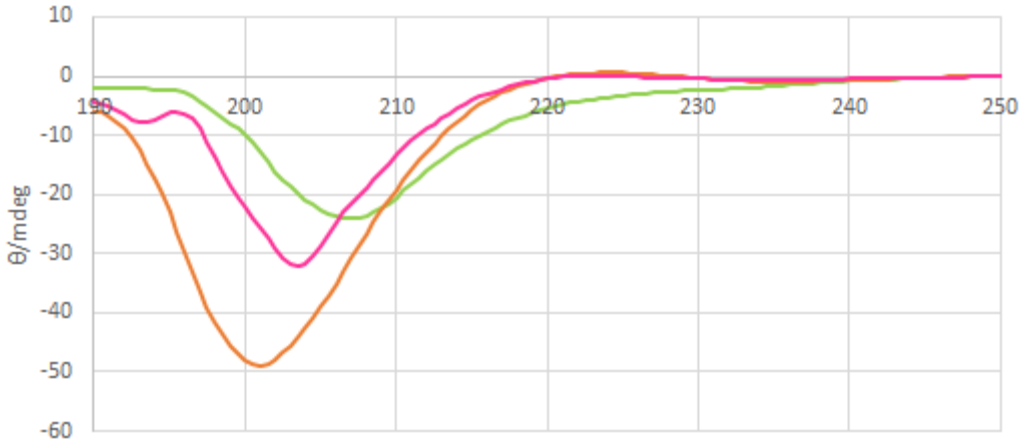
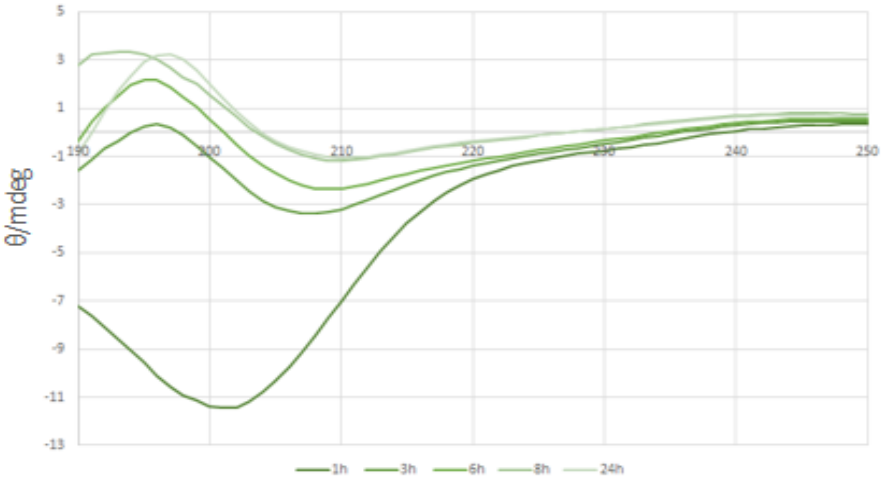


Figure 10. Espectros de DC para digeridos de ECMo após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contínua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).

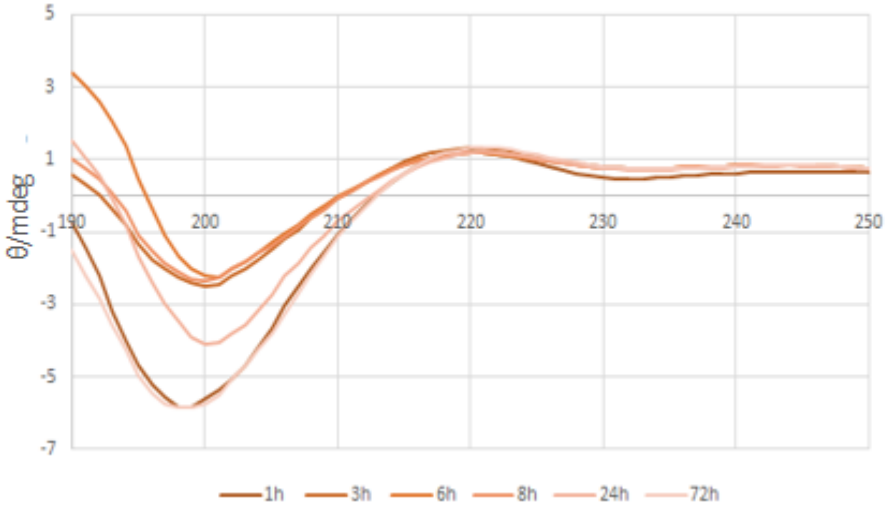
Diferentemente das duas outras amostras, a digestão em etapas da ECMp com colagenase (**Figura 11.A**) preservou estruturas de folhas β nos tempos 3h, 6h, 8h e 24h (uma banda negativa em 218nm e uma banda positiva em 195nm. Para digestão em etapas com tripsina (**Figura 11.C**), em todas os pontos do experimento há apenas banda positiva aproximadamente em 220nm e outra negativa em 200nm, característica de tripla hélice. O espectro de pepsina (**Figura 11.B**), por sua vez, não apresentam picos de uma estrutura única, e sim uma mistura de elementos. Há uma banda positiva próxima de 220nm e uma negativa em 200nm, que são características de tripla hélice; mas também há uma banda positiva abaixo de

200nm, que pode ser de folhas β ou α hélice. Comparativamente com a digestão contínua (**Figura 11.D**), para todas as enzimas digestivas há apenas uma banda positiva em aproximadamente 220nm e outra negativa e 195nm, característico de tripla hélice. Logo, para colagenase e pepsina há estruturas preservadas após a digestão em etapas que não ocorre na digestão contínua.

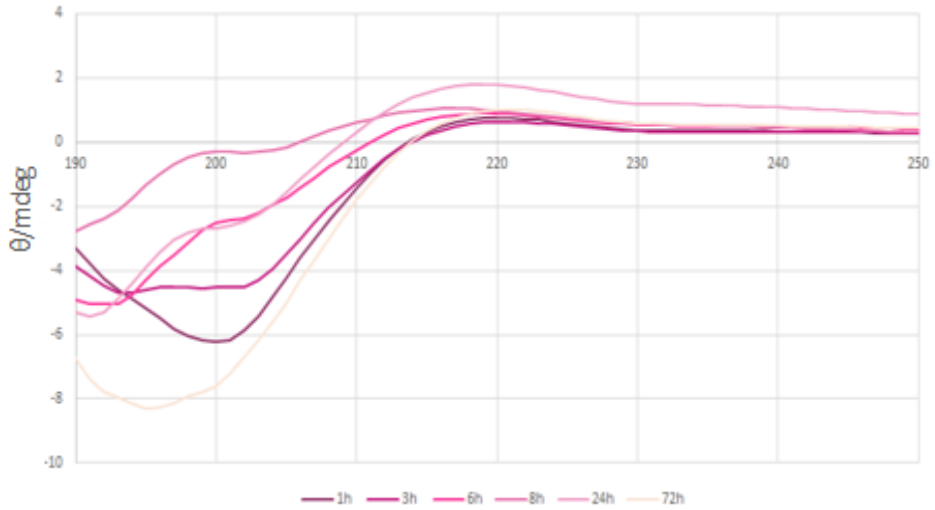
A) Colagenase em etapas



B) Pepsina em etapas



C) Tripsina em etapas



D) Digestão Contínua

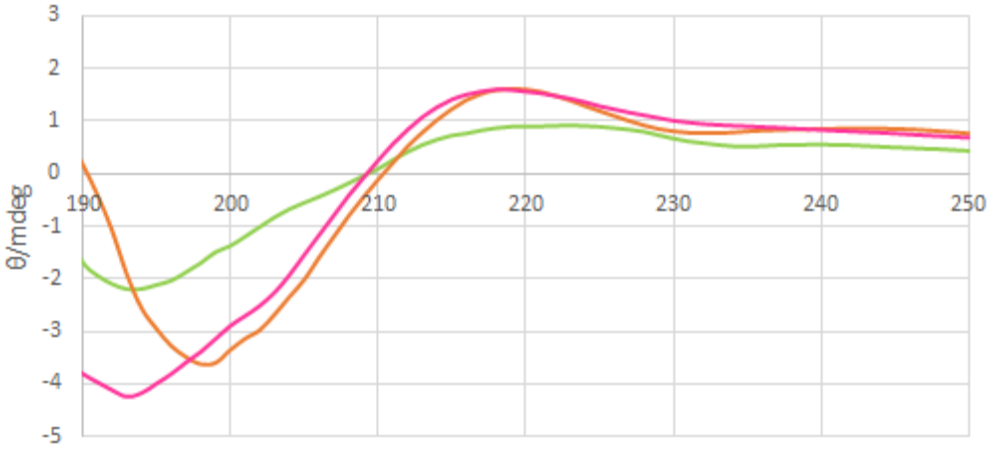


Figure 11. Espectros de DC para digeridos de ECMp após digestão em etapas com (A) colagenase, (B) pepsina e (C) tripsina. Assim como (D) digestão contínua por colagenase (verde), pepsina (laranja) e tripsina (rosa).

Proteínas fibrosas são abundantes no ambiente extracelular, compondo principalmente a ECM, auxiliando na adesão de células e outras proteínas para a formação dos tecidos. Os colágenos são os principais constituintes da ECM e eles são formados por três longas cadeias peptídicas (cadeias α), que se enovelam uma na outra, formando uma tripla hélice no sentido horário, conhecida como PPII. As cadeias α apresentam uma glicina a cada três resíduos (-Gly-X-Y-), favorecendo o melhor empacotamento das cadeias α (menor impedimento estérico oferecido pela glicina). X e Y podem ser quaisquer aminoácidos, entretanto, a posição X costuma ser ocupada por uma prolina, por conta de sua estrutura em anel que estabiliza a hélice, e Y hidroxiprolina (Alberts 2008, Shoulders & Raines 2009).

Devido a inserção de grupos hidroxila em prolinas e lisinas (hidroxiprolinas e hidroxilisinas) das cadeias α, é possível a formação de ligações de hidrogênio entre cadeias, ajudando a estabilizar a estrutura de tripla hélice, também conhecido como tropocolágeno (TC). As moléculas de TC podem ligar-se uma as outras de maneira hierárquica, para formação de fibras macroscópicas resistentes, observadas em osso, tensão e membrana basal (Alberts 2008, Shoulders & Raines 2009).

De acordo com os resultados observados nas **Figuras 9**, **10** e **11**, é possível verificar que em todas as amostras de ECM utilizadas há proteínas da família do colágeno, devido a presença de PPII (*motif* característico dos colágenos) em pelo menos um tipo de digestão analisado (1) ECMt: digestão contínua com pepsina e digestão em etapas com pepsina e tripsina; (2)ECMo: digestão em etapas com pepsina e tripsina; (3) ECMp: digestão contínua com pepsina, tripsina e colagenase, assim como digestão em etapas com pepsina e tripsina.

Sabendo que uma molécula de colágeno é composta por Gly-X-Y (Alberts 2008, Shoulders & Raines 2009), é esperado que a digestão com colagenase tenha sido a que menos apresentou fragmentos que possam ser identificados como provenientes do colágeno (PII). Uma vez que seu mecanismo de catalise cliva a porção N-terminal de qualquer resíduo ligado a glicina.

4.1.3 Padrão de fragmentação

O padrão de fragmentação das ECMs após digestão foi analisado através de géis de eletroforese em SDS-PAGE corado com prata, com o objetivo de verificar a distribuição de massas dos fragmentos. Assim seria possível determinar qual enzima é mais ou menos eficiente na degradação das ECMs, tal como qual delas é mais específica em suas clivagens. Fora a possível identificação de bandas exclusivas de uma ECM.

Tanto para digestão contínua quanto para digestão em etapas, o perfil do gel foi o mesmo, por esse motivo, apenas o gel da digestão em etapas (**Figura 12**) foi apresentado abaixo**.**

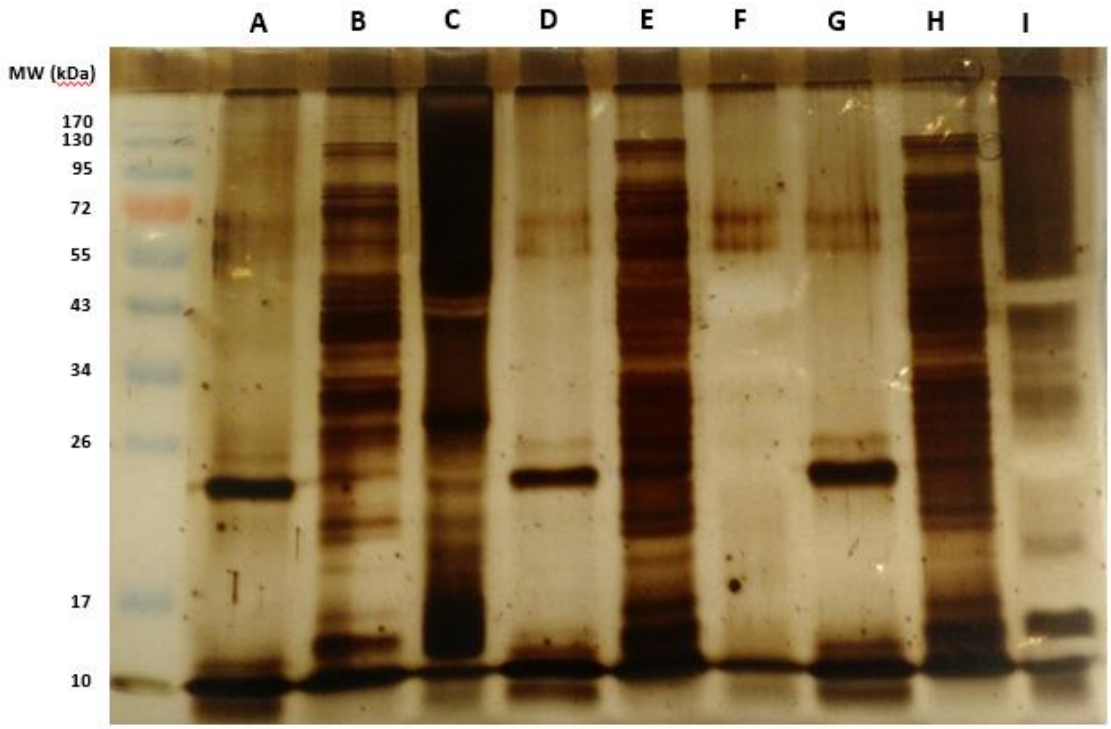


Figure 12. Gel de SDS-PAGE do produto de digestão em etapas de (A) ECMt com tripsina, (B) ECMt com colagenase, (C) ECMt com pepsina, (D) ECMp com tripsina, (E) ECMp com colagenase, (F) ECMp com pepsina, (G) ECMo com tripsina, (H) ECMo com colagenase e (I) ECMo pepsina.

É possível verificar pelo gel que os produtos de digestão da colagenase (**12.B, 12.E e 12.H**), independente do substrato utilizado, apresentam maior quantidade de bandas definidas distribuídas entre 130kDa a 10kDa, indicando uma maior degradação controlada das amostras e sugerindo que o maior componente das três ECMs é o colágeno. O gel apresenta bandas algumas bandas entre 68 e 130kDa (Eckhard et al. 2009, Matsushita et al. 1999), que podem ser referentes à colagenase em solução, entretanto não é possível determinar se há ou não sobreposição com as bandas dos peptídeos.

Para tripsina (**12.A, 12.D e 12.G**), há poucas bandas evidentes, indicando uma maior seletividade na clivagem. A banda mais evidente, próxima de 23kDa pode ser referente a tripsina em solução. Entretanto, não é possível ter certeza pois a tripsina sofre autólise, por conta do seu mecanismo de catálise. A tripsina catalisa a hidrolise de ligações amida, na qual a parte carbonílica é proveniente de lisinas ou argininas. Entretanto, como na própria tripsina há 14 lisinas e 2 argininas, ela se trona substrato de reação e é, consequentemente, degradada (Vestling et al. 1990).

A pepsina foi a única enzima que apresentou padrões de fragmentação diferentes para cada um dos substratos. Para ECMt (**12.C**) quase não há bandas bem definidas, existindo apenas um rastro contínuo, indicando a presença de fragmentos de diversas massas moleculares. Para ECMp (**12.F**) ouve a formação de apenas duas bandas evidentes (próximo de 70kDa e 55kDa), assim como um rastro acima de 55kDa e abaixo de 17kDa. Para ECMo (**12.I**) há rastros acima de 45kDa, entre 43kDa e 26kDa e uma banda grossa próxima de 10kDa e outra próxima de 20kDa. A pepsina possui massa molecular de 35kDa, entretanto essa não é uma banda que pode ser observada no gel.

Além disso, observa-se que há a presença de bandas no gel de empacotamento, assim como em sua interface com o gel de resolução, indicando que fragmentos de proteína acima de 170kDa foram formados em todos os experimentos. Além disso, em todas as amostras há uma forte banda em 10kDa, assim como rastros abaixo dessa massa, indicando que houve a formação de peptídeos pequenos, incapazes de ser quantificados pela técnica.

Entretanto, essa metodologia apresenta baixa sensibilidade e para melhor compreender o conteúdo digerido quanto ao tamanho de peptídeos. Dessa forma, as amostras foram analisadas por *Gel Permeation Chromatografy* (GPC). Foi possível verificar a massa molecular média das bandas de maior intensidade, como apresentado na **Tabela 3**.

Substrato	**Digestão enzimática**					
	Colagenase		**Pepsina**		**Tripsina**	
	Direta (Da)	**Etapas (Da)**	**Direta (Da)**	**Etapas (Da)**	**Direta (Da)**	**Etapas (Da)**
ECMt	94.700 21.700	15.200 14.400	14.600	19.500	16.300 14.300	27.000
ECMo	15.900 14.200	119.700	16.000 14.500	16.100 14.500	14.500	14.600
ECMp	121.900 16.800 14.300	24.300 14.600	14.300	18.000 14.400	14.700	19.300 14.300

Tabela 3. Análise de GPC das amostras de ECM digeridas, mostrando o Mw aproximado dos picos de maior intensidade.

Diferentemente do esperado e dos resultados obtidos pela técnica de eletroforese, a análise de GPC mostrou um espectro com poucos picos, sugerindo que poucos fragmentos estavam em concentração suficiente para poderem ser detectados pelo equipamento. De acordo com a **Tabela 3**, o tipo de digestão empregado afeta os tipos de fragmentos obtidos,

entretanto o tratamento em etapas não necessariamente gerou peptídeos maiores. Em geral, o Mw obtido ficou entre 20kDa e 14kDa para a maioria das amostras, com alguns poucos picos de alto Mw entre 95kDa e 122kDa.

4.2 Análise proteômica das ECMs

A ECM é composta por uma rede complexa de proteínas fibrosas, proteínas sinalizadoras, glicoproteínas e proteoglicanos, que juntos concedem a esse material propriedades mecânicas e bioindutivas (Hynes 2009). Ou seja, ela atua como suporte, facilitadora da difusão de nutrientes e metabólitos, e reservatório de moléculas capazes de desencadear cascatas de sinalização para ativação ou inibição de tradução proteica (Bonnans et al. 2014, Hoshiba et al. 2016, Samiric et al. 2009). Ela é produzida, secretada e degradada localmente pelas células que estão em equilíbrio dinâmico com seu microambiente (Badylak 2007), sendo assim, remodelada constantemente de acordo com as necessidades celulares (Xing et al. 2015).

Uma vez que os componentes da ECM variam de tecido para tecido, assim como a quantidade de cada um deles (Bonnans et al. 2014, Hoshiba et al. 2016, Samiric et al. 2009), através da identificação de suas proteínas é possível sugerir como as células ali aderidas interagem entre si e com o seu microambiente, assim como os seus requerimentos básicos para sobrevivência. Com esse objetivo, foi realizada o estudo do perfil proteômico das ECMs. Os dados brutos gerados pelo espectrômetro q-TOf Maxis 3G foram tratados com o software MaxQuant para identificação das proteínas e seu resultado foi pré-processado com o software Perseus, a fim de eliminar falsos-positivos e proteínas contaminantes.

Devido ao fino controle metabólico que a ECM oferece, para as proteínas tornarem-se componentes funcionais da ECM, muitas delas precisam passar por controles transcricionais (replicação de exons, *splicing* alternativo), traducionais e pós-traducionais. Por exemplo, o colágeno, maior constituinte da ECM, possui inúmeras MPT, como hidroxilação de resíduos de prolina e lisina, clivagem de pró-peptídeos e reticulação através de lisil oxidases (Alberts 2008, Byron et al. 2013, Myllyharju & Kivirikko 2004). Desta forma, para tornar a análise mais robusta, foi incluindo as MPT mais recorrentes nos componentes da ECM até então presentes na literatura. Assim como: pontes dissufeto (Cys-Cys), deaminação (N), hidroxiprolina, oxidação (M), fosfoilação (P) e sulfação (S) (Byron et al. 2013).

Após o pré-tratamento no software Perseus, foram identificadas 173 proteínas, sendo estas distribuídas entre ECMt, ECMo e ECMp de acordo com o Diagrama de Venn na **Figura 13.** Como esperado, a análise *shotgun* revelou que as três ECMs apresentam proteômas diversos, uma vez que elas são originais de tecidos diferentes. Duas delas foram identificadas em comuns

nas três ECMs, referentes a proteínas estruturais (colágeno alfa-1(I), colágeno alfa-2(I)). O proteôma da ECMp mostrou um perfil proteico mais complexo (94 proteínas identificadas) que de ECMt (48 proteínas identificadas) e ECMo (35 proteínas identificadas). Indicativo que o papel funcional das proteínas é especializado para cada tipo de tecido (Alberts 2008, Bonnans et al. 2014, Hoshiba et al. 2016, Samiric et al. 2009).

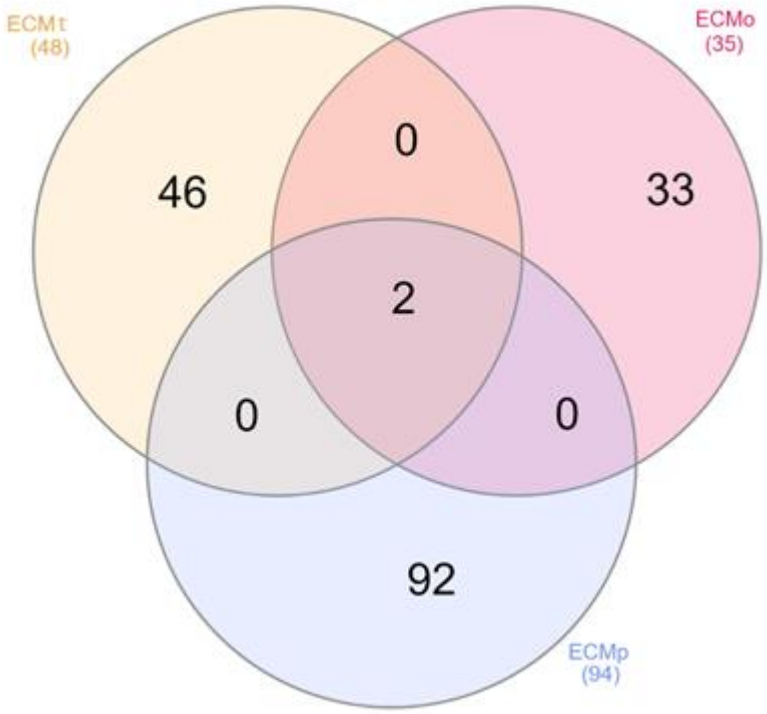


Figure 13. Diagrama de Venn das proteínas identificadas em ECMt, ECMo e pericárdio ECMp por análise de Espectrometria de Massas, baseada na abordagem proteômica *shutgun*.

A lista de todas as proteínas identificadas (sem pré-tratamento), assim como o resultado da análise baseada nas MPT constam nos anexos (**Anexo III, Anexo IV**). Foram identificados 183 peptídeos no proteoma total, e 123 peptídeos na análise com MPT.

4.2.1 Anotação funcional e enriquecimento da análise do proteoma total

Para predição de processos biológicos, redes gênicas e rotas metabólicas, é necessário inicialmente identificar produtos gênicos (RNAs ou proteínas) através de análises ômicas, identificar a função de cada um deles utilizando anotação funcional e por fim, determinar genes que pertencem aos mesmos grupos ontológicos conhecidos para identificação de regiões funcionais ou grupos de relevância biológica, pela análise de enriquecimento.

O resultado da anotação funcional das duas listas de proteínas identificadas, proteoma total e da análise com MPTs está presente em Anexo III e Anexo IV, respectivamente.

A anotação funcional foi realizada utilizando o banco de dados presente no *Gene Ontology Consortium* (http://www.geneontology.org), que é composto por dois componentes principais: a) o *Gene Ontology* (GO), que disponibiliza uma estrutura de funções biológicas e a relação entre eles, na forma de "termos" que podem ser utilizados por todos os organismos. O GO apresenta três estruturas hierárquicas, que compreendem: função molecular, componente celular e processo biológico; b) GO *annotation*, que relaciona o produto de um gene com uma categoria ontológica pré-determinada pelo GO. Além disso, é possível realizar a análise enriquecida dos dados (*GO enrichment analysis tool*), ou seja, identificar termos do GO que estão estatisticamente mais ou menos representados nos grupos de dados anotados previamente, para auxiliar na integração e visualização dos dados (Ashburner et al. 2000).

Outra alternativa para análise de enriquecimento é a utilização do *Biological Networks Gene Ontology tool* (BiNGO) (Maere et al. 2005), um aplicativo semelhante ao *GO enrichment analysis tool,* que está presente no Cytoscape (plataforma *open-source* para visualização de redes de interações moleculares e integração com dados funcionais derivados de analises ômicas (Shannon et al., 2003)).

A análise de enriquecimento de dados de **Anexo III** e **Anexo IV** foi realizada utilizando o BiNGO, e estão apresentadas em **Anexo V** e **Anexo VI**. A mesma análise foi realizada para a lista de proteínas identificadas em cada uma das amostras de ECMs (**Anexo VII, VIII** e **IX**), a fim de determinar suas especificidades. Dados experimentais e teóricos para proteínas específicas foram analisados utilizando a Plataforma Integrity (Thomson Reuters).

Como apresentado na **Figura 13** e nos **Anexo III** e **Anexo IV**, o perfil proteomico de cada uma das ECMs é único e bastante diverso. Entretanto, a análise de enriquecimento dos termos do GO apresentados em **Anexo VII, VIII** e **IX**, mostra que os termos de maior significância nas três amostras são "morfogênese da pele" (GO_ID: 43589) e "desenvolvimento de epiderme" (GO_ID: 8544), que estão associados a presença de colágeno alfa-1(I) e colágeno alfa-2(I) nas três ECMs analisadas (únicas proteínas em comum).

Colágeno tipo I é o componente mais abundante nos tecidos conectivos, e está organizado em estrutura fibrilar. Ele é um heterodímero composto por três cadeias polipeptídicas, duas unidades de colágeno alfa-1(I) e uma unidade de colágeno alfa-2(I), codificados pelos genes COL1A1 e COL1A2, respectivamente (Bodian et al., 2008). A configuração em tripla-hélice é estabilizada através de ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas presentes nos resíduos de hidroxiprolina (Berg and Prockop, 1973; Weis et al., 2010). Além de estabilizar a estrutura terciária da proteína, a presença de MPT é necessária para promover a ligação de integrinas, uma vez que MPT estão nos *collagen receptor integrin binding motif* (Sipilä et al., 2018).

Durante a formação das fibrilas de colágeno, os resíduos de lisina são deaminados pela enzima lisil oxidase (LOX) para formar resíduos contendo grupos aldeídos (*α-aminoadipic acid-δ-semialdehyde*), ao mesmo tempo que resíduos de tirosina são oxidados. Esses grupos de alta reatividade iniciam a reticulação intra- e intermolecular para aumentar a resistência biomecânica da fibrila (Yamauchi and Shiiba, 2008; Yamauchi and Sricholpech, 2012). Além da regulação molecular, a resistência do *scaffold* regula a proliferação celular, viabilidade, motilidade, diferenciação, assim como o grau de adesão das células na matriz (Wells, 2008). Apesar da regulação desses mecanismos ser ainda desconhecida, estudos realizados por Vora e colaboradores relacionaram deaminação N-terminal com supressão de tumores e inibição de proliferação celular (Vora et al., 2010).

Por ser a proteína de maior abundância nos vertebrados e por apresentar um papel crucial na alteração da força tênsil em ossos, pele, tendão e vasos sanguíneos, era esperado que a análise proteômica das três ECMs apresentassem colágeno alfa-1(I) e colágeno alfa-2(I) contendo MPT (**Figura 14**). A presença de sítios de deaminação e oxidação e ambas as moléculas, indicam que as cadeias peptídicas estavam reticuladas, aumentando a força tensil das fibrilas (Acevedo-Jake et al., 2017; Yamauchi and Shiiba, 2008; Yamauchi and Sricholpech, 2012). Enquanto hidroxiprolina foi identificado apenas em colágeno alfa-1(I) e fosforilação foi detectado apenas em colágeno alfa-2(I).

A fosforilação do colágeno pode ocorrer antes dele ser secretado para o meio extracelular, alterando seu enovelamento, transporte e interação com outras proteínas presentes na ECM. Ou após secreção, por meio de proteínas quinases do meio (PKA, PKC, CKII) ou secretadas pela via ER-golgi (VLK e FAM20C). Sendo assim, a fosforilação atua como um mecanismo reversível para remodelamento da ECM, através da alteração da estabilidade da estrutura de tripla-hélice (grau de fosforilação é diretamente proporcional à estabilidade) e alterando propriedades de ligação do colágeno com outras moléculas e regulando seu processamento, degradação e transdução de sinal (Acevedo-Jake et al. 2017, Yalak & Olsen 2015). Por exemplo, fosforilação próxima a sítios RGD (Arg-Gly-Asp, reconhecido por integrinas) interferem na adesão celular (Yalak and Olsen, 2015).

Além disso, na ECMt foram encontradas versões não modificadas de colágeno alfa-1(I) e colágeno alfa-2(I).

Como apresentado na **Figura 14** e no **Anexo IV**, ECMo apresenta apenas uma proteína contendo MPT, colágeno alfa-1(XI). Essa cadeia faz parte da composição do colágeno tipo XI, composto por três cadeias peptídicas (alfa-1(XI), alfa-1(XI) e alfa-1(II) que são processadas para formação da molécula de colágeno madura, arranjada na forma de longas fibrilas. Ele está

presente principalmente em cartilagens e auxilia a manter o espaçamento e diâmetro de outras fibrilas de colágeno, como o tipo II.

Para ECMt, foram identificadas duas cadeias de colágeno, colágeno alfa-1(II) e colágeno alfa-2(V), ambas possuindo hidroxiprolina. Colágeno alfa-1(II) confere estrutura ao tecido conectivo e resistência à compressão, enquanto colágeno alfa-2(V) auxilia e regula a formação fibrilas de colágeno tipo I, além de apresentar sítios de reconhecimento para heparina.

Para ECMp, foram encontradas proteínas, as estruturais, como colágeno alfa-3(VI), colágeno alfa-1(III), prolargina, lumicam.

O colágeno alfa-3(VI) que apresenta diversos sítios de gligosilação na porção N-termina. O colágeno do tipo VI está envolvido na fibrilogênese ramificada da ECM, que está em contato direto com fibras musculares, além de mediar o ancoramento da membrana basal ao tecido conectivo, através da interação com colágeno do tipo I, II, XIV, perlecam, elastina, fibronectina, decorina e biglicam (Lampe and Bushby, 2005). O colágeno alfa-1(III), com sítios de hidroxiprolina, contribui para a formação do trímero de colágeno tipo III. Ele apresenta uma estrutura fibrilar de baixa resistência e está presente em fases iniciais de cicatrização, sendo logo substituídas por fibrilas de colágeno tipo I. Quando associadas ao colágeno tipo I, apresentam uma proporção de 4:1 (Brown et al., 2017; Stadelmann et al., 1998; Stumpf et al., 2001).

Lumican é um SLRP. Ela apresenta formato de ferradura, o que favorece sua ligação entre as fibrilas de colágeno no mesmo sítio que a fibromodulina, mantendo-as aparte. Está envolvida em fibrilogênese, migração celular e reparo tecidual (Scott, 1996; Svensson et al., 2000). Prolargina, ou *proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein*, liga-se ao perlecan, colágeno tipo I e II, estando assim associada a formação de fibrilas (Bengtsson et al., 2002).

Entretanto, foram encontradas proteínas que apresentam funções de remodelamento tecidual, como a fibromodulina e o mimecam.

A fibrimodulina possui sítios de oxidação. Essa proteína apresenta um *core* proteico ligado covalentemente com GAGs (42 – 80kDa) e é representante da classe II de *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs). Está associada a fibrilogenese do colágeno, reprogramação celular e regulação de miostatina durante a diferenciação de células musculares satélites (CMS) em mioblastos, através da via TGF-β. Também atua no recrutamento de CMS em regiões danificadas, além de estimular crescimento e migração de células endoteliais, assim como a formação de rede capilares durante a angiogênese, através do aumento da expressão de colágeno I e III, VEGF e angiopoietina-2 (Ang-2) (Jan et al., 2016; Lee et al., 2018).

Mimecan (osteoglicina) é um SLRP que induz formação óssea em conjunto com TGF-β1 e 2. Além disso está envolvida no crescimento celular, angiogênese, cicatrização de células musculares lisas vasculares e fibrilogênese (Cao et al., 2015; Tasheva et al., 2004).

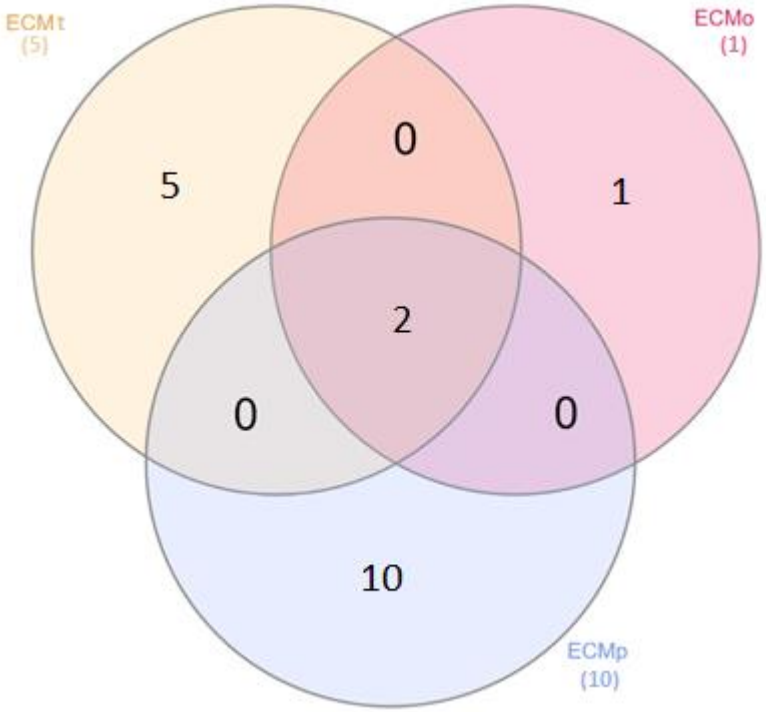


Figure 14. Diagrama de Venn das proteínas contendo MPT identificadas em ECMt, ECMo e ECMp por análise de Espectrometria de Massas, baseada na abordagem proteômica *shutgun*.

Apesar de existir termos GO enriquecidos semelhantes entre as ECMs, devido as singularidades existem entre os tecidos, existem inúmeras proteínas que demonstram que as ECMs possuem papeis funcionais diferentes na biogênese do tecido e na sua manutenção. A ECMt e ECMt apresentam uma composição proteômica mais focada na capacidade estrutural e arquitetônica do tecido, apresentando propriedades de resistência tensil e a compressão. Em contrapartida, a ECMp apresenta um perfil funcional mais abrangente, possuindo proteínas estruturais, assim como proteínas de diferenciação celular, regeneração e reparação tecidual. Sugerindo então que, para um papel de indução regeneração, a ECMp é a amostra mais promissora.

4.3 Análise da Atividade Biológica

Estudos realizados anteriormente pelo grupo utilizando digeridos de ECMt, ECMo e ECMp com tripsina, pepsina e colagenase sugerem que a ECMp é a matriz que apresenta maior potencial osteoindutor. Juntamente com a determinação do perfil proteômico de cada uma das ECMs utilizadas, e a verificação de uma maior diversidade de proteínas sinalizadoras presentes

na ECMp, os testes *in vitro* foram realizados exclusivamente com os digeridos derivados de pericárdio.

Para realização dos experimentos *in vitro* utilizou-se células tronco mesenquimais (MSCs), devido sua diferenciação para linhagens osteogênicas, habilidade de secretar fatores trópicos que auxiliam no reparo de fraturas e sua capacidade de auto – renovação. Essas características foram inicialmente identificadas em células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC) (Fanganiello et al., 2015).

Apesar de diversos relatos a respeito do potencial regenerativo de MSCs, seu mecanismo ainda não é totalmente compreendido e validado, uma vez que já foi observado uma heterogeneidade de células derivadas de um mesmo tecido e de tecidos diferentes, levando a variação no potencial regenerativo do material (Anderson et al., 2013). Dessa forma, para entender como os digeridos de ECM influenciam o metabolismo celular, foram escolhidas duas linhagens de MSCs de tecidos diferentes: células-tronco mesenquimais de dentes decíduos humanos (SHED) e células mesenquimais derivadas de medula óssea (BMMSC – MO-58).

BMMSCs apresentam plasticidade durante a diferenciação (osteoblastos, condrócitos, adipócitos e neurônios), expressam um perfil único de proteínas de superfície (TRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, Octamer-4), produz uma série de citocinas e possui propriedades imunomodulatórias (Akiyama et al., 2012). Entretanto, sua obtenção é dificultada devido ao processo laborioso e dolorido de extração (Fanganiello et al. 2015). Assim como as BMMSCs, as SHEDs possuem a capacidade de diferenciarem-se em diversas linhagens celulares (células osteogênicas, odontogênicas, adipócitos e neurônios) e apresentam efeitos imunomoduladores. Adicionalmente, inibem a ação de osteoclastos, apresentam similaridade com células osteoprogenitonas, e não possuem um processo de isolamento invasivo. Essa linhagem já foi utilizada para reconstruir defeitos cranianos, na calvária e no osso trabecular em camundongos (Fanganiello et al., 2015; Seo et al., 2008; Yamaza et al., 2010).

4.3.1 Diferenciação Osteoblástica in vitro

O processo de osteoindução é caracterizado por três eventos principais: recrutamento de MSC, diferenciação em osteoblastos e formação do tecido ósseo. Durante a etapa de recrutamento, fatores de crescimento como BMPs (proteínas morfogênicas ósseas) e PDGFs (fatores de crescimento derivados de plaquetas) estimulam a migração de MSC para a região da fratura, através de um mecanismo ainda pouco conhecido (Ai-Aql et al., 2008; Miron and Zhang, 2012).

MSCs são multipotentes e, dependendo de sua origem, podem se diferenciar em diferentes tipos celulares como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, mioblastos, fibroblastos, cardiomiócitos, miofibroblastos, células epiteliais e neurônios. O comprometimento de uma MSC com uma linhagem celular é mutualmente exclusiva e ocorre através da ativação e inibição de inúmeros fatores transcricionais (Kawai 2013, Miron & Zhang 2012).

A etapas de diferenciação ou comprometimento celular requer a expressão de dois fatores de transcrição principais: Runx2 (*Runt-related transcription fator 2*) (Banerjee et al., 1997) e Osterix (Nakashima et al., 2002).

Runx2 é ativado pela via da ERK (*extracelular signal-regulated kinase*), que por sua vez é ativada e regulada por PDGFs. Além disso, ERK é capaz de inibir PPAR-γ (receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ) durante diferenciação em osteoblastos, evitando o comprometimento com a linhagem de adipócitos e impedindo o remodelamento causando perda de massa óssea (Kawai, 2013; Kim et al., 2001). Osterix é uma proteína *zinc-finger-like* que é induzida por BMPs e atua *downstream* em relação a Runx2, que por sua vez regula a diferenciação de MSCs em pré-osteoblastos e é necessária para a expressão de sialoproteínas e osteocalcina (Miron & Zhang 2012) (**Figura 15**).

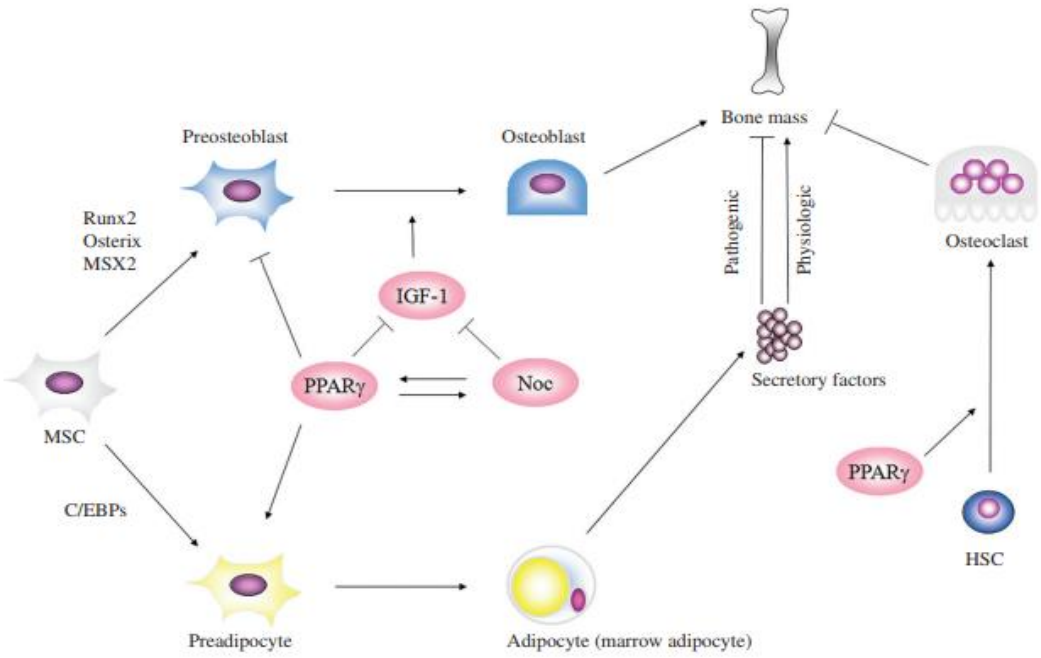


Figure 15. Esquema da diferenciação de MSC nas linhagens osteoblásticas e adiposas, assim como o papel dos fatores de crescimento na regulação de cada processo. Runx2, Osterix e MSX2 levam a diferenciação para preosteoblastos, enquanto PPAR-γ leva a diferenciação em adipócitos e supressão da osteogênese. Além disso a PPAR-γ altera perfil de expressão de fatores secretados em adipócitos de medula, levando a perda de massas óssea (Msx2 - *muscle segment*

homeobox homolog of 2; C/EBPs - *CCAAT-enhancer-binding proteins*; IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; Noc - gene noctorium; HSC – células tronco hematopoiéticas) (Kawai 2013).

Esse estágio inicial de diferenciação geralmente ocorre entre o dia 5 ao dia 15 após o início do estímulo e é caracterizado pela expressão de enzima fosfatase alcalina (ALP), que participa da mineralização das células. Nos estágios finais, entre dia 15 e 28, ocorre a formação de osteoblastos maduros, resultando no aumento da expressão de osteopontina, sialoproteínas e osteocalcina, assim como a diminuição na expressão de ALP. Osteoblastos maduros possuem a habilidade de sintetizar osteóide (porção orgânica da matriz óssea), que são mineralizados pela deposição de cristais de hidroxiapatita. Quando o osteoblasto fica imerso em sua própria matriz, ele finalmente diferencia-se em osteócito (Birmingham et al., 2012; Kulterer et al., 2007; Miron and Zhang, 2012).

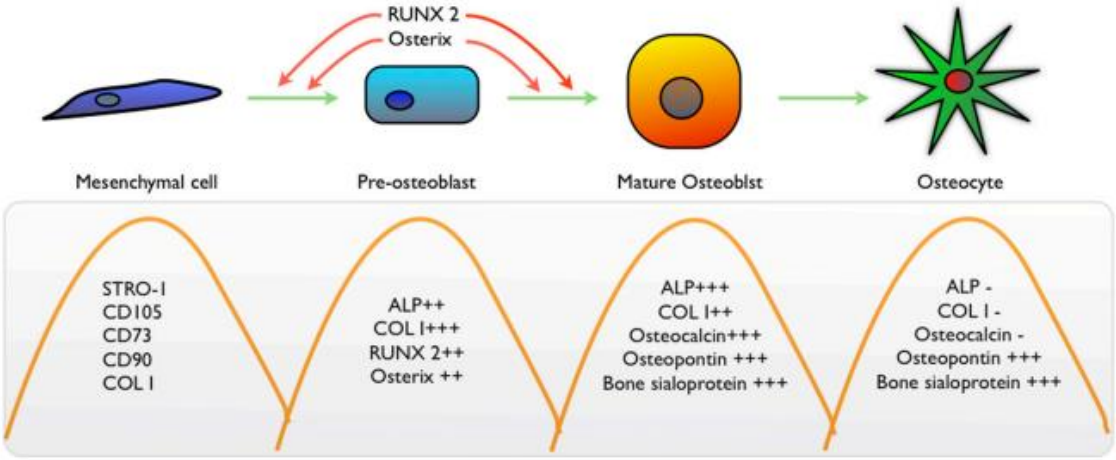


Figure 16. Etapas de diferenciação das MSCs em osteócitos, assim como a lista de marcadores celulares para cada etapa (Miron & Zhang 2012).

Inicialmente foi analisado o potencial de diferenciação osteoblástica de cada um dos digeridos de ECMp, utilizando dois marcadores de diferenciação clássicos: quantificação da atividade de ALP (marcador de diferenciação em pré-osteoblastos) e quantificação da mineralização celular (marcador de diferenciação de osteoblastos maduros) com o corante ALS.

É possível induzir a osteogênese através da adição de ácido ascórbico, dexametasona e β-glicerofosfato no meio de cultura. Ácido ascórbico aumenta a expressão e secreção de colágeno tipo I na ECM, que se liga a ingrinas $\alpha_2\beta_1$ e ativam MAPK (proteína-quinase ativadas por mitógenos) e em seguida Runx2. Dexametasona induz a expressão de Runx2 através da regulação de MKP1 (proteína-quinase fosfatase 1 ativadas por mitógenos). Por fim, β-

glicerofosfato é a fonte de fosfato inorgânico necessário para mineralização celular, além de ativar as vias ERK através de sua fosforilação (Langenbach and Handschel, 2013). Dessa forma, foi possível mimetizar o ambiente osteogênico no qual o material será introduzido, assim como analisar se o digerido de ECM auxilia ou não na promoção da diferenciação celular.

4.3.1.1 Ensaio de Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

A ALP é uma enzima localizada na parte externa da membrana de células pré-osteoblásticas e osteoblastos maduros, por esse motivo é utilizada como marcador de estágios iniciais de diferenciação (Miron & Zhang 2012). Ela catalisa a hidrolise de fosfomonoésteres (R-O-PO_3) através de formação de uma serina-fosfatase no sitio ativo da enzima, que reage com água em pH alcalino liberando fosfato inorgâni. Ela participa no início do processo de mineralização através da geração de fosfato para incorporação na hidroxiapatita.

Para verificar a atividade da ALP nas células tratadas com os digeridos de ECMp, foi adicionado ao meio de cultura o composto p-nitrofenilfosfato que, ao ser hidrolisado pela ALP, gera o p-nitrofenol, um composto amarelo, que apresenta absorção máxima em 405nm (**Figura 17**).

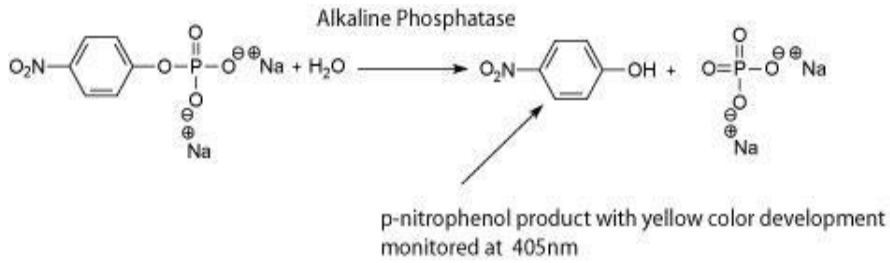


Figure 17. Reação de hidrólise do p-nitrofenilfosfato catalisado pela enzima ALP, formando fosfato inorgânico e o produto amarelado (p-nitrofenol), que pode ser quantificado através da leitura em UV-vis em λ = 405nm.

4.3.1.1.1 Expressão de ALP em SHED

As SHEDs foram incubadas por 21 dias com meio osteogênico suplementado com 50 µg/mL (DeQuach et al., 2012) de ECMp digerida com tripsina, colagenase e pepsina. A **Figura 18** ilustra a absorbância medida em λ = 405 nm referente a atividade da ALP nos dias 9, 14 e 21. Todos os testes foram feitos em quintuplicata.

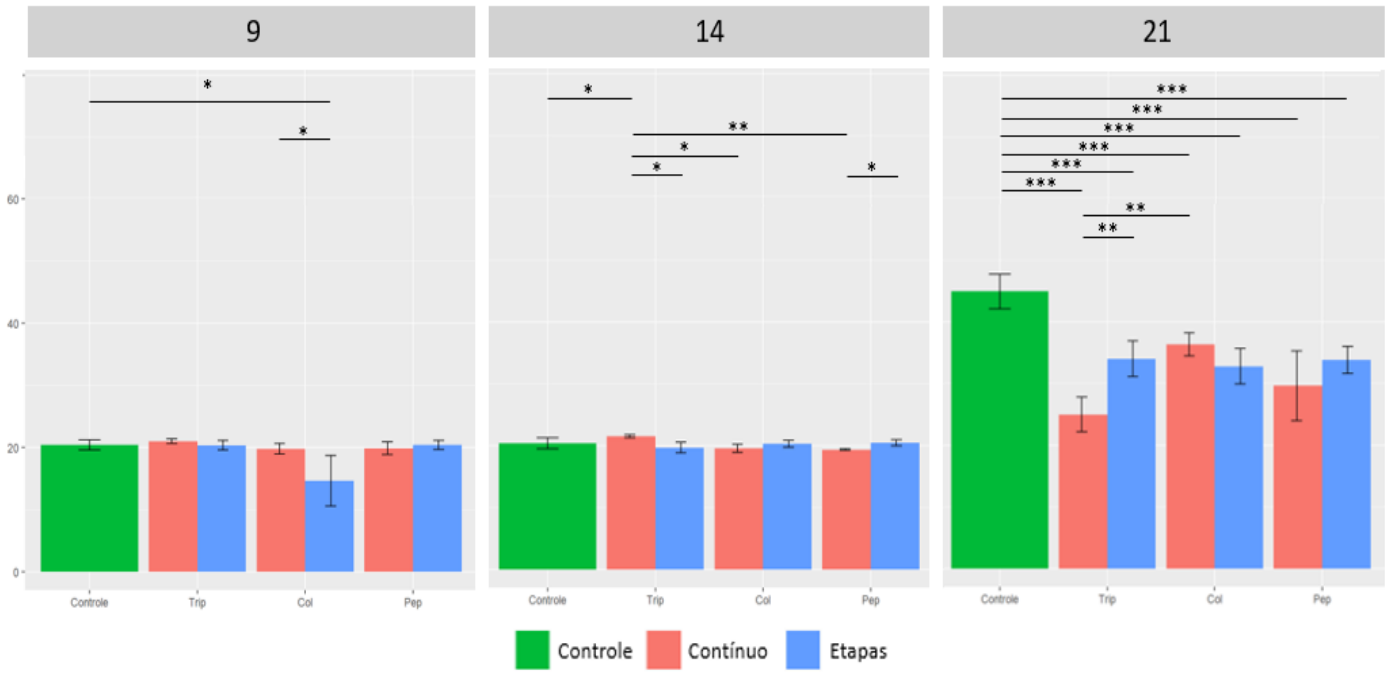


Figure 18. *Barplot* da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) nos dias 9, 14 e 21, referente a quantificação da atividade de ALP em SHEDs, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com o digerido de ECMp pelo método contínuo (vermelho) (tabela com p-valores presente no **ANEXO X**).

Para analisar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi utilizado o teste-t de Student. Observa-se que para o dia 9 e 14, praticamente não há diferença entra os tratamentos e o controle (células incubadas com meio osteogênico não suplementado). Em contrapartida, do dia 21, todas as amostras apresentaram atividade inferior ao controle.

A ALP é um marcado de diferenciação inicial em MSCs, que ocorre entre o dia 5 ao dia 15 após o início do estímulo (Miron & Zhang 2012). Na **Figura 18** observa-se que não há alteração na atividade da ALP entre o dia 9 e o 14 para nenhum dos tratamentos, incluindo o controle. Entretanto, o pico ocorreu apenas no dia 21, no qual era esperado a diminuição de sua intensidade (Miron & Zhang 2012).. Dessa forma, pode-se sugerir que o processo de diferenciação está comprometido por fatores celulares independentes da adição dos digeridos de ECM, uma vez que esses apresentam o mesmo perfil de expressão da enzima observado no controle, entratento com menor intensidade no dia 21. Isso ocorreu, possivelmente, por senescência das células, uma vez que já estavam na passagem 15. Também existe a possibilidade da concentração de material proteico sugerido nos experimentos de DeQuash ser incompatível com as demandas das SHEDs para diferenciação, uma vez que DeQuash utilizou células já diferenciadas (RASMC - células de musculatura lisa da aorta de ratos e C2C12 - mioblastos do esqueleto) apenas para análise de proliferação (DeQuach et al. 2012).

4.3.1.1.2 Expressão de ALP em BMMSC

Em seguida, iniciou-se os experimentos utilizando as BMMSCs, para comparar como os digeridos de ECMp atuam em cada linhagem celular. Contudo, devido ao problema encontrado durante os ensaios com as SHEDs, decidiu-se por não utilizar o estudo de DeQuash como referência e realizar um *screening* de concentrações para determinar 2 aspectos principais: **(1)** em qual concentração as BMMSCs começam a responder aos estímulos referentes a presença dos peptídeos e **(2)** qual é a concentração ideal para utilizar no gel.

Como o objetivo desse projeto é o desenvolvimento de um gel capaz de atuar no remodelamento de tecido ósseo, a capacidade de diferenciação em osteoblasto foi selecionada como característica essencial para escolha da concentração. Para isso, foi feito o teste de ALP utilizando meio osteogênico suplementado com as diferentes amostras de ECMp digerida nas seguintes concentrações: 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL. As células foram analisadas nos dias 9, 14 e 21 como ilustrado nas **Figuras 19**, **20** e **21**.

As **Figuras 19, 20** e **21** ilustram a absorbância medida em λ = 405 nm referente a atividade da ALP após incubação das BMMSC com os produtos de digestão de ECMp com tripsina, colagenase e pepsina, respectivamente. Para analisar a diferença estatística entre as amostras foi utilizado o teste-t de Student.

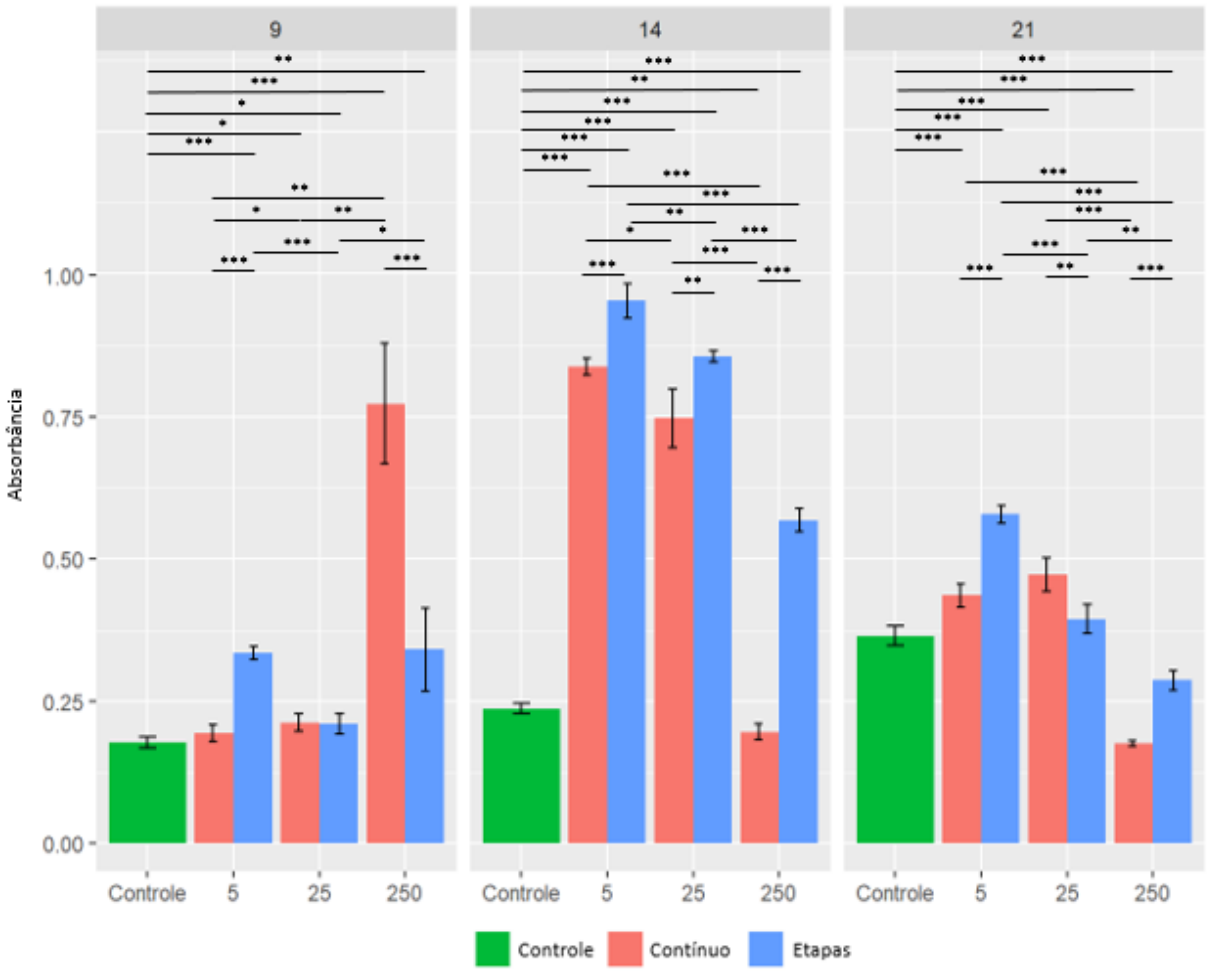


Figure 19. Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida por tripsina através método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). *Barplot* da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405 nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL e nos dias 9, 14 e 21 (tabela com p-valores presente no **ANEXO XI**).

Como esperado, a **Figura 19** apresenta o pico de atividade da ALP após 14 dias de cultura, seguido por uma queda na sua atividade (Kulterer et al. 2007, Miron & Zhang 2012). Observou-se que as amostras tratavas com 5 µg/mL de peptídeos em solução apresentam maior diferenciação que aquelas tratadas com 25 µg/mL e 250 µg/mL, tanto para o tratamento contínuo quanto para o em etapas. Além disso, nota-se que o tratamento em etapas é cerca de 10% superior que o tratamento contínuo em amostras tratadas com 5 µg/mL de material digerido (dia 14).

Foi observado que as amostras tratadas com 250 µg/mL de ECMp digerida apresentam um grande potencial de diferenciação para o tratamento contínuo a curto prazo (9 dias), seguido de queda da atividade da ALP a níveis abaixo do controle (dia 21). O tratamento em etapas

apresenta o mesmo perfil das outras concentrações, entretanto, com menor potencial de diferenciação.

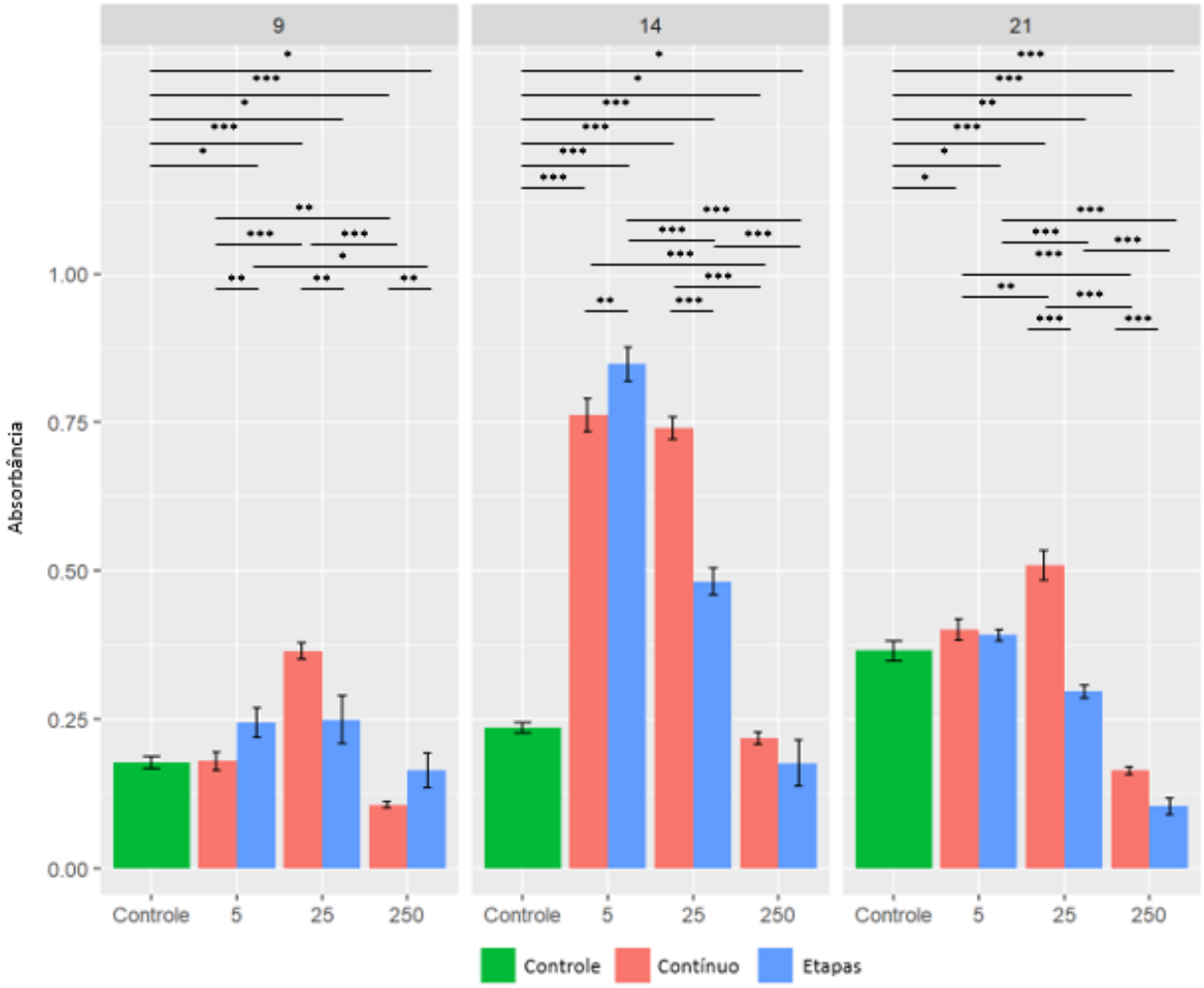


Figure 20. Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida por colagenase através do método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). *Barplot* da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250µg/mL e nos dias 9, 14 e 21 (tabela com p-valores presente no **ANEXO XI**).

Assim como mostrado no gráfico anterior, as amostras tratadas com ECMp digerida com colagenase (**Figura 20)** apresentam o pico de atividade da ALP após 14 dias de cultura (Kulterer et al. 2007, Miron & Zhang 2012). Observou-se que as amostras tratavas com 5 µg/mL de peptídeos em solução apresentam maior diferenciação que aquelas tratadas com 25 µg/mL e 250 µg/mL, tanto para o tratamento contínuo quanto para o em etapas. Além disso, nota-se que no dia do pico de atividade da ALP, o tratamento em etapas é cerca de 5% superior que o tratamento contínuo em amostras tratadas com 5 µg/mL de material digerido. Nota-se também

que, para o tratamento contínuo (dia 14), não há diferença entre as amostras 5 µg/mL e 25 µg/mL, sendo essa última cerca de 25% superior que o tratamento em etapas.

Para as amostras de 250 µg/mL, não houve uma taxa de diferenciação significativa, uma vez que em todas as amotras, a absorbância lida está abaixo do controle.

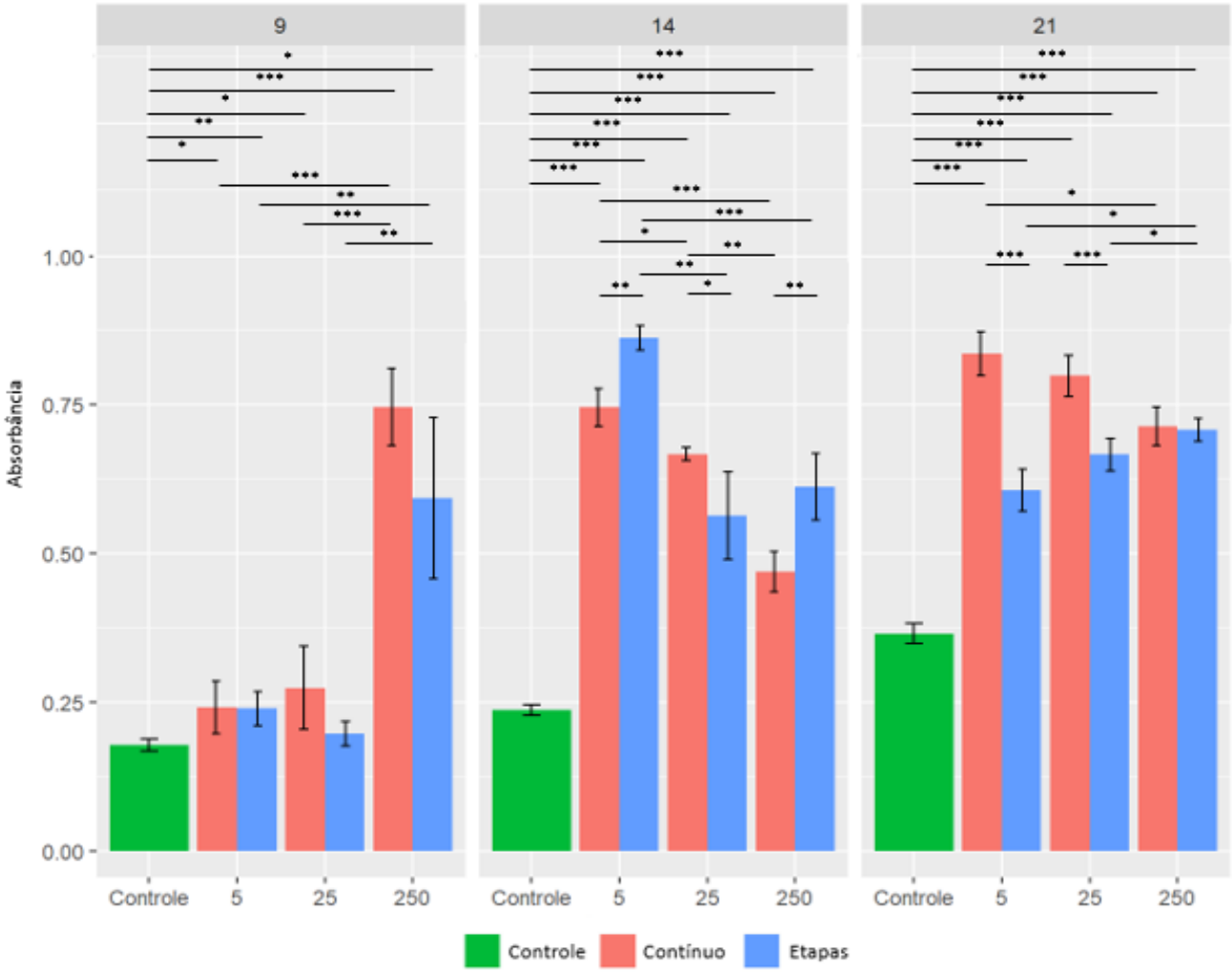


Figure 21. Quantificação da atividade de ALP em BMMSC MO-58, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida com pepsina através do método contínuo (vermelho) e em etapas (azul). *Barplot* da comparação entre absorbância das amostras (λ = 405nm) diluídas 20x, nas concentrações 5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL e nos dias 9, 14 e 21 (tabela com p-valores presente no **ANEXO XI**).

Por fim, para pepsina, a atividade da ALP não apresenta um perfil de expressão típico (Kulterer et al. 2007, Miron & Zhang 2012). Houve um aumento na atividade da ALP no dia 14, mas ao invés de diminuir no dia 21, essa se manteve constante ou superior. No dia 14, amostras tratadas com 5 µg/mL de ECM digerida apresentaram maior absorbância que as outras concentrações, tanto para o tratamento contínuo quanto para o em etapas. No dia 21,

entretanto, as amostras de 5 µg/mL e 25 µg/mL não apresentam diferença, sendo o tratamento contínuo superior que o em etapas.

Diferente do observado para as outras enzimas, as amostras com 250 µg/mL apresentaram uma rápida diferenciação após 9 dias de incubação, mantendo-se constante nos 21 dias subsequentes.

É possível notar um aumento na atividade da ALP do dia 9 ao dia 14, assim como a diminuição de seus níveis no dia 21 para todos os tratamentos analisados, sugerindo que ocorre o processo completo e diferenciação e maturação dos osteoblastos para os digeridos de tripsina e colagenase (Kulterer et al. 2007, Miron & Zhang 2012). Para a pepsina, por sua vez, há um aumento progressivo da atividade da ALP no tratamento direto durante os 21 dias, enquanto para o tratamento em etapas houve aumento entre os dias 9 e 14 e estabilização até o dia 21, sugerindo que não houve maturação do osteoblasto.

Após a análise de dados, concluiu-se que ao final dos 21 dias de experimento a concentração que melhor apresentou resultados foi a de 5 µg/mL para todas as proteases estudadas.

Além disso, vale ressaltar que para todas as enzimas estudadas, nas amostras com meio suplementado com 5 µg/mL de peptídeos apresentaram o maior pico em 14 dias, indicando maior atividade da ALP no estágio inicial de diferenciação, no qual ela é um marcador característico. Além disso, é possível observar que o tipo de tratamento influência na resposta celular.

4.3.1.2 Coloração com Vermelho de Alizarina (ARS)

O segundo marcador utilizado para comprovar a capacidade osteogênica dos digeridos de ECM foi a verificação da mineralização das células confluentes.

Vermelho de Alizarina é um corante natural extraído das raízes de *Rubia tinctorum*. É utilizado para detectar a presença de ossos ou depósitos de cálcio durante o processo de mineralização celular. A molécula de AR apresenta dois grupos hidroxila (1-, 2-OH), 2 grupos carbonila (9-, 10-C=O) capazes de interagir com íons de metais através da formação de sais ou quelando-os, como apresentado na **Figura 22** (Moriguchi et al., 2003; Puchtler et al., 1969).

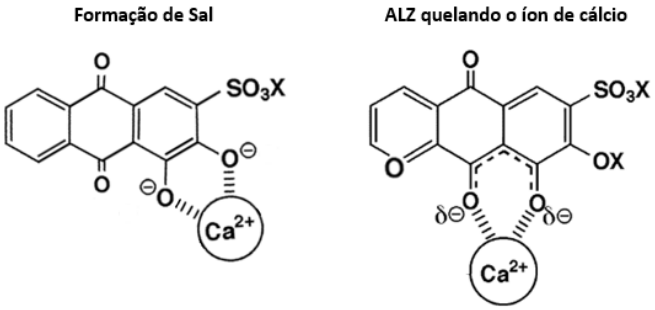


Figure 22. Representação das duas possíveis estruturas nas quais AR interage com íons de cálcio (X corresponde a H ou Na). Formação de sal com dois grupos fenólicos ionizados (difenolato) a esquerda e íon quelado a direita através da interação com um grupo fenólico e o oxigênio adjacente (alterado de (Moriguchi et al. 2003)).

A mineralização ocorre es estágios finais da diferenciação, entre dia 15 e 28, caracterizados pela maturação dos osteoblastos. ALP, característica de pré-osteoblastos, participa do início do processo de mineralização (Miron & Zhang 2012) e quando eles se diferenciam completamente em osteoblastos, ocorre o aumento da expressão de sialoproteínas do osso (BSP) e osteocalcina (OC), responsáveis pela formação e remodelamento ósseo. BSP liga-se ao colágeno I e promove a nucleação dos cristais de hidroxiapatita, iniciando assim o processo de mineralização. A OC, por sua vez, atua de forma conjunta com a BSP, ligando cálcio à hidroxiapatita (Hauschka et al., 1989).

Osteoblastos maduros são capazes de sintetizar osteóide e quando ficam imersos em na matriz óssea, ele diferencia-se em osteócito. Caso contrário, o osteoblasto entra em processo de apoptose (Birmingham et al. 2012, Kulterer et al. 2007, Miron & Zhang 2012).

4.3.1.2.1 Análise de mineralização em SHEDs

Para analisar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi utilizado o teste-t de Student (**Figura 23**).

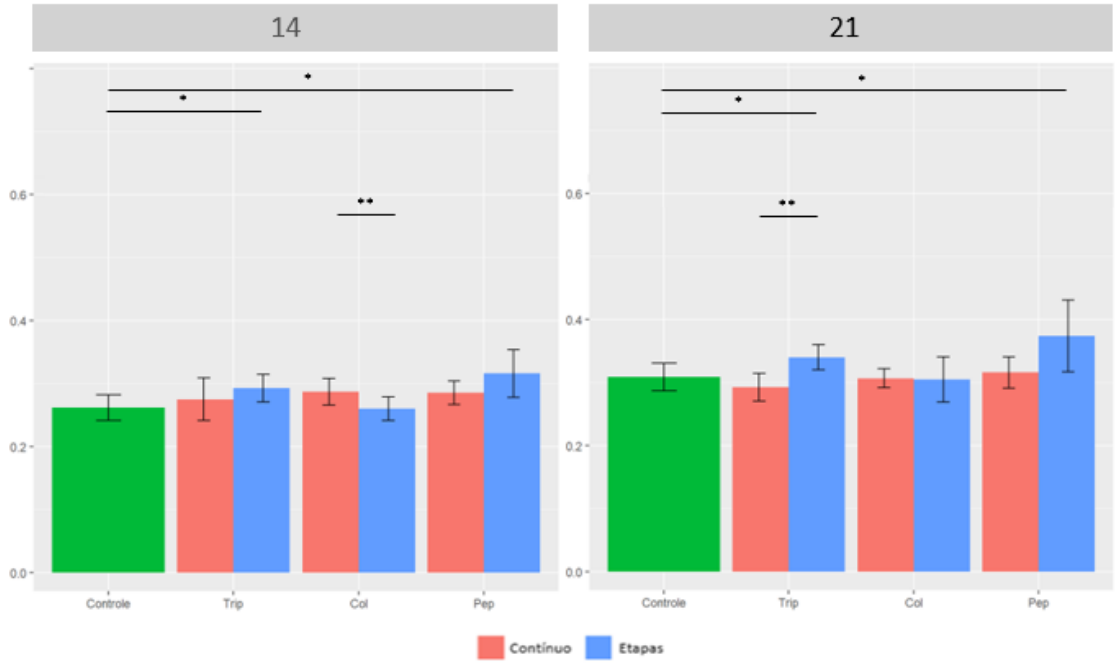


Figure 23. *Barplot* referente a quantificação da mineralização em SHEDs pela técnica de ARS, após serem incubadas com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida (λ = 570nm) (tabela com p-valores presente no **ANEXO XII**).

Diferentemente do esperado, que não houve diferença na taxa de mineralização das amostras entre o início da deposição dos cristais (dia 14) pelos pré-osteoblastos (Miron & Zhang 2012) e o último dia de análise. Comparativamente aos resultados obtidos para atividade de ALP, no qual, não foi observado o pico no dia 14, pode-se concluir que o processo de diferenciação está retardado em relação ao descrito pela literatura (Langenbach & Handschel 2013), uma vez que após 21 dias de incubação com fatores osteoindutivos (dexametazona, ácido ascórbico e β-glicerofosfato), os marcadores clássicos de formação osteoblasto não são detectados.

Adicionalmente, foi encontrado dificuldades durante a multiplicação das células para poder iniciar os testes *in vitro*. Dessa forma, podemos sugerir que as SHEDs não estão adequadas para realização de experimentos, possivelmente por estarem velhas (passagem 14). Consequentemente, o processo de diferenciação, assim como outros processos celulares ficam comprometidos. À vista disso, não é possível observar a real influência da adição de peptídeos no meio de cultura, não podendo assim tirar uma conclusão a partir dos ensaios realizados. Por esse motivo, os testes de adesão e proliferação não serão realizados para essa linhagem celular.

4.3.1.2.2 Análise de mineralização em BMMSC

Para analisar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi utilizado o teste-t de Student.

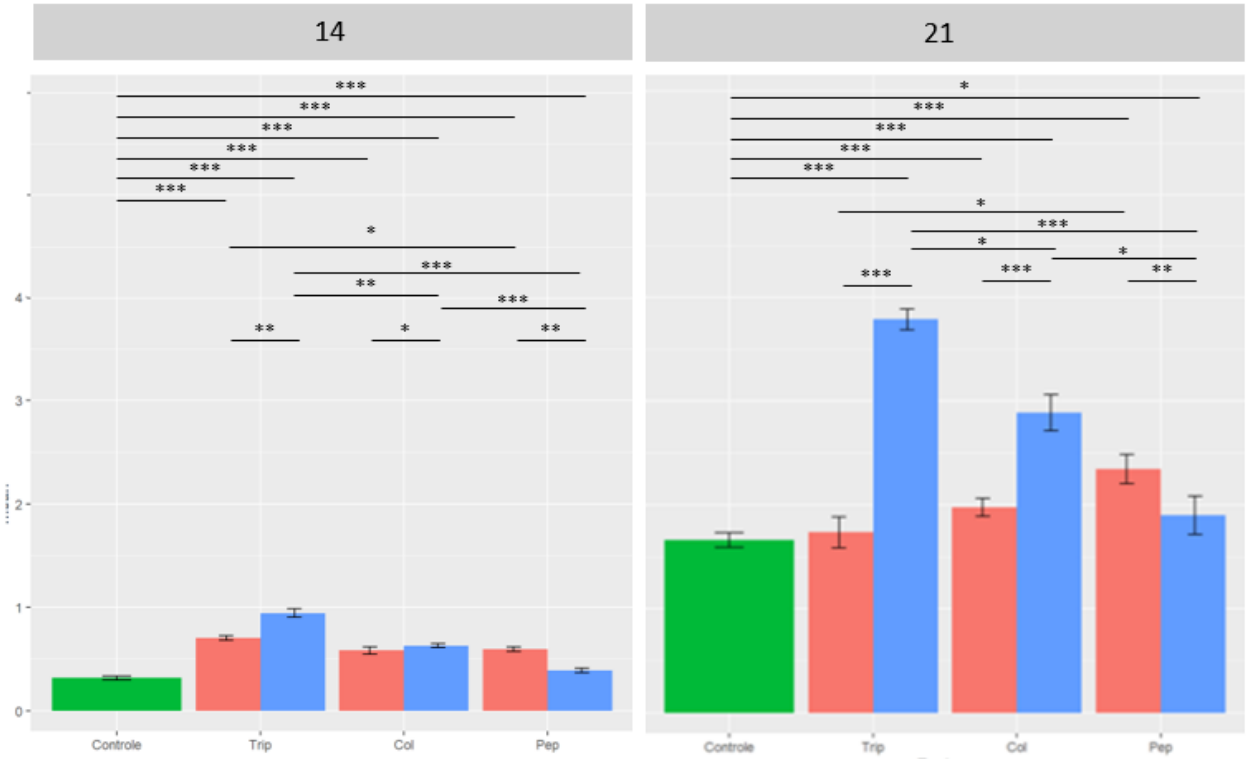


Figure 24. *Barplot* referente a quantificação da mineralização em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 21 dias com meio osteogênico suplementado com ECMp digerida pelo método contínuo (vermelho) e em etapas (azul) (λ = 570nm) (tabela com p-valores presente no **ANEXO XIII**).

Durante a fase final de diferenciação ocorre a deposição de cristais de hidroxiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] na matriz orgânica do osso de forma organizada, regulada pela estrutura das fibrilas de colágeno, assim como por outras proteínas e proteoglicanos capazes de inicial sua nucleação, como o caso das sialoproteínas e dentina (Komarova et al., 2015). Esses cristais podem ser quantificados pela ligação de íons de cálcio à AR.

Como esperado, houve maior mineralização na fase final de diferenciação (após 21 dias de tratamento), quando os osteoblastos já estão maduros e expressando proteínas nucleadoras. Ao final do experimento, percebe-se que o tipo de tratamento afeta a formação de peptídeos ativos, uma vez que para o tratamento contínuo, há uma maior mineralização para pepsina, seguido por colagenase e tripsina. De forma oposta, no tratamento em etapas, há uma maior mineralização para tripsina, seguida por colagenase e pepsina.

Corroborando com os dados de atividade de ALP, nos quais as células tratadas com digeridos de tripsina e colagenase apresentaram uma redução em sua atividade após 21 dias, elas também apresentaram uma maior mineralização para o tratamento em etapas, sugerindo que esses digeridos promovem uma diferenciação mais rápida em relação ao digerido de pepsina e ao controle.

O maior potencial osteoindutivo apresentado pelos digeridos pode estar relacionado a presença de mimecam (osteoglicina) na ECMp. Esse proteoglicano é secretado na ECM por osteoblastos, atuando em conjunto com TGF-β1 e 2 na indução da mineralização, fibrilogênese do colágeno e regulação da massa óssea (Cao et al., 2015; Tasheva et al., 2004). Estudos realizados com células MC3T3-E1 sugerem que a osteoglicina é capaz de aumentar a expressão de ALP, Col1, β-catenina e osteocalcina, apresar de reduzir a expressão de Runx2 e Osterix em osteoblastos, para induzir mineralização e maturação do osteoblasto (Tanaka et al., 2012). Estudos realizados por Liu e colaboradores mostram que, da mesma forma que Runx2 induz diferenciação em estágios inicias, ele também atua negativamente na diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros (Liu et al., 2001).

Além disso, foi observado nos experimentos de DC que em diversas amostras de ECMp digerida haviam fragmentos de tripla hélice proveniente de fibrilas de colágeno, que também foram identificadas na análise proteômica. Estudos realizados por Salasznyk provam que MSC cultivadas na presença de colágeno I entram em processo de diferenciação osteogênica, mediado por integrinas e lamininas, que ativam a via de sinalização ERK1/2 levando a expressão de osteopontina e osteocalcina (Klees et al., 2005; Salasznyk et al., 2004).

4.3.2 Adesão e Proliferação in vitro

Além do potencial de diferenciação, foi analisado se os digeridos de ECMp alteram mecanismos de adesão e proliferação das BMMSC na placa de poliestireno (PS). Para isso foi utilizada a técnica de Alamar Blue, na qual é possível monitorar o ambiente redutor existente em uma célula viva.

A resazurina, corante presente no reagente de Alamar Blue, é uma molécula solúvel em água e não tóxica que atua como um aceptor intermediário na cadeia de transporte de elétrons. Por apresentar potencial de redução de +380mV, ela pode ser reduzida por NADPH (E_o = 320mV), FADH (E_o = 220mV), FMNH (E_o = 210mV), NADH (E_o = 320mV), assim como por citocromos (290mV ≥ E_o ≥ 80mV). Dessa forma, a resazurina permeia pelas membranas celulares e passa de seu estado oxidado (coloração azulada não fluorescente) para o estado reduzido (rosa que

apresenta alta fluorescência), chamado de resofurina. Além disso, a resazurina pode ser reduzida por uma série de enzimas citoplasmáticas e mitocondriais. Assim como esquematizado na **Figura 25**. Absorbância pode ser lida em comprimento de onda entre 540nm e 630nm, enquanto a fluorescência pode ser medida em comprimento de onda de excitação de 530nm - 560nm e emissão de 590nm (Rampersad, 2012).

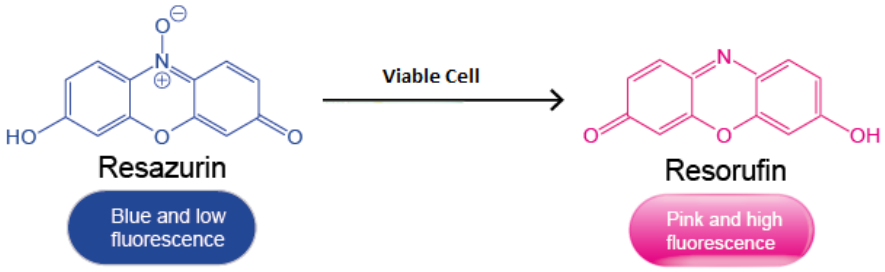


Figure 25. Representação da redução as Resazurina em Resofurina em meio celular.

4.3.2.1 Adesão Celular – Alamar Blue

Adesão é um processo biológico que possibilita a sobrevivência celular e a formação da arquitetura tecidual. Existem diversos mecanismos relacionados na adesão intercelular e entre célula – matriz, envolvendo três classes principais de proteínas: receptores de adesão, proteínas da ECM e proteínas transmembrana associadas com o citoesqueleto. Receptores de adesão são glicoproteínas transmembrana (integrinas, caderinas, imunoglobulinas, selectinas e sindecans) que reconhecem outros receptores e sítios de adesão presentes na ECM, assim regulam a interação célula-célula e célula-superfície. Proteínas ligadas ao citoesqueleto atuam na transdução de sinal (Gumbiner, 1996).

A adesão célula-matriz pode ocorrer diretamente entre as integrinas e sítios presentes no colágeno tipo I e II (*collagen receptor integrin binding motif)* (Sipilä et al. 2018). Assim como pode ser regulada por colágeno IV, fibronectina, laminina, periostina, SLRPs e fator von Willebrand (vWF) (Gumbiner 1996, Zeltz et al. 2014).

As BMMSCs foram incubadas por 4h com 5 µg/mL de digerido de ECMp, para verificar se sua prosença no meio de cultura interfere em vias de sinalização que levam a um aumento na adesão na placa de PS. Após esse período as células não aderidas foram retiradas e então realizado o ensaio de Alamar Blue. A **Figura 26** compara a densidade óptica (OD) referente a adesão celular para os diferentes tratamentos, assim como o controle.

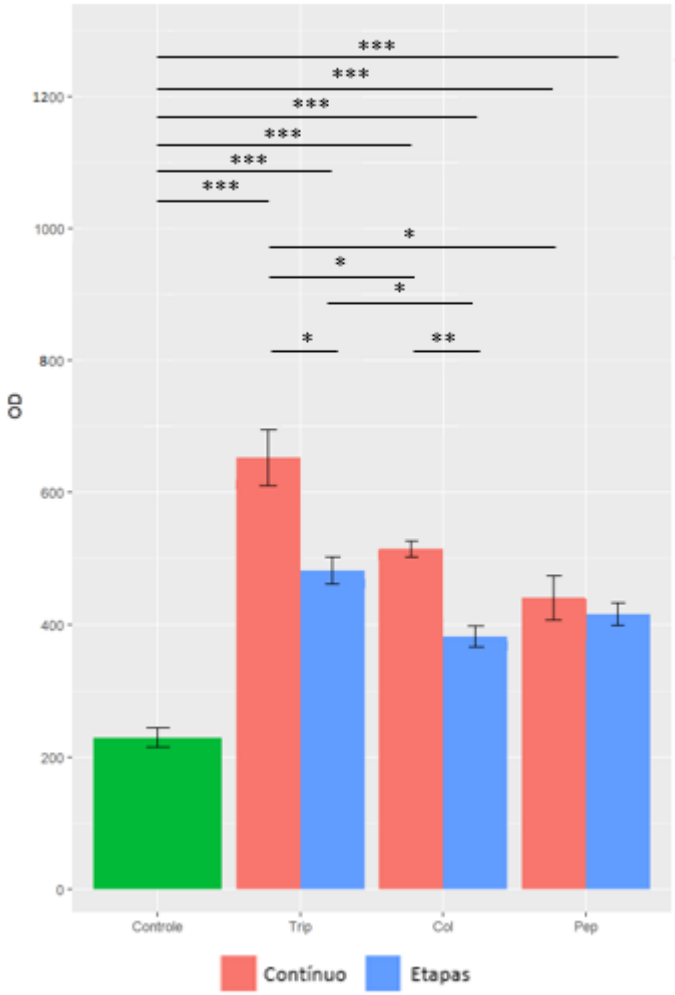


Figure 26. Quantificação da adesão celular em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 4h com meio osteogênico contendo ECMp digerida pelo método contínuo e em etapas. *Barplot* da comparação entre OD das amostras ($\lambda_{emissão}$ = 590nm) (tabela com p-valores presente no **ANEXO XIV**).

Para analisar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi utilizado o teste-t de Student. Observou-se que todos os tratamentos proporcionaram uma adesão significativamente maior que a do controle, sugerindo que há a presença de peptídeos promotores da adesão celular em todos eles. Comparado o OD das enzimas e dos tratamentos entre sí, observou-se que o tratamento contínuo apresenta maior potencial de adesão para digeridos de tripsina e colagenase, enquanto não há diferença do tipo de tratamento para pepsina. Além disso, é possível notar que a tripsina foi superior as outras enzimas em ambos os tratamentos.

Foi identificado no Anexo SuppT4, que a ECMp apresenta cadeias de colágeno α1 (I) e colágeno α2 (I), apresentando assim sítios de ancoragem para as MSC. Entretanto, essas

proteínas foram degradadas pela atividade proteolíticas da tripsina, pepsina e colagenase, podendo assim expor seus sítios de forma mais eficiente que fibrilas de colágeno intactas (Perumal et al., 2008; Zeltz et al., 2014). Além disso, também foi encontrado apenas no perfil proteico da ECMp, vWF, laminina, α-tubulina I, TGFBI (*transforming growth factor-β-induced protein ig-h3*) e SRLPs como lumicam, prolargina, fibromodulina e mimecam.

4.3.2.2 Proliferação Celular – Alamar Blue

Em tecidos saudáveis a proliferação celular ocorre apenas para reparação. Geralmente essa tarefa é realizada por células tronco, capazes de se dividir assimetricamente, formando uma nova célula e uma célula progenitora, que está fadada à diferenciação. Uma vez que essas células passam pelo processo de diferenciação, elas param de se multiplicar devido a rígidos mecanismos de controle de sinalização, necessário para evitar a formação de tumores (Alberts 2008).

A divisão celular ocorre 4 estágios bem definidos: Gap1, marcado pelo crescimento celular (G1), replicação do DNA (S), Gap2, marcado por mecanismos de verificação da replicação e empacotamento do DNA (G2), seguido por mitose e citocinese (M). G0 ocorre quando a célula sai do ciclo celular devido à ausência de sinalizadores de proliferação ou presença de sinalizadores pró-diferenciação (Alberts 2008).

As diferentes Cdks (*cyclin-dependent kinases*) ativam e regulam a transição entre as etapas do ciclo celular, assim como identificado na **Figura 27**.

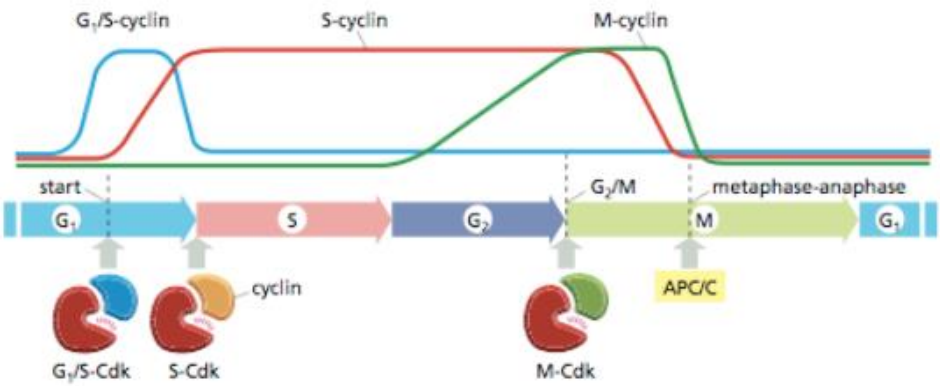


Figure 27. Esquema da progressão do ciclo celular. Identificação da sequencia dos complexos ciclina-Cdk responsáveis por programar o início de cada fase do ciclo, assim como regular os eventos críticos de cada uma delas.

Para verificar se há produtos de digestão capazes de estimular os mecanismos que de proliferação celular, BMMSCs foram incubadas por 15 dias com meio de proliferação

suplementado com 5 µg/mL de digerido de ECMp. Nos dias 5, 8, 12 e 15 foi realizado o ensaio de Alamar Blue. A **Figura 28** compara a densidade óptica (OD) referente a proliferação celular para os diferentes tratamentos, assim como o controle.

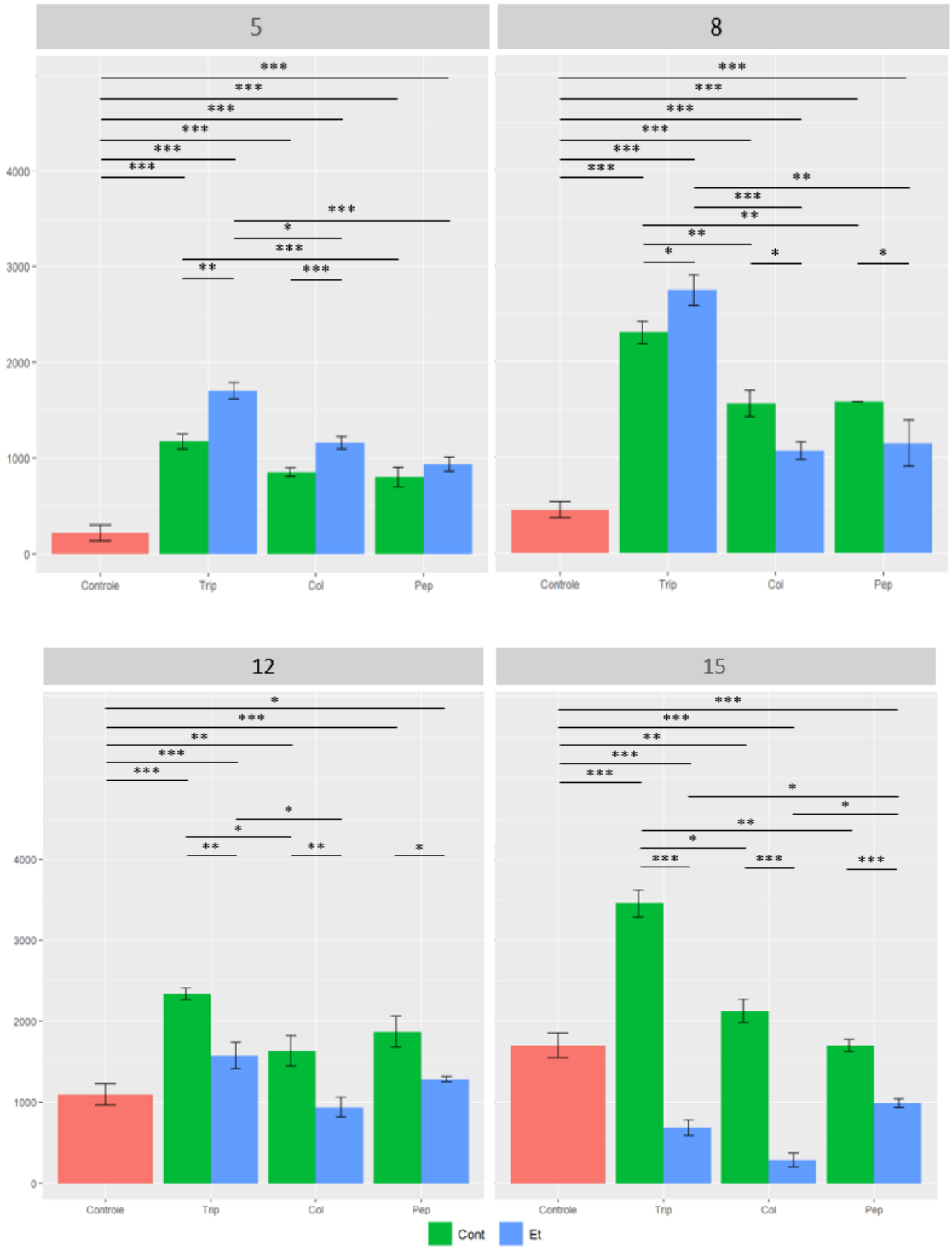


Figure 28. Quantificação da proliferação celular em BMMSC MO-58, após serem incubadas por 15 dias com meio de proliferação suplementado com ECMp digerida pelo método contínuo e em etapas. *Barplot* da comparação entre OD das amostras ($\lambda_{emissão}$ = 590nm) (tabela com p-valores presente no **ANEXO XV**).

Para analisar a diferença estatística entre os tratamentos e o controle, foi utilizado o teste-t de Student. Observou-se que até o dia 12 todos os tratamentos proporcionaram uma proliferação significativamente maior que a do controle, sugerindo que há a presença de peptídeos que induzem a divisão celular. Com exceção das amostras tratadas com diferido de colagenase em etapas,

Observou-se que o perfil de crescimento celular é distinto entre os tratamentos. O tratamento contínuo apresentou um aumento progressivo do aumento de células, enquanto o tratamento em etapas apresentou um rápido crescimento nos 8 primeiros dias, estabilização até o dia 12 e diminuição da atividade metabólica no último dia de análise. Além disso, é observado que os 15 dias, a tripsina apresentou maior eficiência em relação as outras proteínases.

Esses resultados podem ser explicados pela presença de TGIF (*transforming growth interacting factor*) na ECMp (SuppT3). TGIF é um repressor de transcrição, que atua de duas maneiras: (1) ligando-se diretamente no sítio 5'-CTGTCAA-3' do DNA ou (2) interagindo com proteínas Smads ativadas por TGF-β, causando a não expressão de genes alvo desse fator de crescimento (Melhuish et al., 2001). A via TGF-β/Smad está envolvida na inibição da divisão celular, assim como demostrado pela **Figura 29**. Dessa forma o TGIF é considerado um regulador positivo do ciclo celular, devido sua capacidade de evitar a formação da p21. Além disso, em situações de aumento da concentração de EGF, o TGIF é fosforilado pela vida Ras-Erk, aumentando sua meia via no ambiente celular (Lo et al., 2001).

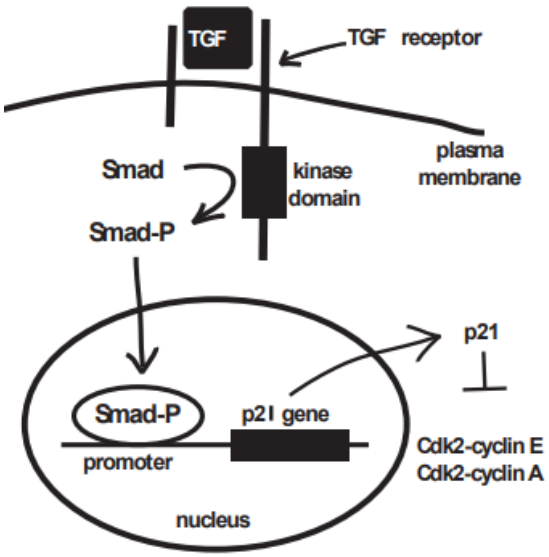


Figure 29. Esquema da via de sinalização de inibição da divisão celular mediada por TGF-β. A ligação do TGF-β ao seu receptor promove a ativação da porção quinase da enzima, levando a fosforilação da Smad, que são então capazes de entrar no núcleo e ligar-se a p promotores e regular a transcrição de genes, como o p21. A proteína p21 inibe a formação do complexo ciclina E/A – Cdk2, levando a inibição do ciclo celular.

Além disso, analisando a **Anexo III**, foi encontrada a presença de outros moduladores positivos da proliferação celular na ECMp, como FYVE, MAP3K1 (*mitogen-activared protein kinase 1*) e Par6. FYVE é capaz de ativar Cdc42 (*cell division control protein 42*), uma GTPase da família Rho envolvida na polarização celular, remodelamento do citoesqueleto, proliferação, migração, adesão. Entretanto, essa enzima é rigidamente regulada por GEFs (*guanosine nucleotide exchange factors*), GAPs (*guanine-activating proteins*) e GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*), garantindo que sua concentração esteja sempre baixa, evitando a formação tumoral (Bishop and Hall, 2000; Qadir et al., 2015). A Cdc42 ativada é capaz de interagir com Par6, para promover a polarização celular (Henrique and Schweisguth, 2003). FYVE também ativa MAPK8 (*mitogen-activared protein kinase 8* - também chamada por JNK1), que atua em conjunto com a via Ras-Erk para fosforilar o fator de transcrição JUN, envolvido na regulação da expressão de ciclina D (Kramer, 2016). MAP3K1, por sua vez, ativa ERK e JNK1 através da fosforilação de MAP2K1 e MAP2K4 (Xia et al., 1998).

Entretanto foram encontradas algumas proteínas em SuppT3 que promovem a inibição do ciclo celular, como *NIMA related kinase 11* (*never in mitosis, gene A*) e tirosina quinase associada a apoptose (AATK). NIMA modula progressão da fase G2 para M da mitose, uma vez que é responsável por fazer o controle da maquinaria de *checkpoints* para reparo de erros no DNA (Noguchi et al., 2002), além de controlar a degradação de Cdc25A, uma ativador de CDKs (Melixetian et al., 2009). Enquanto AATK induz a morte celular programada e é necessária para interrupção de ciclo celular (Haag et al., 2014).

Além disso, foram encontradas proteínas reguladoras da migração celular e remodelamento da ECM, como é o caso da ADAMTS1 (*a desintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif*) e da MMP14 (*matrix metalloproteinase-14*) (Tortorella et al., 2000).

4.4 Formação de Hidrogéis

4.4.1 Síntese dos Agentes Reticulantes

Biomateriais baseados em colágeno e ECM desenvolvidos para regeneração de tecidos apresentam bons resultados referentes a proliferação e diferenciação celular (Alberts, 2008; Ma et al., 2004; Rault et al., 1996; Yannas and Burke, 1980; Yannas et al., 1989). Entretanto eles apresentam rápida taxa de biodegradação e baixa resistência mecânica, não atendendo as demandas para serem utilizados *in vitro* ou *in vivo* (Ma et al. 2004). A reticulação química é um método efetivo para reduzir a biodegradabilidade do material, assim como otimizar as propriedades mecânicas dos materiais (Chen et al. 2011).

Tradicionalmente, o glutaraldeído é o reticulante mais utilizado (Khor, 1997), entretanto sua citotoxicidade e calcificação tornam os materiais pouco utilizáveis a longo prazo (Ma et al. 2004). Dessa forma, pesquisadores buscaram alternativas de baixa toxicidade como epóxis (Zeeman et al., 1999), carbodiimidas (Olde Damink et al., 1996) e ésteres ativados com NHS (Chen et al. 2011, Saito et al. 2004).

Com o objetivo de desenvolver um material com propriedades mecânicas mais robustas e assim ficar mais tempo em contato com o organismo do hospedeiro, o projeto propõe reticular o digerido de ECM com dialdeídos derivados de PEG, ésteres ativados com NHS e glutaraldeído.

4.4.1.1 Derivados de PEG

PEG é provavelmente o polímero mais utilizado em engenharia de tecidos devido sua alta biocompatibilidade. Além disso, recentemente seu uso em medicamentos e em implantes médicos foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (Liu et al., 2010).

O PEG é hidrofílico, não carregado, estável em condições fisiológicas e forma superfícies altamente hidratadas que tornam a adsorção de proteínas energeticamente desfavorável (Liu et al. 2010), assim como a adesão celular (Alcantar et al., 2000). Dessa forma, a utilização de PEG como modificador de superfície passou a ser uma estratégia para suprimir adesão de plaquetas no material, reduzindo o risco de formação de trombos, danos teciduais associados e outros efeitos citotóxicos ocasionados pela ativação do sistema imunológico (Alcantar et al. 2000). Hidrogéis produzidos a partir de PEG já foram testados no tecido nervoso de roedores e não apresentou imunorrejeição (Bjugstad et al., 2010).

Devido a sua alta biocompatibilidade e baixa reatividade no meio fisiológico, buscou-se utilizar um derivado de PEG como o reticulante do material digerido. Para isso, seria necessário a modificação de seus grupos hidroxila terminais, para que eles apresentassem alta reatividade

e pudessem reagir rapidamente com os peptídeos para formação do gel *in situ*. Uma possibilidade seria a oxidação das hidroxilas à carbonilas, através da reação de Corey-Kim.

A oxidação de Corey e Kim é composta por quatro etapas. Inicialmente, gera-se o íon dimetilclorosulfônio (composto 1) *in situ* através da reação Sn2 de N-clorosuccinimida (NCS) e DMS em tolueno a 0°C, marcada pela precipitação de um sólido branco (**Figura 30.1**). Em seguida a temperatura é reduzida para -25°C e adiciona-se o álcool, que atua como nucleófilo, levando a uma substituição (Sn2) no átomo de enxofre carregado positivamente, formando o composto 2 e liberando HCl (**Figura 30.2**). Por fim, é adicionada a trietilamina, que reage por E2 no carbono α ao enxofre, formando o intermediário 3, que por sua vez é decomposto com o aumento da temperatura, dando origem ao aldeído correspondente e DMS (**Figura 30.3 e 4**).

Entretanto, devido à baixa solubilidade de PEG em tolueno, o solvente for trocado para THF. Além disso, devido a maior reatividade de NBS, o NCS foi substituído, como ilustrado na **Figura 30.**

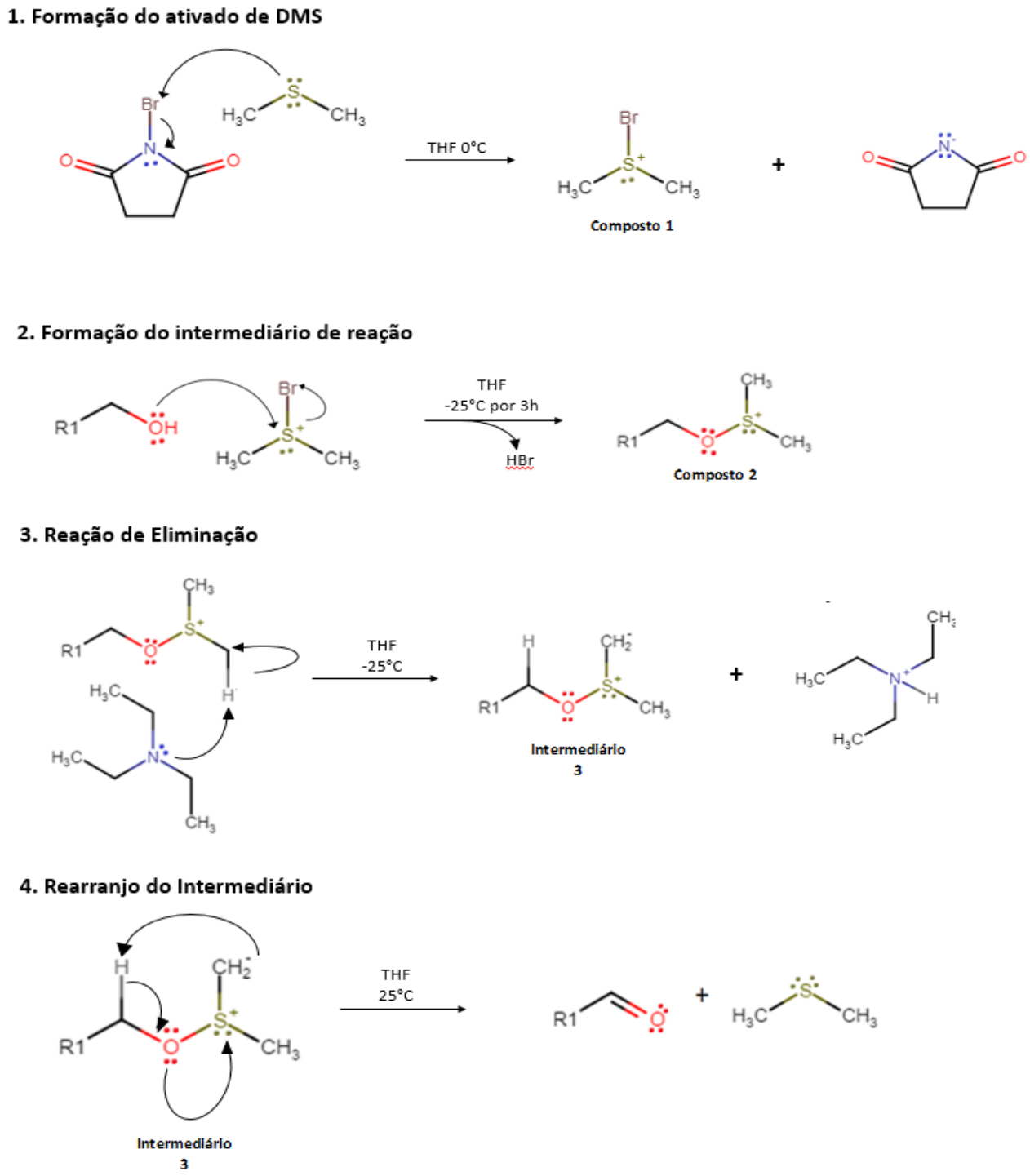


Figure 30. Mecanismo de ação referente a oxidação de Corey-Kim dividido nas quatro etapas, proposto por Katayama (Katayama et al., 1988). (1) formação do composto 1 - ativado de DMS através de uma Sn2 no átomo de bromo; (B) adição do álcool ao meio reacional, levando a formação do composto 2 através de uma Sn2 no átomo de enxofre e, por fim, (C) adição de trietilamina, que promove a eliminação de um próton de um dos grupos metilas ligadas ao enxofre, formando o intermediário de reação 3, que por sua vez rearranja-se e forma o aldeído pretendido.

A quantificação do dialdeído de PEG (PEG-$(CHO)_2$) foi feita pelo método colorimétrico proposto por Harris (Harris et al. 1984), no qual o aldeído é diluído a uma concentração conhecida juntamente com Reagente Schiff, provocando a alteração da cor da solução, de alaranjado para magenta, de maneira diretamente proporcional a concentração de aldeído no meio. Esse método é seletivo para aldeídos, uma vez que outros grupos funcionais no meio não reagem com o corante**.**

Após construção da curva padrão de acetaldeído (**Anexo XVI**, foi medida a absorbância referente a 0,7mM de PEG-$(CHO)_2$ na região do visível (500nm ≤ λ ≤ 620nm) e observou-se um pico em λ = 548nm com absorbância 0,13, aproximadamente (**Figura 31**). Entretanto, de acordo com a curva padrão, para 0,7mM de um aldeído hipotético, era esperado absorbância próxima de 0,5. Considerando que a oxidação tivesse um bom rendimento em ambas as extremidades do polímero, PEG-$(CHO)_2$ apresentaria duas carbonilas, sendo assim, o pico de absorção seria de aproximadamente 1 para o mesmo comprimento de onda.

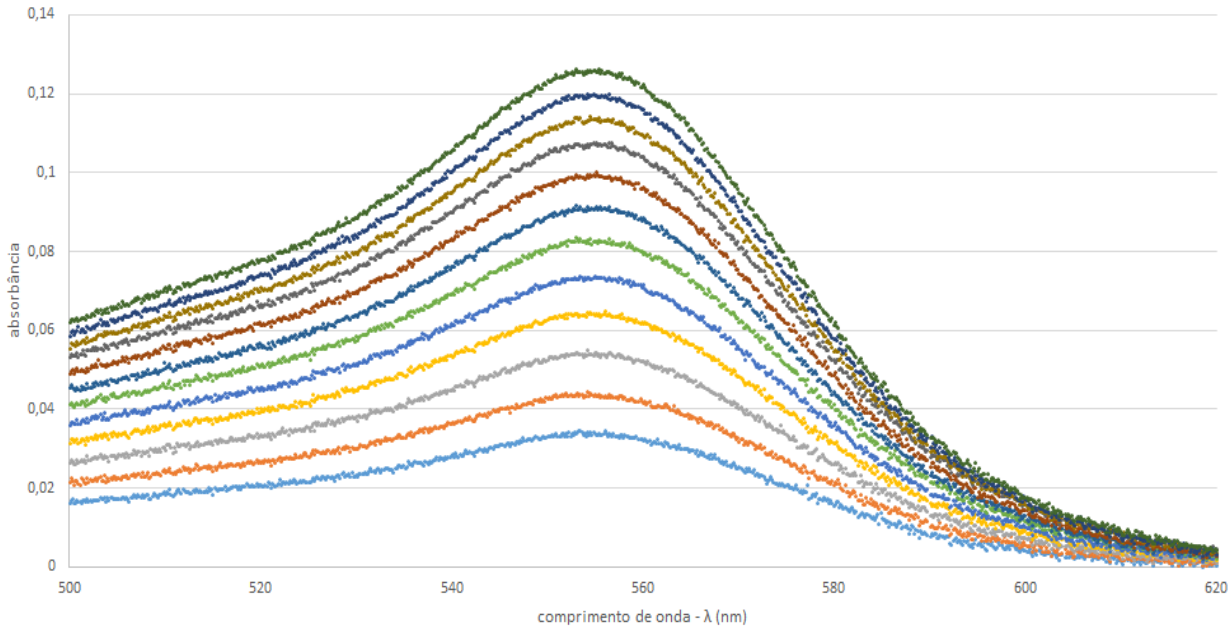


Figure 31. Espectro de absorção (500nm ≤ λ ≤ 620nm) da cinética de reação do PEG-(CHO)2 (0,7mM) com reagente de Schiff, apresentando um pico em λ = 548nm com absorbância igual a 0,13.

Para identificar se o processo oxidativo formou aldeídos ou ácidos carboxílicos, foi feita análise de Infravermelho para detectar os grupos funcionais da molécula.

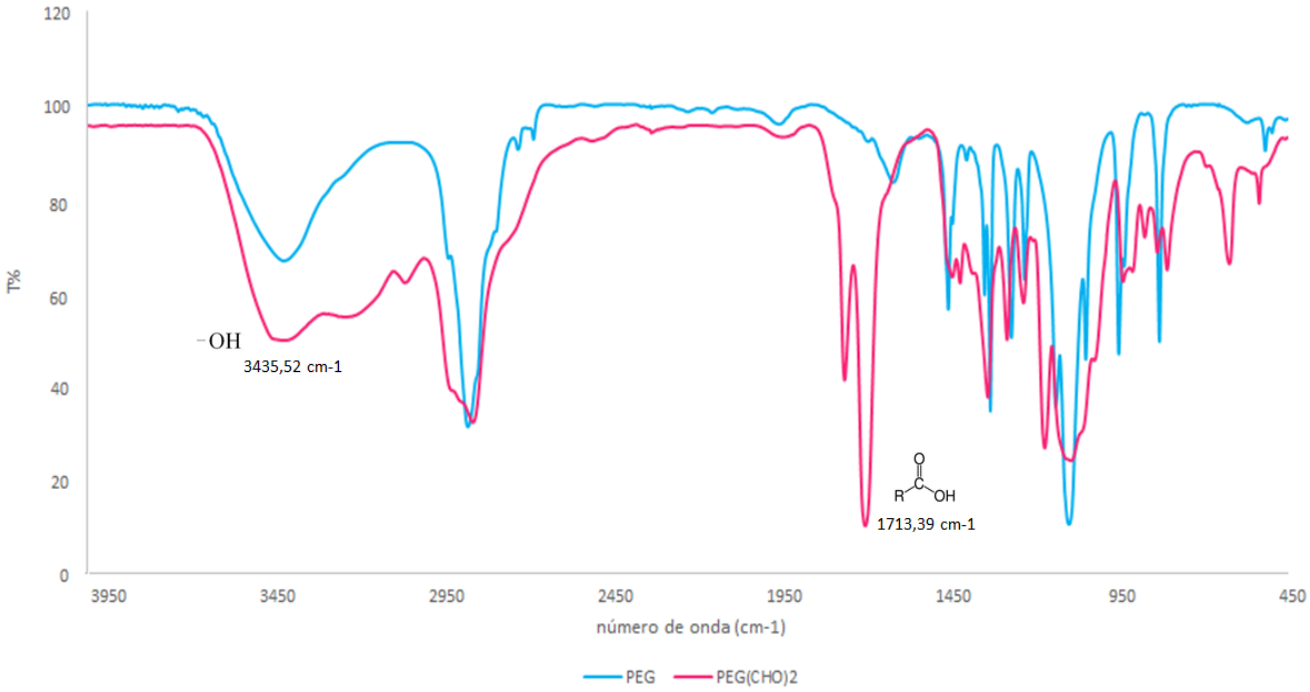


Figure 32. Espectro de Infravermelho referente ao PEG comercial (azul) e ao PEG(CHO)2 (rosa). Diferentemente do espectro azul, há a banda larga de estiramento da ligação O-H em 3435cm-1, assim como a banda de estiramento da carbonila em 1713cm-1 no espectro rosa, indicando que a oxidação das extremidades do PEG formou um ácido carboxílico.

É possível verificar a presença de uma intensa e larga banda de estiramento da ligação O-H em 3435 cm^{-1} no espetro de PEG-$(CHO)_2$ (rosa), assim como a banda de estiramento da ligação C-O em 1713 cm^{-1}, características de ácido carboxílico. Indicando que a reação não parou em aldeído, como planejado.

Devido as inúmeras tentativas sem sucesso, foi encontrado como alternativa o diepóxi PEG (**Figura 33**). Ele possui a mesma estrutura do PEG, que é utilizada em diversos biomateriais por ser biocompatível, e apresenta duas terminações de alta reatividade (anel epóxi) capaz de reticular as porções N-terminais e grupos laterais dos aminoácidos. E ainda apresenta a vantagem de não apresentar contaminantes tóxicos provenientes de síntese, como é o caso do PEG-$(CHO)_2$. Poliglicidil éteres são efetivos para reticular estruturas de pericárdio e enxertos vasculares, oferecendo boas propriedades mecânicas, maior resistência a degradação enzimática, redução da calcificação e menor citotoxicidade em relação ao glutaraldeído (Zeeman et al., 1999).

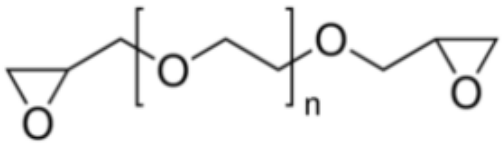


Figure 33. Estrutura do Diepoxi PEG.

4.4.1.2 Éster ativado de NHS

Ésteres ativados de NHS apresentam alta reatividade em relação a aminas nucleofílicas primárias e secundárias, formando ligações amida e imidas estáveis, respectivamente. Quando em presença de proteínas, esse reticulante tende a reagir inicialmente com as α-aminas das porções N-terminais e em seguida com as abundantes aminas presentes nos resíduos de lisina. Essa molécula homobifuncional é utilizada para conjugação de proteínas em análise de espectroscopia de massas (Kalkhof and Sinz, 2008) e como reticulante de materiais a base de colágeno para melhorar suas propriedades mecânicas e substituir o glutaraldeído por possuir menor citotoxicidade (Chen et al., 2011; Saito et al., 2004).

A síntese do ácido adípico ativado com NHA (NHS-AA) foi realizado de acordo com Chen e o mecanismo de reação foi proposto por Nakajima e Ikada (Nakajima and Ikada, 1995). A primeira etapa de reação é caracterizada pelo equilíbrio químico da protonação do EDC (**Figura 34.1**), seguido pelo ataque nucleofílico do carboxilato ao carbocátion, formando um intermediário instável (O-acilisoureia) (**Figura 34.2**). A O-acilisoureia, por sua vez, possui um bom grupo de partida, que facilita o ataque nucleofílico à carbonila (**Figura 34.3**), formando um intermediário tetraédrico, que sofre rearranjo, eliminando a ureia (**composto a**) e formando o éster de NHS (**composto b**).

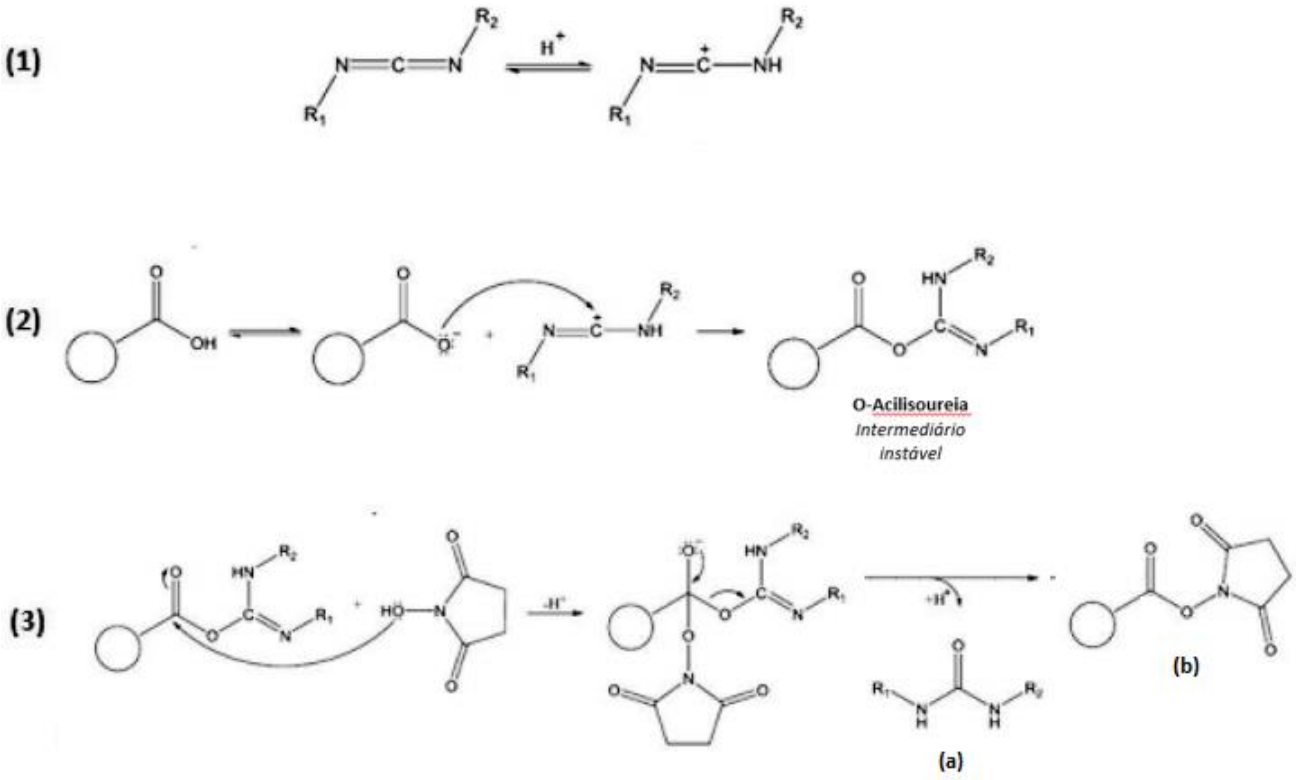


Figure 34. Mecanismo de reação da esterificação entre o ácido adípico com o NHS em presença de EDC. (1) Iniciado pela protonação do EDC, (2) ataque nucleofílico do carboxilato ao EDC, formando o intermediário instável (O-acilisoureia), (3) possibilitando o ataque nucleofílico na carbonila pelo NHS, formando uma ureia solúvel em água (**composto a**) e o éster ativado (**composto b**) (alterado de Watté, (Watté)).

Para verificar se a síntese ocorreu como desejado, foi feita a análise de IV para identificar os grupos funcionais da molécula. Na espectroscopia do infravermelho as bandas mais características do NHS, como estiramento simétrico e assimétrico da carbonila em 1793 cm^{-1} e 1739 cm^{-1}, respectivamente, podem ser observadas no espectro do NHS-AA (azul) da **Figura 35**. Além disso, é possível observar a típica banda de estiramento da carbonila do éster em 1815,04 cm^{-1}, sendo que as mesmas não foram encontradas no espectro do ácido adípico (laranja). Esses dados confirmam a efetiva funcionalização do ácido adípico e estão de acordo com estudos prévios realizados por Chen, Wang e Zu (Cheng et al., 2009; Wang et al., 2011; Zu et al., 2011). Outras bandas características do grupo succinimidil (Wang et al. 2011), presentes no espectro azul, estão listados na **Tabela 4**.

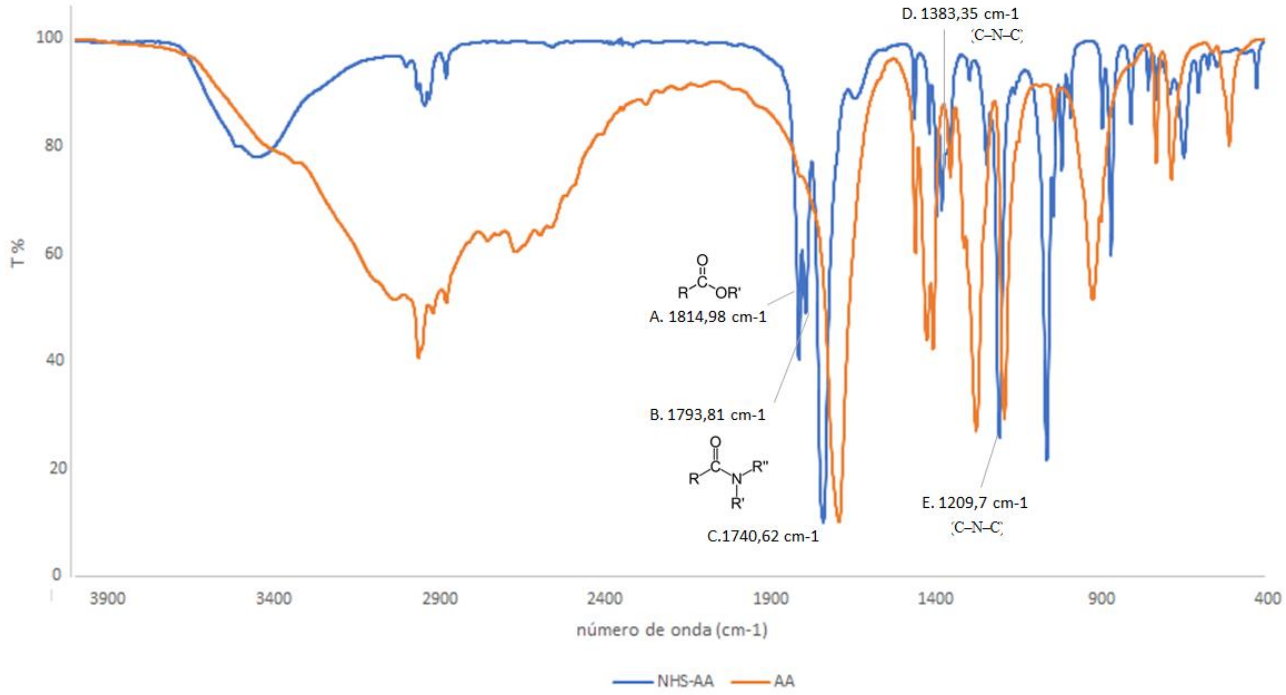


Figure 35. Comparação dos espectros de infravermelho do ácido adípico (AA) em laranja com o ativado de NHS em azul.

Código	Descrição da banda	Número de onda (cm^{-1})
A	Estiramento da carbonila – éster	1815
B	Estiramento simétrico da carbonila (NHS)	1793
C	Estiramento assimétrico da carbonila (NHS)	1738
D	Estiramento assimétrico N-O da succinamida	1628
E	Estiramento simétrico C-N-C (NHS)	1383
F	Estiramento assimétrico C-N-C (NHS)	1209
G	N-C-O (NHS)	1065

Tabela 4. Bandas características da funcionalização do ácido adípico com NHS.

Em seguida foi feito o espectro de RMN de hidrogênio, cuja atribuição encontra-se abaixo, para confirmação da estrutura do produto (**Figura 36**).

RMN atribuição para o NHS-AA ^{1}H RMN (300MHz, acetona, δ, ppm): 1,84-1,94 (m, 4H, C5); 2,04-2,09 (m, grupos metila da acetona); 2,1 (s, água); 2,68-2,8 (m, 4H, C4); 2,89 (s, 8H, C2).

Figure 36. Estrutura do NHS-AA.

Com base na distribuição dos sinais descritos acima, é possível perceber que o espectro (**Figura 37**) não apresentou um pico típico de hidrogênio ácido, o que significa que não há ácido adípico na amostra analisada. Além disso, há dois multipletos correspondentes a hidrogênios de cadeias carbônicas alifáticas (amarelo – C5) e hidrogênios de cadeias carbônicas com deslocamento devido à presença de grupos eletronegativos - éster (vermelho – C4). O singleto é correspondente aos hidrogênios de carbonos próximos a amidas – C2. A integração relativa dos hidrogênios presentes nos carbonos 2, 4 e 5 estão na proporção 2:1:1, respectivamente, confirmando a estrutura proposta na **Figura 36**.

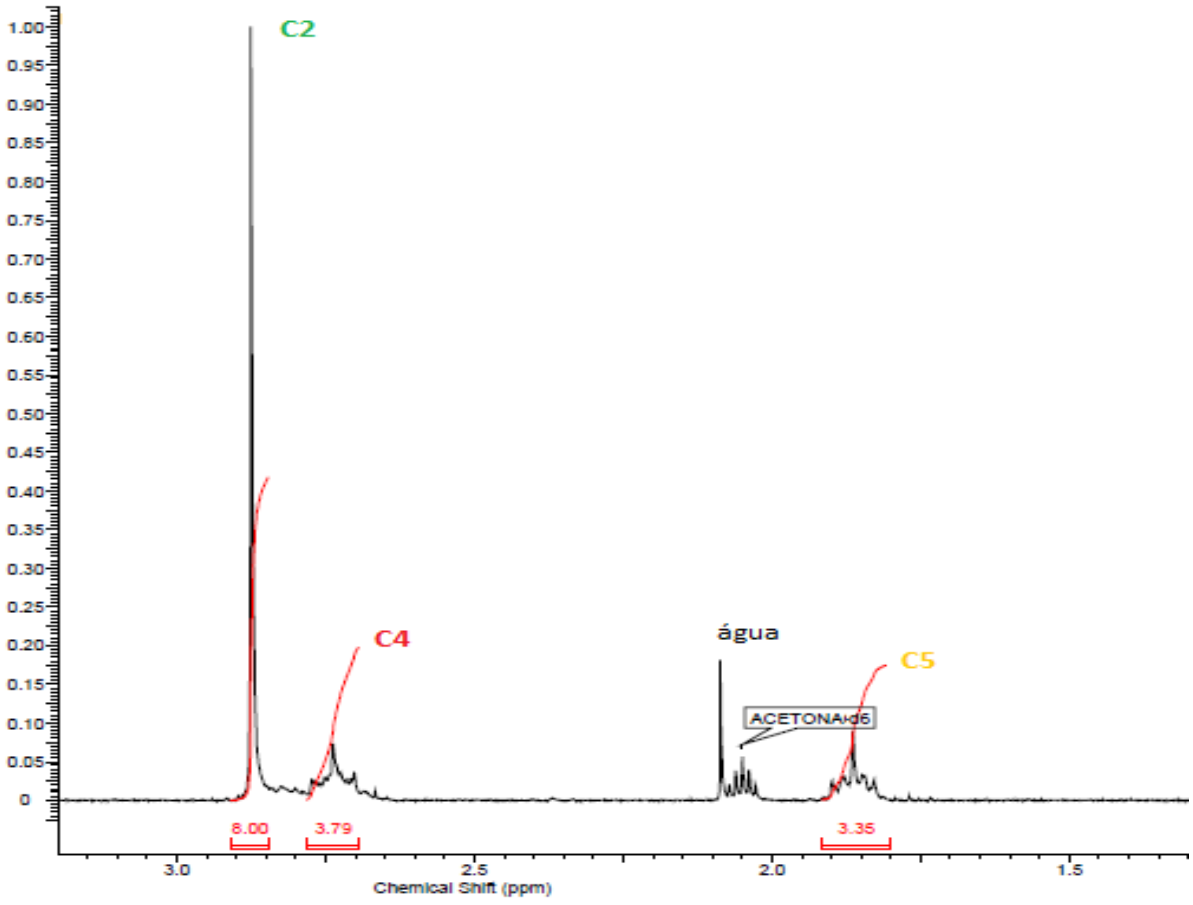


Figure 37. Espectro de 1H RMN do NHS-AA.

4.4.2 Análise de Gelificação

4.4.2.1 Reticulação dos Géis

Como observado nos estudos *in vitro*, o aumento da concentração de ECM digerida não leva à um aumento no processo de diferenciação, adesão e proliferação celular. Dessa forma, o material digerido foi misturado com de gelatina a fim de minimizar os efeitos danosos da alta concentração de peptídeos, e ainda atuar como suporte mecânico para o gel, uma vez que gelatina é constituída por uma mistura heterogênea de peptídeos de alta massa molecular derivadas da degradação parcial do colágeno (Djabourov et al., 1988).

A gelatina é produzida através da quebra dos pontos de reticulação entre as cadeias peptídicas, assim como a quebra da cadeia por hidrolise alcalina, ácida (Djabourov et al. 1988) ou atividade enzimática (Liu et al. 2015). Apesar de desnaturado, algumas estruturas típicas do colágeno estão preservadas na gelatina, como a presença de cadeias-α, β e γ, triplas helices, assim como sequência Gly-X-Y (X é geralmente um resíduo de prolina e Y uma hidróxiprolina) e a presença de MPT como hidroxiprolina e hidroxilisina (Baiguera et al., 2014; Duconseille et al., 2015; Liu et al., 2015). Dessa forma, existe a possibilidade dos sítios de ligação de integrinas (*collagen receptor integrin binding motif)* estarem preservados. Assim, a gelatina desempenharia um papel duplo: suporte e promoção de adesão celular.

A gelatina e a ECMp digerida foram misturadas em diferentes concentrações, em meio tamponado (pH 7,4) e então aquecidas a 50°C para possibilitar a completa solubilização do material. Imediatamente após retirada do banho maria, com a gelatina ainda líquida, foram adicionados os reticulantes (PEGDG, NHS-AA e glutaraldeído) em diferentes proporções (v/v). A solução foi deixada a temperatura ambiente para formação dos géis.

Em seguida foi analisado tempo de gelificação, como descrito na **Tabela 5** e as propriedades mecânicas dos géis.

Amostra	Reticulante	Concentração de Reticulante (v/v)	Tempo de gelificação
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	1%	< 1 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	5%	< 1 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	10%	< 1 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	20%	< 10 s
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	50%	< 10 s
80mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	100%	< 10 s
80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	1%	< 4 min

80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	5%	< 4 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	10%	< 4 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	20%	< 4 min
80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	50%	não gelifica – formação de material viscoso
80mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	100%	não gelifica – formação de material viscoso
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	1%	10 min - com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	5%	10 min – com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	10%	10 min – com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	20%	10 min– com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	50%	10 min – com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	100%	10 min – com precipitado branco
80mg de gelatina + 20mg de ECM	-	-	10 min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	1%	< 1min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	5%	< 1min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	10%	< 1min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	20%	< 10s
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	50%	< 10s
60mg de gelatina + 20mg de ECM	glutaraldeído	100%	< 10s
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	1%	< 5min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	5%	< 5min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	10%	< 5min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	20%	< 5min
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	50%	não gelifica – formação de material viscoso
60mg de gelatina + 20mg de ECM	PEGDG	100%	não gelifica – formação de material viscoso
60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	1%	15 min – com precipitado branco
60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	5%	15 min – com precipitado branco
60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	10%	15 min – com precipitado branco
60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	20%	15 min – com precipitado branco
60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	50%	15 min – com precipitado branco

60mg de gelatina + 20mg de ECM	NHS-AA	100%	15 min– com precipitado branco
60mg de gelatina + 20mg de ECM	-	-	15 min

Tabela 5. Resultado do tempo de gelificação para as diferentes amostras contendo gelatina e ECMp digerida, assim como o tipo de reticulante utilizado e sua concentração em solução.

Como observado na **Tabela 5**, o tempo de gelificação é dependente da concentração de gelatina e tipo de reticulante utilizado. O glutaraldeído promoveu uma gelificação mais rápida (na ordem de segundos) que o PEGDG (na ordem de minutos), seguido pelo NHS-AA, que, por sua vez, apresenta tempo de gelificação igual ao material sem reticulante.

O glutaraldeído pode reagir com diversos grupos funcionais de peptídeos, seguindo a ordem: ε-amina, α-amina, guanidil, aminas secundárias e hidroxilas. Entretanto, quando trata-se da reticulação de proteínas, geralmente implica-se na reação do glutaraldeído com ε-amina do resíduo de lisina, através da formação de uma base de Schiff, devido a fácil acessibilidade ao grupo, presença na superfície da proteína (Migneault et al., 2004).

De acordo com Whipple e Ruta, e Ruijgrok, soluções aquosas de glutaradeído (25%) estão em equilíbrio químico entre o aldeído livre, hemihidrato, dihidrato, hemiacetal cíclico e diversos outros polímeros insaturados, sendo que apenas 4% dessa mistura corresponde ao aldeído livre. Todavia, o glutaraldeído livre reage rapidamente e de forma irreversível com grupos amino. Dessa forma, é possível afirmar que a reação de formação da base de Schiff está competindo com a hidratação do glutaraldeído. Porém, a partir do momento que ocorre a formação de um composto de maior estabilidade (base de Schiff), a reação é descolada para a formação do glutaraldeído livre para novos sítios de reticulação (Ruijgrok et al., 1994; Whipple and Ruta, 1974). Apesar da presença de reações paralelas, o glutaraldeído já foi utilizado com sucesso para a reticulação de materiais derivados de colágeno (Harriger et al., 1997; Olde Damink et al., 1995; Ruijgrok et al., 1994).

Assim como o glutaraldeído, o PEGDG pode reagir com as aminas primarias dos peptídeos (**Figura 38**), com a água (solvente), ou até mesmo com ele próprio (**Figura 39**). Diferentemente do glutaraldeído, a reação do PEGDG com a água não é um equilíbrio químico. Apesar do grupo de partida ser um alcoóxido, a tensão no anel (60° entre os átomos) o torna altamente reativo. Dessa forma o ataque nucleofílico da água, que é menos impedida que os peptídeos e está em maior concentração, promove a abertura do anel e a restauração do tetraedro de 109°. Além disso, o PEGDG é adicionado puro na solução. Por esse motivo é possível

que a abertura do anel por um nucleófilo qualquer resulte na formação do alcoóxico, que pode reagir com outro anel de uma cadeia próxima, ou intramolecular.

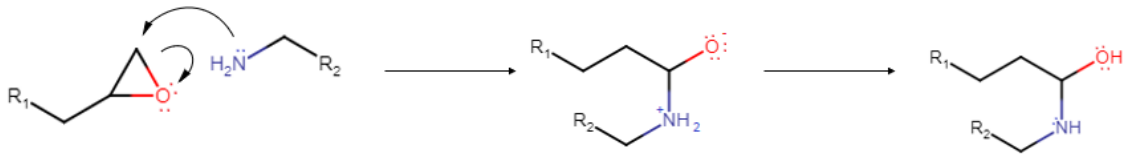


Figure 38. Mecanismo de reação para reticulação entre as porções N-terminais dos peptídeos e o PEGDG, através de Sn2 no carbono menos impedido, promovendo abertura do anel epóxido, seguido de protonação do oxigênio, formando o aminoálcool.

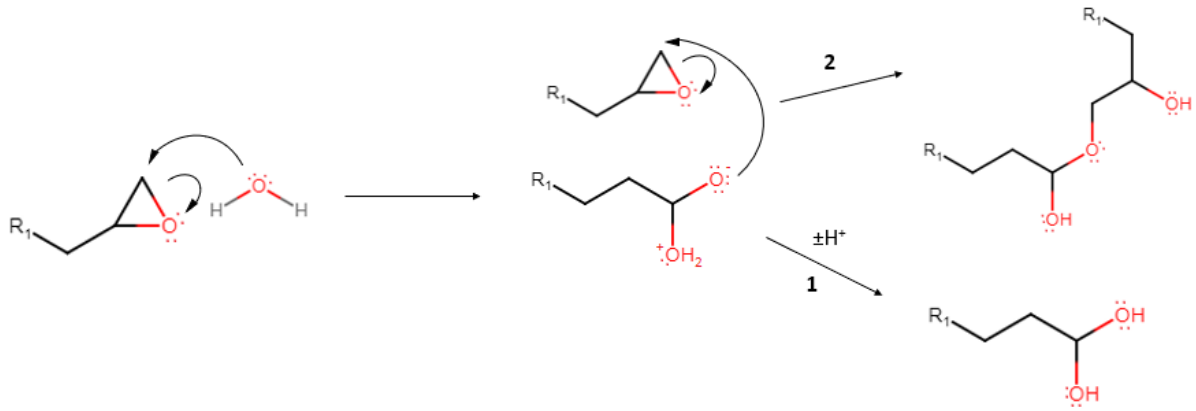


Figure 39. Mecanismo de reação de abertura de anel do PEGDG através de atáque nucleofílico da água por Sn2 no carbono menos impedido. Podendo formar um (1) acetal ou (2) promovendo uma reação em cadeia de abertura de anel entre moléculas de PEGDG ou intramolecular.

Em estudos anteriores realizados com o 1,4-butanediol diglicidil éter (BDDGE), mostraram que a reação de reticulação com colágeno apresentou mecanismos diferentes à medida que o pH foi alterado. Em condições alcalinas (pH 8-10) a reação ocorreu envolvendo o anel epóxi e amino grupos presentes em resíduos de lisina. Todavia, em condições ácidas (pH 4-6) os ácidos carboxílicos (resíduos de ácido aspártico e glutâmico) foram alvo da reticulação. A diferença nas condições reacionais resultou em materiais com propriedades diferentes: materiais rígidos e apresentando resistência a degradação enzimática foram observados em alto pH, enquanto maior força tensil e resistência a elongação foram encontrados em materiais produzidos em pH ácido (Zeeman et al., 1999).

O BDDGE apresenta cinética lenta de reticulação com aminogrupos (37°C em pH 8,5 – 10,5), próxima de 24h. Além disso, foi observado que após a reação de um anel epóxi, a reação do segundo torna-se dependente da disponibilidade de um grupo amino próximo, devido ao

espaçamento entre as terminações reativas (Zeeman et al., 2000). Considerando a semelhança estrutural entre BDDGE e PEGDG, infere-se que a cinética de reação também seja lenta. Entretanto, devido a maior distância entre os anéis, a probabilidade desse reagir com uma amina se torna maior.

O NHS-AA reage com nucleófilos, liberando NHS e formando, preferencialmente, ligações amidas ou imidas, com aminas primarias (**Figura 40**) ou secundarias. Podendo também reagir com resíduos de serina e tirosina. Entretanto, NHS-AA apresenta a cinética de hidrólise em pH fisiológico na ordem de horas (0°C em pH 7 a meia vida é de 4-5h (Lomant and Fairbanks, 1976), diminuindo para poucos minutos quando em pH alcalino (4°C em pH 8,6 a meia vida é de 10min (Cuatrecasas and Parikh, 1972)). Dessa forma, sugere-se que a reação seja realizada em solução concentrada de proteína e com excesso de 100 a 200 molar do reticulante durante 90 min e 45 min, respectivamente (Kalkhof and Sinz, 2008).

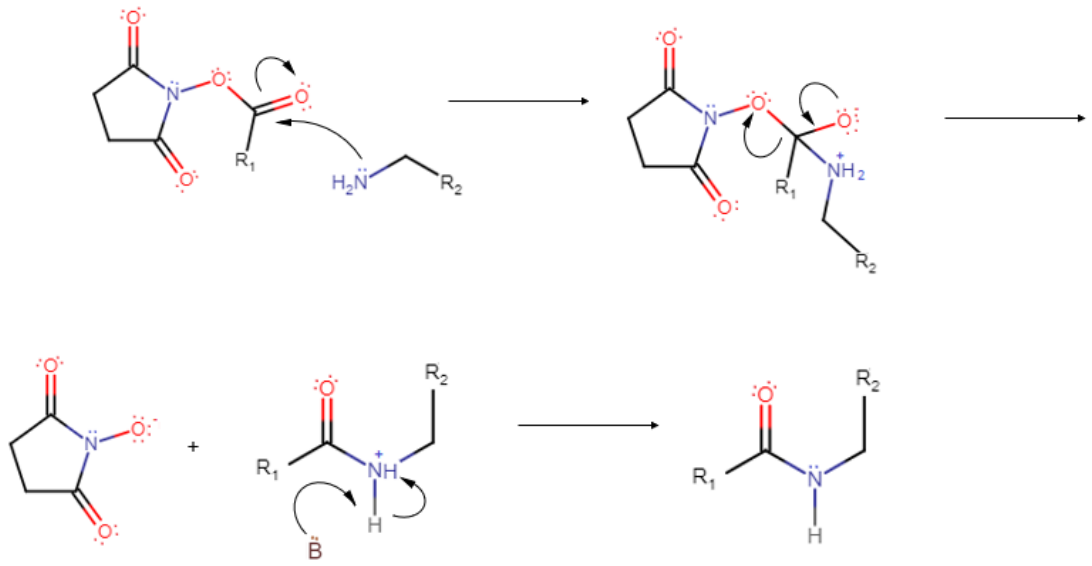


Figure 40. Mecanismo de reação para reticulação entre as porções N-terminais dos peptídeos e o NHS-AA. O éster ativado sofre substituição nucleofílica na carbonila, formando um intermediário tetraédrico, que é rearranjado, eliminando o NHS e formando a amida final.

O objetivo do projeto é criar um material que seja injetável e que possua gelificação *in situ*. Dessa forma, uma reação que leva pelo menos 45 min é inviável. Além disso, devido ao baixo tempo de meia vida do NHS-AA em soluções aquosas, a literatura sugere o armazenar o material em forma de solução em DMF, DMSO, acetona ou dioxano, solventes orgânicos citotóxicos que não podem ser injetados (Hermanson, 2013). Levando assim a inviabilidade do uso do NHS-AA.

Outro fator que levou que redução da cinética de reticulação, foi a dependência do pH. A reação foi realizada em pH fisiológico, devido a aplicação escolhida, entretanto o pK das porções N-terminais, assim como das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, estão acima de 9. Substituindo esses valores na equação de *Henderson – Hasselbalch*, temos que menos de 2,5% dos grupos nucleofíicos estão desprotonados e reativos.

Devido ao tempo de gelificação do material puro e do reticulado com NHS-AA ser igual (como observado na **Tabela 5**), acredita-se que eles foram formados apenas pelas propriedades de gelificação da gelatina e não por reticulação. A gelificação ocorre por um processo físico, dependente da concentração de gelatina, força iônica da solução, tamanho das cadeias e variação de temperatura. Aquecendo a gelatina a 40 - 50°C, as ligações intermoleculares que estabilizam as cadeias peptídicas são quebradas (ligações de hidrogênio principalmente), assim a estrutura tripla hélice é desestabilizada e assume a conformação de *coil-coiled* (solúvel). Entretanto, ao resfriar a solução, ocorre a associação de cadeias, levando ao reestabelecimento da conformação tridimensional da tripla-hélice e formação do gel (Djabourov et al., 1988).

Para os ensaios de reologia foram escolhidas as amostras com 20% de reticulante em solução, uma vez que maiores concentrações inibem a gelificação (PEGDG) ou não diminuem o tempo de reação (glutaraldeído).

4.4.3 Reologia

Inicialmente, os ensaios de reologia seriam realizados a 37°C, uma vez que o gel deve ter a capacidade de gelificar *in situ* no corpo humano. Entretanto, quando submetido a aquecimento, a amostras sem reticulação e reticuladas com NHS-AA e PEGDG perderam a estrutura de gel e tornaram-se um líquido viscoso, comprovando a teoria de que a reticulação com essas duas moléculas foram pouco eficientes comparado com glutaraldeído, dependendo majoritariamente das propriedades físicas da gelatina.

Por motivos de limitação da técnica, os materiais viscosos (37°C) não foram capazes de serem analisado no reômetro. Por esse motivo, o experimento foi realizado a 25°C, para determinar se os géis formados apresentam características mecânicas distintas e se eles podem ser reposicionados para outros usos.

4.4.3.1 Varredura de Amplitude

Ensaios de varredura de amplitude são necessários para determinar o limite da região linear de viscoelasticidade (LVE), ou seja, o intervalo no qual o experimento pode ser realizado sem que a estrutura do material seja comprometida. Para isso é analisado, preferencialmente,

a curva G' (módulo de armazenamento) e delimitado o intervalo no qual seu valor é constante. Os gráficos estão presentes no **Anexo XVII** e os valores de tensão selecionados para realização dos experimentos de varredura de frequência estão presentes na **Tabela 6**.

Amostra (medidas para 1mL de solução)	LVE (Pa)	Tensão τ (Pa) selecionado
80mg de gelatina + 20mg de ECM	6,4	1
80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com glutaraldeído	200	10
80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com NHS-AA	14,75	1
80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com PEGDG	19	1
60mg de gelatina + 20mg de ECM	3,24	1
60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com glutaraldeído	51,07	1
60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com NHS-AA	5,68	1
60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com PEGDG	8,77	1

Tabela 6. Valores de tensão observados para o limite da região linear de viscoelasticidade (LVE), assim como os valores de tensão selecionados para os experimentos de varredura de frequência.

Observou-se características de sólidos viscoelásticos em todos os gráficos presentes no **Anexo XVII**, uma vez que G' > G'' ao longo do início da análise. Além disso, observando a curva G´, verificou-se que a resistência do gel é diretamente proporcional a concentração de gelatina na amostra (amostras com 80mg/mL de gelatina apresentou LVE = 6,4Pa, enquanto com 60mg/mL, apresentou LVE de 3,24) e que, assim como esperado, a adição de reticulante promoveu um aumento na resistência ao material a tensão. Notou-se também que após LVE, há uma queda brusca na curva G', sugerindo um comportamento de fratura brusca na estrutura tridimensional do gel, ou seja, ele não quebra homogeneamente por toda a extensão do material, mas em grandes blocos.

Com exceção dos géis reticulado com glutaraldeído, nas quais as curvas G' e G'' permanecem constantes e paralelas por quase toda a extensão do gráfico, notou-se que para as outras amostras, a curva G'' (módulo de perda) apresentou um aumento após LVE, seguido por cruzamento com a curva G' (G' = G'', ponto de escoamento). G'' representa a capacidade do material de dissipar energia, dessa forma antes do colapso do gel e início do seu escoamento (G' = G''), algumas ligações química e físicas são quebradas, mas ainda sim mantendo a estrutura

geral do material (aumento de G'', mas permanecendo menor que G'), até o ponto em que as pequenas fraturas se estendem por todo material, provocando seu escoamento (G'' > G').

4.4.3.2 Varredura de Frequência

Ensaios de varredura de frequência tem como objetivo descrever o comportamento mecânicos do material em relação ao tempo sob uma tensão não disruptiva (dentro da LVE). Altas frequências simulam movimentos rápidos em um curto período. Baixas frequências simulam repouso ou movimentos lentos realizados em um longo período.

Através desse experimento é possível classificar o material em gel forte e gel fraco. Um gel forte apresenta um espectro contendo as curvas de G' e G'' (em função da frequência) praticamente horizontais (funções não dependentes da frequência), com um ligeiro aumento de ambas em altas frequências, e G' tipicamente maior que G'' (G''/G' < 0,01) (Lapasin and Pricl, 1995). As amostras reticuladas com glutaraldeído apresentam esse perfil, como observado no **Anexo XVIII**.

Géis fracos, por sua vez, apresentam ligeira dependência em relação a frequência, com G' sempre maior que G'' e não apresentam o característico platô newtoniano em baixas frequências. Isso ocorre devido a uma heterogeneidade na associação das cadeias poliméricas, resultando em uma estrutura tridimensional com níveis de integração de tamanhos e força diferentes (Lapasin and Pricl, 1995). Dessa forma, géis fracos apresentam propriedades reológicas intermediárias a soluções e géis fortes. Sob baixo estresse, eles possuem características de géis fortes, entretanto com o aumento do estresse, a estrutura 3D é progressivamente quebrada, ganhando a capacidade de escoar (Rosalina and Bhattacharya, 2002).

As amostras de gelatina com ECM não reticuladas, assim como a reticuladas com NHS-AA e PEGDG são géis fracos. Além disso, notou-se que as amostras reticuladas apresentam menor interferência da frequência em relação as não reticuladas. Além disso, PEGDG mostrou-se mais eficiente em reduzir a influência da frequência em relação a NHS-AA. Dessa forma, sugere-se que a homogeneidade e eficiência da reticulação não é igual entre as moléculas testadas, sendo glutaraldeído > PEGDG > NHS-AA.

5. Conclusões

A busca por matérias que auxiliem na reparação tecidual ainda é um desafio para comunidade científica. Diversos produtos que estão disponíveis ou em estudo atualmente ainda não são capazes de mimetizar a morfologia bioquímica do tecido, devido a sua composição majoritariamente sintética. Por esse motivo, novas abordagens foram iniciadas, utilizando material biológico de origem animal ou cultura celular *in vitro*. Entretanto, apesar de apresentarem bons resultados bioindutivos, eles falhavam na reprodução da estrutura mecânica organizada presente na ECM, sendo essa uma característica crucial para simular o tecido e influenciar positivamente a resposta do hospedeiro.

Finalmente, foi verificado que o método de aplicação de suportes rígidos de ECM pode causar mais danos que benefícios ao paciente, devido a agressão tecidual proveniente da aplicação invasiva, levando a sua inviabilidade clínica. Frente a esse desafio, foram criados materiais alternativos, passivos de serem injetados, como pós e géis (Badylak, 2007). Todavia, essa nova proposta de material apresentou rápida taxa de biodegradação e baixa resistência mecânica dos materiais (Ma et al., 2004; Seif-Naraghi et al., 2010a, 2010b, 2013).

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um gel injetável, com propriedades bioindutivas provenientes da gelatina e de ECM digerida enzimaticamente, assim como mecânicas, derivadas da reestruturação desse material através da reação com reticulantes bifuncionais. Além disso, buscava-se um processo de gelificação rápida e *in situ*.

Tendo isso em vista, dois métodos de digestão foram realizados (digestão contínua e em etapas), procurando otimizar a capacidade bioindutiva do material, buscando formas alternativas de solubilizar as proteínas presentes na ECM, sem, no entanto, degradá-las a ponto de perder sua função.

Notou-se que a digestão em etapas se mostrou mais eficiente na preservação de ligações peptídicas, quantidade de GAGs em solução e estruturas secundárias de proteínas. Paralelamente, células mesenquimais de medula óssea incubadas com 5µg/mL de digeridos em etapas apresentaram taxas de diferenciação superiores em relação a digestão contínua. Para digeridos de tripsina e colagenase, as células apresentam maior atividade de ALP após 14 dias de incubação e maior mineralização após 21 dias, sugerindo ambas promoveram diferenciação da BMMSC a osteoblasto, assim como sua maturação. Pepsina foi a exceção, apesar do digerido em etapas também promover maior atividade da ALP no dia 14, a mesma permaneceu constante no dia 21, sugerindo que não houve maturação final do pré-osteoblasto. Além disso, a taxa de mineralização apresentou-se menor que das outras enzimas e igual entre os tratamentos.

Entretanto, para os testes de adesão, o tratamento contínuo mostra-se mais eficiente para tripsina e colagenase, e igual entre os tratamentos para pepsina. Para proliferação, o tratamento em etapas mostra-se mais eficiente nos primeiros 5 dias de experimento, sendo substituído pelo tratamento contínuo após 8 dias de incubação e promovendo "desadesão" (descolamento) celular a partir do dia 15. Dessa forma, é possível afirmar que a digestão em etapas é capaz de preservar mais estruturas ativas que a digestão contínua, mas isso não necessariamente significa que será mais eficiente para todos os processos celulares envolvidos na regeneração tecidual. Diferentemente, o tipo de protease empregada tende a mostrar um padrão de eficiência entre os diferentes experimentos realizados, sendo tripsina mais eficiente, seguida por colagenase e depois pepsina. Entretanto, estudos proteômicos dos componentes intracelulares são necessários para compreender como o material está ativando ou inibindo vias metabólicas das BMMSCs, assim como do conteúdo secretado, para verificação de quais fatores estão sendo liberados no meio e como eles influenciam o microambiente ao seu redor.

Apesar do foco do projeto ser o desenvolvimento de um material para modelo ósseo, a análise proteômica das ECMs mostram que elas podem apresentar resposta na diferenciação de células mesenquimais em outros tipos de tecido, como tecido adiposo, cardíaco e possivelmente células do epitélio, devido a uma rica diversidade de proteínas sinalizadoras presentes. Entretanto, como as matrizes estudadas são de origem comercial e não tivemos acesso ao processo de desceluarização empregado, existe a possibilidade de que a produção de nossas próprias ECM descelularizadas levem a uma menor perda de proteínas indutoras.

Como observado, o processo de gelificação, assim como a robustez mecânica do material é dependente da concentração de proteína e do tipo de reticulante utilizado. Apesar de não termos obtido sucesso com NHS-AA e PEGDG, a reticulação com glutaraldeído sugere que a reticulação química é uma alternativa viável para preservar o gel a temperatura corporal, assim como torna-lo mais resistente e reduzir o tempo de gelificação de 15 min para segundos, possibilitando a injeção e gelificação *in situ*.

Com isso obtivemos o delineamento de um material altamente personalizável, capaz de apresentar diferentes propriedades mecânicas de acordo com a aplicação na qual ele será empregado, através da alteração da concentração de proteínas e do tipo de reticulante. Além disso, ele pode apresentar uma composição bioindutiva variada, através da alteração da ECM utilizada, da enzima digestiva e do tipo de digestão.

6. Referências

Acevedo-Jake, A.M., Ngo, D.H., and Hartgerink, J.D. (2017). Control of collagen triple helix stability by phosphorylation. Biomacromolecules *18*, 1157–1161.

Ai-Aql, Z.S., Alagl, A.S., Graves, D.T., Gerstenfeld, L.C., and Einhorn, T.A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J. Dent. Res. *87*, 107–118.

Akiyama, K., You, Y.-O., Yamaza, T., Chen, C., Tang, L., Jin, Y., Chen, X.-D., Gronthos, S., and Shi, S. (2012). Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. Stem Cell Res Ther *3*, 40.

Alberts, B. (2008). Molecular biology of the cell (New York: Garland Science).

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 25, 25–29.

Badylak, S.F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials *28*, 3587–3593.

Badylak, S.F., Freytes, D.O., and Gilbert, T.W. (2015). Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomater. *23 Suppl*, S17–26.

Banerjee, C., McCabe, L.R., Choi, J.Y., Hiebert, S.W., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (1997). Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. J. Cell Biochem. *66*, 1–8.

Bengtsson, E., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegård, D., and Aspberg, A. (2002). The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. J. Biol. Chem. *277*, 15061–15068.

Berg, R.A., and Prockop, D.J. (1973). The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. *52*, 115–120.

Birmingham, E., Niebur, G.L., McHugh, P.E., Shaw, G., Barry, F.P., and McNamara, L.M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. Eur Cell Mater *23*, 13–27.

Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. Biochem. J. *348 Pt 2*, 241–255.

Bodian, D.L., Madhan, B., Brodsky, B., and Klein, T.E. (2008). Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. Biochemistry *47*, 5424–5432.

Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 786–801.

Brown, S.R., Cleveland, E.M., Deeken, C.R., Huitron, S.S., Aluka, K.J., and Davis, K.G. (2017). Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients. J. Surg. Res. *207*, 229–234.

Byron, A., Humphries, J.D., and Humphries, M.J. (2013). Defining the extracellular matrix using proteomics. Int J Exp Pathol *94*, 75–92.

Cao, H.-M., Ye, X.-P., Ma, J.-H., Jiang, H., Li, S.-X., Li, R.-Y., Li, X.-S., Guo, C.-C., Wang, Z.-Q., Zhan, M., et al. (2015). Mimecan, a hormone abundantly expressed in adipose tissue, reduced food intake independently of leptin signaling. EBioMedicine *2*, 1718–1724.

Chen, Y., Zhang, M., Liu, W., and Li, G. (2011). Properties of alkali-solubilized collagen solution crosslinked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid. Korea-Aust. Rheol. J. *23*, 41–48.

Corey, E.J., and Kim, C.U. (1972). A New and Highly Effective Method for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds. J. Am. Chem. Soc. *94*, 7586 – 7587.

Cox, J., Hein, M.Y., Luber, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol. Cell Proteomics *13*, 2513–2526.

Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials *32*, 3233–3243.

Cuatrecasas, P., and Parikh, I. (1972). Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. Biochemistry *11*, 2291–2299.

Daley, W.P., Peters, S.B., and Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. J. Cell Sci. *121*, 255–264.

DeQuach, J.A., Lin, J.E., Cam, C., Hu, D., Salvatore, M.A., Sheikh, F., and Christman, K.L. (2012). Injectable skeletal muscle matrix hydrogel promotes neovascularization and muscle cell infiltration in a hindlimb ischemia model. Eur Cell Mater *23*, 400–12; discussion 412.

Djabourov, M., Leblond, J., and Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. J. Phys. France *49*, 319–332.

Duan, L., Liu, W., Tian, Z., Li, C., and Li, G. (2014). Properties of collagen gels cross-linked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid deriviate. Int. J. Biol. Macromol. *69*, 482–488.

Evans, N.D., Swain, R.J., Gentleman, E., Gentleman, M.M., and Stevens, M.M. (2012). Gene-Expression Analysis Reveals That Embryonic Stem Cells Cultured Under Osteogenic Conditions Produce Mineral Non-. *24*, 211–223.

Fanganiello, R.D., Ishiy, F.A.A., Kobayashi, G.S., Alvizi, L., Sunaga, D.Y., and Passos-Bueno, M.R. (2015). Increased In Vitro Osteopotential in SHED Associated with Higher IGF2 Expression When Compared with hASCs. Stem Cell Rev *11*, 635–644.

Flores, I.L., Kawahara, R., Miguel, M.C.C., Granato, D.C., Domingues, R.R., Macedo, C.C.S., Carnielli, C.M., Yokoo, S., Rodrigues, P.C., Monteiro, B.V.B., et al. (2016). EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. Clin. Sci. *130*, 785–799.

Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F. (2006). Decellularization of tissues and organs. Biomaterials *27*, 3675–3683.

Gruskin, E., Doll, B.A., Futrell, F.W., Schmitz, J.P., and Hollinger, J.O. (2012). Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. Adv. Drug Deliv. Rev. *64*, 1063–1077.

Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell *84*, 345–357.

Haag, T., Herkt, C.E., Walesch, S.K., Richter, A.M., and Dammann, R.H. (2014). The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms. Genes Cancer *5*, 365–374.

Harris, J.M., Struck, E.C., Case, M.G., Paley, M.S., Yalpani, M., Van Alstine, J.M., and Brooks, D.E. (1984). Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. *22*, 341–352.

Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E., and Gundberg, C.M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol. Rev. *69*, 990–1047.

Henrique, D., and Schweisguth, F. (2003). Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. Curr. Opin. Genet. Dev. *13*, 341–350.

Hermanson, G.T. (2013). Homobifunctional Crosslinkers. In Bioconjugate Techniques, (Elsevier), pp. 275–298.

Higuchi, A., Ling, Q.-D., Hsu, S.-T., and Umezawa, A. (2012). Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. Chem. Rev. *112*, 4507–4540.

Hoshiba, T., Chen, G., Endo, C., Maruyama, H., Wakui, M., Nemoto, E., Kawazoe, N., and Tanaka, M. (2016). Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. Stem Cells Int. *2016*, 6397820.

Jan, A.T., Lee, E.J., and Choi, I. (2016). Fibromodulin: A regulatory molecule maintaining cellular architecture for normal cellular function. Int. J. Biochem. Cell Biol. *80*, 66–70.

Kalkhof, S., and Sinz, A. (2008). Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. Anal. Bioanal. Chem. *392*, 305–312.

Kawai, M. (2013). Adipose tissue and bone: role of PPARγ in adipogenesis and osteogenesis. Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. *15*, 105–113.

Khor, E. (1997). Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. Biomaterials *18*, 95–105.

Kim, S.W., Muise, A.M., Lyons, P.J., and Ro, H.S. (2001). Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. J. Biol. Chem. *276*, 10199–10206.

Klees, R.F., Salasznyk, R.M., Kingsley, K., Williams, W.A., Boskey, A., and Plopper, G.E. (2005). Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. Mol. Biol. Cell *16*, 881–890.

Komarova, S.V., Safranek, L., Gopalakrishnan, J., Ou, M.-J.Y., McKee, M.D., Murshed, M., Rauch, F., and Zuhr, E. (2015). Mathematical model for bone mineralization. Front. Cell Dev. Biol. *3*, 51.

Kramer, Ij.M. (2016). Protein kinase C in oncogenic transformation and cell polarity. In Signal Transduction, (Elsevier), pp. 529–588.

Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.-H., and Trajanoski, Z. (2007). Gene expression profiling of human

mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. BMC Genomics *8*, 70.

Lampe, A.K., and Bushby, K.M.D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. J. Med. Genet. *42*, 673–685.

Langenbach, F., and Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. Stem Cell Res Ther *4*, 117.

Lapasin, R., and Pricl, S. (1995). Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications (Boston, MA: Springer US).

Lee, E.J., Nam, J.H., and Choi, I. (2018). Fibromodulin modulates myoblast differentiation by controlling calcium channel. Biochem. Biophys. Res. Commun. *503*, 580–585.

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A., and Komori, T. (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J. Cell Biol. *155*, 157–166.

Liu, X.Y., Nothias, J.-M., Scavone, A., Garfinkel, M., and Millis, J.M. (2010). Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-L-lysine for islet encapsulation. ASAIO J *56*, 241–245.

Lo, R.S., Wotton, D., and Massagué, J. (2001). Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. EMBO J. *20*, 128–136.

Lomant, A.J., and Fairbanks, G. (1976). Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). J. Mol. Biol. *104*, 243–261.

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., and Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials *25*, 2997–3004.

Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. Bioinformatics *21*, 3448–3449.

Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani, Y., Fukuda, T., Oguri, Y., et al. (2008). Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 12849–12854.

Melhuish, T.A., Gallo, C.M., and Wotton, D. (2001). TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription. J. Biol. Chem. *276*, 32109–32114.

Melixetian, M., Klein, D.K., Sørensen, C.S., and Helin, K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. Nat. Cell Biol. *11*, 1247–1253.

Miron, R.J., and Zhang, Y.F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. J. Dent. Res. *91*, 736–744.

Moriguchi, T., Yano, K., Nakagawa, S., and Kaji, F. (2003). Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. J. Colloid Interface Sci. *260*, 19–25.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrugghe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell *108*, 17–29.

Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., and Uehara, Y. (2002). Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. J. Biol. Chem. *277*, 39655–39665.

Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., van Luyn, M.J., van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., and Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials *17*, 765–773.

Perumal, S., Antipova, O., and Orgel, J.P.R.O. (2008). Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *105*, 2824–2829.

Puchtler, H., Meloan, S.N., and Terry, M.S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. J. Histochem. Cytochem. *17*, 110–124.

Qadir, M.I., Parveen, A., and Ali, M. (2015). Cdc42: role in cancer management. Chem Biol Drug Des *86*, 432–439.

Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel) *12*, 12347–12360.

Rao Pattabhi, S., Martinez, J.S., and Keller, T.C.S. (2014). Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. Differentiation. *88*, 131–143.

Rault, I., Frei, V., Herbage, D., Abdul-Malak, N., and Huc, A. (1996). Evaluation of different chemical methods for cros-linking collagen gel, films and sponges. Journal of Materials Science: Materials in Medicine *7*, 215–221.

Reing, J.E., Zhang, L., Myers-Irvin, J., Cordero, K.E., Freytes, D.O., Heber-Katz, E., Bedelbaeva, K., McIntosh, D., Dewilde, A., Braunhut, S.J., et al. (2009). Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. Tissue Eng. Part A *15*, 605–614.

Rosalina, I., and Bhattacharya, M. (2002). Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. Carbohydr. Polym. *48*, 191–202.

Ruggiero, S., Cosgarea, R., Potempa, J., Potempa, B., Eick, S., and Chiquet, M. (2013). Cleavage of extracellular matrix in periodontitis: gingipains differentially affect cell adhesion activities of fibronectin and tenascin-C. Biochim. Biophys. Acta *1832*, 517–526.

Russo, V., Omidi, E., Samani, A., Hamilton, A., and Flynn, L.E. (2015). Porous, Ventricular Extracellular Matrix-Derived Foams as a Platform for Cardiac Cell Culture. Biores. Open Access *4*, 374–388.

Salasznyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., and Plopper, G.E. (2004). Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Biomed. Biotechnol. *2004*, 24–34.

Samiric, T., Parkinson, J., Ilic, M.Z., Cook, J., Feller, J.A., and Handley, C.J. (2009). Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. Matrix Biol *28*, 230–236.

Scott, J.E. (1996). Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. Biochemistry *35*, 8795–8799.

Seif-Naraghi, S., Singelyn, J., Dequach, J., Schup-Magoffin, P., and Christman, K. (2010a). Fabrication of biologically derived injectable materials for myocardial tissue engineering. J. Vis. Exp.

Seif-Naraghi, S.B., Salvatore, M.A., Schup-Magoffin, P.J., Hu, D.P., and Christman, K.L. (2010b). Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. Tissue Eng. Part A *16*, 2017–2027.

Seif-Naraghi, S.B., Singelyn, J.M., Salvatore, M.A., Osborn, K.G., Wang, J.J., Sampat, U., Kwan, O.L., Strachan, G.M., Wong, J., Schup-Magoffin, P.J., et al. (2013). Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. Sci. Transl. Med. *5*, 173ra25.

Seo, B.M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuiri, T., Akiyama, K., Lee, J.S., and Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Dis *14*, 428–434.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. *13*, 2498–2504.

Sipilä, K.H., Drushinin, K., Rappu, P., Jokinen, J., Salminen, T.A., Salo, A.M., Käpylä, J., Myllyharju, J., and Heino, J. (2018). Proline hydroxylation in collagen supports integrin binding by two distinct mechanisms. J. Biol. Chem. *293*, 7645–7658.

Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., and Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics *27*, 431–432.

Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., and Tobin, G.R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. The American Journal of Surgery *176*, 26S–38S.

Stoward, P.J. (1966). Some comments on the mechanism of the schiff reaction. Journal of Histochemistry & Cytochemistry *14*, 681–683.

Stumpf, M., Cao, W., Klinge, U., Klosterhalfen, B., Kasperk, R., and Schumpelick, V. (2001). Increased distribution of collagen type III and reduced expression of matrix metalloproteinase 1 in patients with diverticular disease. Int J Colorectal Dis *16*, 271–275.

Sun, W.Q., Xu, H., Sandor, M., and Lombardi, J. (2013). Process-induced extracellular matrix alterations affect the mechanisms of soft tissue repair and regeneration. J. Tissue Eng. *4*, 2041731413505305.

Svensson, L., Närlid, I., and Oldberg, A. (2000). Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. FEBS Lett. *470*, 178–182.

Takawale, A., Sakamuri, S.S.V.P., and Kassiri, Z. (2015). Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology. Compr. Physiol. *5*, 687–719.

Tanaka, K., Matsumoto, E., Higashimaki, Y., Katagiri, T., Sugimoto, T., Seino, S., and Kaji, H. (2012). Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. J. Biol. Chem. *287*, 11616–11628.

Tasheva, E.S., Ke, A., Deng, Y., Jun, C., Takemoto, L.J., Koester, A., and Conrad, G.W. (2004). Differentially expressed genes in the lens of mimecan-null mice. Mol. Vis. *10*, 403–416.

Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R.Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T., and Arner, E. (2000). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. J. Biol. Chem. *275*, 25791–25797.

Vora, S.R., Guo, Y., Stephens, D.N., Salih, E., Vu, E.D., Kirsch, K.H., Sonenshein, G.E., and Trackman, P.C. (2010). Characterization of recombinant lysyl oxidase propeptide. Biochemistry *49*, 2962–2972.

Wang, J.C., Alanay, A., Mark, D., Kanim, L.E.A., Campbell, P.A., Dawson, E.G., and Lieberman, J.R. (2007). A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. Eur. Spine J. *16*, 1233–1240.

Weis, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.-J., and Eyre, D.R. (2010). Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. J. Biol. Chem. *285*, 2580–2590.

Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. Hepatology *47*, 1394–1400.

Williams, C., Sullivan, K., and Black, L.D. (2015). Partially digested adult cardiac extracellular matrix promotes cardiomyocyte proliferation in vitro. Adv Healthc Mater *4*, 1545–1554.

Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B., and Karin, M. (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. Genes Dev. *12*, 3369–3381.

Xing, Q., Vogt, C., Leong, K.W., and Zhao, F. (2014). Highly Aligned Nanofibrous Scaffold Derived from Decellularized Human Fibroblasts. Adv. Funct. Mater. *24*, 3027–3035.

Xing, Q., Yates, K., Tahtinen, M., Shearier, E., Qian, Z., and Zhao, F. (2015). Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. Tissue Eng. Part C Methods *21*, 77–87.

Yalak, G., and Olsen, B.R. (2015). Proteomic database mining opens up avenues utilizing extracellular protein phosphorylation for novel therapeutic applications. J. Transl. Med. *13*, 125.

Acevedo-Jake, A.M., Ngo, D.H., and Hartgerink, J.D. (2017). Control of collagen triple helix stability by phosphorylation. Biomacromolecules *18*, 1157–1161.

Ai-Aql, Z.S., Alagl, A.S., Graves, D.T., Gerstenfeld, L.C., and Einhorn, T.A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J. Dent. Res. 87, 107–118.

Akiyama, K., You, Y.-O., Yamaza, T., Chen, C., Tang, L., Jin, Y., Chen, X.-D., Gronthos, S., and Shi, S. (2012). Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. Stem Cell Res Ther 3, 40.

Alberts, B. (2008). Molecular biology of the cell (New York: Garland Science).

Alcantar, N.A., Aydil, E.S., and Israelachvili, J.N. (2000). Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. J. Biomed. Mater. Res. 51, 343–351.

Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A.B., García-Pérez, A., Cobo, M., and Martín, F. (2013). CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. PLoS One 8, e76979.

Armarego, W. L. F. and Perrin, D.D. (1996). Purifications of Lab. Chemicals (Oxford).

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat. Genet. 25, 25–29.

Badylak, S.F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. Biomaterials 28, 3587–3593.

Badylak, S.F., Freytes, D.O., and Gilbert, T.W. (2015). Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. Acta Biomater. 23 Suppl, S17–26.

Baiguera, S., Del Gaudio, C., Lucatelli, E., Kuevda, E., Boieri, M., Mazzanti, B., Bianco, A., and Macchiarini, P. (2014). Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. Biomaterials 35, 1205–1214.

Banerjee, C., McCabe, L.R., Choi, J.Y., Hiebert, S.W., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (1997). Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. J. Cell Biochem. 66, 1–8.

Bengtsson, E., Mörgelin, M., Sasaki, T., Timpl, R., Heinegård, D., and Aspberg, A. (2002). The leucine-rich repeat protein PRELP binds perlecan and collagens and may function as a basement membrane anchor. J. Biol. Chem. 277, 15061–15068.

Berg, R.A., and Prockop, D.J. (1973). The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 115–120.

Birmingham, E., Niebur, G.L., McHugh, P.E., Shaw, G., Barry, F.P., and McNamara, L.M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. Eur Cell Mater 23, 13–27.

Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. Biochem. J. 348 Pt 2, 241–255.

Bjugstad, K.B., Lampe, K., Kern, D.S., and Mahoney, M. (2010). Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: an analysis of the glial response across space and time. J. Biomed. Mater. Res. A 95, 79–91.

Bodian, D.L., Madhan, B., Brodsky, B., and Klein, T.E. (2008). Predicting the clinical lethality of osteogenesis imperfecta from collagen glycine mutations. Biochemistry 47, 5424–5432.

Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 786–801.

Brown, S.R., Cleveland, E.M., Deeken, C.R., Huitron, S.S., Aluka, K.J., and Davis, K.G. (2017). Type I/type III collagen ratio associated with diverticulitis of the colon in young patients. J. Surg. Res. 207, 229–234.

Byron, A., Humphries, J.D., and Humphries, M.J. (2013). Defining the extracellular matrix using proteomics. Int J Exp Pathol 94, 75–92.

Cao, H.-M., Ye, X.-P., Ma, J.-H., Jiang, H., Li, S.-X., Li, R.-Y., Li, X.-S., Guo, C.-C., Wang, Z.-Q., Zhan, M., et al. (2015). Mimecan, a hormone abundantly expressed in adipose tissue, reduced food intake independently of leptin signaling. EBioMedicine 2, 1718–1724.

Chen, Y., Zhang, M., Liu, W., and Li, G. (2011). Properties of alkali-solubilized collagen solution crosslinked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid. Korea-Aust. Rheol. J. 23, 41–48.

Cheng, N.-C., Estes, B.T., Awad, H.A., and Guilak, F. (2009). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. Tissue Eng. Part A 15, 231–241.

Corey, E.J., and Kim, C.U. (1972). A New and Highly Effective Method for the Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds. J. Am. Chem. Soc. 94, 7586 – 7587.

Cox, J., Hein, M.Y., Luber, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol. Cell Proteomics 13, 2513–2526.

Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials 32, 3233–3243.

Cuatrecasas, P., and Parikh, I. (1972). Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. Biochemistry 11, 2291–2299.

Daley, W.P., Peters, S.B., and Larsen, M. (2008). Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. J. Cell Sci. 121, 255–264.

DeQuach, J.A., Lin, J.E., Cam, C., Hu, D., Salvatore, M.A., Sheikh, F., and Christman, K.L. (2012). Injectable skeletal muscle matrix hydrogel promotes neovascularization and muscle cell infiltration in a hindlimb ischemia model. Eur Cell Mater 23, 400–12; discussion 412.

Djabourov, M., Leblond, J., and Papon, P. (1988). Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. J. Phys. France 49, 319–332.

Duan, L., Liu, W., Tian, Z., Li, C., and Li, G. (2014). Properties of collagen gels cross-linked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid deriviate. Int. J. Biol. Macromol. 69, 482–488.

Duconseille, A., Astruc, T., Quintana, N., Meersman, F., and Sante-Lhoutellier, V. (2015). Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. Food Hydrocoll. 43, 360–376.

Evans, N.D., Swain, R.J., Gentleman, E., Gentleman, M.M., and Stevens, M.M. (2012). Gene-Expression Analysis Reveals That Embryonic Stem Cells Cultured Under Osteogenic Conditions Produce Mineral Non-. 24, 211–223.

Fanganiello, R.D., Ishiy, F.A.A., Kobayashi, G.S., Alvizi, L., Sunaga, D.Y., and Passos-Bueno, M.R. (2015). Increased In Vitro Osteopotential in SHED Associated with Higher IGF2 Expression When Compared with hASCs. Stem Cell Rev 11, 635–644.

Flores, I.L., Kawahara, R., Miguel, M.C.C., Granato, D.C., Domingues, R.R., Macedo, C.C.S., Carnielli, C.M., Yokoo, S., Rodrigues, P.C., Monteiro, B.V.B., et al. (2016). EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. Clin. Sci. 130, 785–799.

Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F. (2006). Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 27, 3675–3683.

Gruskin, E., Doll, B.A., Futrell, F.W., Schmitz, J.P., and Hollinger, J.O. (2012). Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 1063–1077.

Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. Cell 84, 345–357.

Haag, T., Herkt, C.E., Walesch, S.K., Richter, A.M., and Dammann, R.H. (2014). The apoptosis associated tyrosine kinase gene is frequently hypermethylated in human cancer and is regulated by epigenetic mechanisms. Genes Cancer 5, 365–374.

Harriger, M.D., Supp, A.P., Warden, G.D., and Boyce, S.T. (1997). Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. J. Biomed. Mater. Res. 35, 137–145.

Harris, J.M., Struck, E.C., Case, M.G., Paley, M.S., Yalpani, M., Van Alstine, J.M., and Brooks, D.E. (1984). Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 22, 341–352.

Hauschka, P.V., Lian, J.B., Cole, D.E., and Gundberg, C.M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. Physiol. Rev. 69, 990–1047.

Henrique, D., and Schweisguth, F. (2003). Cell polarity: the ups and downs of the Par6/aPKC complex. Curr. Opin. Genet. Dev. 13, 341–350.

Hermanson, G.T. (2013). Homobifunctional Crosslinkers. In Bioconjugate Techniques, (Elsevier), pp. 275–298.

Higuchi, A., Ling, Q.-D., Hsu, S.-T., and Umezawa, A. (2012). Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. Chem. Rev. 112, 4507–4540.

Hoshiba, T., Chen, G., Endo, C., Maruyama, H., Wakui, M., Nemoto, E., Kawazoe, N., and Tanaka, M. (2016). Decellularized extracellular matrix as an in vitro model to study the comprehensive roles of the ECM in stem cell differentiation. Stem Cells Int. 2016, 6397820.

Jan, A.T., Lee, E.J., and Choi, I. (2016). Fibromodulin: A regulatory molecule maintaining cellular architecture for normal cellular function. Int. J. Biochem. Cell Biol. 80, 66–70.

Kalkhof, S., and Sinz, A. (2008). Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. Anal. Bioanal. Chem. 392, 305–312.

Katayama, S., Fukuda, K., Watanabe, T., and Yamauchi, M. (1988). Synthesis of 1,3-Dicarbonyl Compounds by the Oxidation of 3-Hydroxycarbonyl Compounds with Corey-Kim Reagent. Synthesis (Stuttg) 1988, 178–183.

Kawai, M. (2013). Adipose tissue and bone: role of PPARγ in adipogenesis and osteogenesis. Horm. Mol. Biol. Clin. Investig. 15, 105–113.

Khor, E. (1997). Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. Biomaterials 18, 95–105.

Kim, S.W., Muise, A.M., Lyons, P.J., and Ro, H.S. (2001). Regulation of adipogenesis by a transcriptional repressor that modulates MAPK activation. J. Biol. Chem. 276, 10199–10206.

Klees, R.F., Salasznyk, R.M., Kingsley, K., Williams, W.A., Boskey, A., and Plopper, G.E. (2005). Laminin-5 induces osteogenic gene expression in human mesenchymal stem cells through an ERK-dependent pathway. Mol. Biol. Cell 16, 881–890.

Komarova, S.V., Safranek, L., Gopalakrishnan, J., Ou, M.-J.Y., McKee, M.D., Murshed, M., Rauch, F., and Zuhr, E. (2015). Mathematical model for bone mineralization. Front. Cell Dev. Biol. 3, 51.

Kramer, Ij.M. (2016). Protein kinase C in oncogenic transformation and cell polarity. In Signal Transduction, (Elsevier), pp. 529–588.

Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.-H., and Trajanoski, Z. (2007). Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. BMC Genomics 8, 70.

Lampe, A.K., and Bushby, K.M.D. (2005). Collagen VI related muscle disorders. J. Med. Genet. 42, 673–685.

Langenbach, F., and Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. Stem Cell Res Ther 4, 117.

Lapasin, R., and Pricl, S. (1995). Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications (Boston, MA: Springer US).

Lee, E.J., Nam, J.H., and Choi, I. (2018). Fibromodulin modulates myoblast differentiation by controlling calcium channel. Biochem. Biophys. Res. Commun. 503, 580–585.

Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., and Regenstein, J.M. (2015). Collagen and gelatin. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 6, 527–557.

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A., and Komori, T. (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. J. Cell Biol. 155, 157–166.

Liu, X.Y., Nothias, J.-M., Scavone, A., Garfinkel, M., and Millis, J.M. (2010). Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-L-lysine for islet encapsulation. ASAIO J 56, 241–245.

Lo, R.S., Wotton, D., and Massagué, J. (2001). Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. EMBO J. 20, 128–136.

Lomant, A.J., and Fairbanks, G. (1976). Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). J. Mol. Biol. 104, 243–261.

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., and Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials 25, 2997–3004.

Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. Bioinformatics 21, 3448–3449.

Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani, Y., Fukuda, T., Oguri, Y., et al. (2008). Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 12849–12854.

Melhuish, T.A., Gallo, C.M., and Wotton, D. (2001). TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription. J. Biol. Chem. 276, 32109–32114.

Melixetian, M., Klein, D.K., Sørensen, C.S., and Helin, K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. Nat. Cell Biol. 11, 1247–1253.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., and Waldron, K.C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. BioTechniques 37, , 798.

Miron, R.J., and Zhang, Y.F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. J. Dent. Res. 91, 736–744.

Moriguchi, T., Yano, K., Nakagawa, S., and Kaji, F. (2003). Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. J. Colloid Interface Sci. 260, 19–25.

Nakajima, N., and Ikada, Y. (1995). Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. Bioconjug. Chem. 6, 123–130.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrugghe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 108, 17–29.

Noguchi, K., Fukazawa, H., Murakami, Y., and Uehara, Y. (2002). Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. J. Biol. Chem. 277, 39655–39665.

Olde Damink, L.H., Dijkstra, P.J., van Luyn, M.J., van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., and Feijen, J. (1996). Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. Biomaterials 17, 765–773.

Olde Damink, L.H.H., Dijkstra, P.J., Van Luyn, M.J.A., Van Wachem, P.B., Nieuwenhuis, P., and Feijen, J. (1995). Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 6, 460–472.

Perumal, S., Antipova, O., and Orgel, J.P.R.O. (2008). Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical conformation govern its proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 2824–2829.

Puchtler, H., Meloan, S.N., and Terry, M.S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. J. Histochem. Cytochem. 17, 110–124.

Qadir, M.I., Parveen, A., and Ali, M. (2015). Cdc42: role in cancer management. Chem Biol Drug Des 86, 432–439.

Rampersad, S.N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. Sensors (Basel) 12, 12347–12360.

Rao Pattabhi, S., Martinez, J.S., and Keller, T.C.S. (2014). Decellularized ECM effects on human mesenchymal stem cell stemness and differentiation. Differentiation. 88, 131–143.

Rault, I., Frei, V., Herbage, D., Abdul-Malak, N., and Huc, A. (1996). Evaluation of different chemical methods for cros-linking collagen gel, films and sponges. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 7, 215–221.

Reing, J.E., Zhang, L., Myers-Irvin, J., Cordero, K.E., Freytes, D.O., Heber-Katz, E., Bedelbaeva, K., McIntosh, D., Dewilde, A., Braunhut, S.J., et al. (2009). Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. Tissue Eng. Part A 15, 605–614.

Rosalina, I., and Bhattacharya, M. (2002). Dynamic rheological measurements and analysis of starch gels. Carbohydr. Polym. 48, 191–202.

Ruggiero, S., Cosgarea, R., Potempa, J., Potempa, B., Eick, S., and Chiquet, M. (2013). Cleavage of extracellular matrix in periodontitis: gingipains differentially affect cell adhesion activities of fibronectin and tenascin-C. Biochim. Biophys. Acta 1832, 517–526.

Ruijgrok, J.M., De Wijn, J.R., and Boon, M.E. (1994). Optimizing glutaraldehyde crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperature. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 5, 80–87.

Russo, V., Omidi, E., Samani, A., Hamilton, A., and Flynn, L.E. (2015). Porous, Ventricular Extracellular Matrix-Derived Foams as a Platform for Cardiac Cell Culture. Biores. Open Access 4, 374–388.

Saito, H., Taguchi, T., Kobayashi, H., Kataoka, K., Tanaka, J., Murabayashi, S., and Mitamura, Y. (2004). Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. Materials Science and Engineering: C 24, 781–785.

Salasznyk, R.M., Williams, W.A., Boskey, A., Batorsky, A., and Plopper, G.E. (2004). Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J. Biomed. Biotechnol. 2004, 24–34.

Samiric, T., Parkinson, J., Ilic, M.Z., Cook, J., Feller, J.A., and Handley, C.J. (2009). Changes in the composition of the extracellular matrix in patellar tendinopathy. Matrix Biol 28, 230–236.

Scott, J.E. (1996). Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. Biochemistry 35, 8795–8799.

Seif-Naraghi, S., Singelyn, J., Dequach, J., Schup-Magoffin, P., and Christman, K. (2010a). Fabrication of biologically derived injectable materials for myocardial tissue engineering. J. Vis. Exp.

Seif-Naraghi, S.B., Salvatore, M.A., Schup-Magoffin, P.J., Hu, D.P., and Christman, K.L. (2010b). Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: a potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. Tissue Eng. Part A 16, 2017–2027.

Seif-Naraghi, S.B., Singelyn, J.M., Salvatore, M.A., Osborn, K.G., Wang, J.J., Sampat, U., Kwan, O.L., Strachan, G.M., Wong, J., Schup-Magoffin, P.J., et al. (2013). Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. Sci. Transl. Med. 5, 173ra25.

Seo, B.M., Sonoyama, W., Yamaza, T., Coppe, C., Kikuiri, T., Akiyama, K., Lee, J.S., and Shi, S. (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice. Oral Dis 14, 428–434.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. 13, 2498–2504.

Sipilä, K.H., Drushinin, K., Rappu, P., Jokinen, J., Salminen, T.A., Salo, A.M., Käpylä, J., Myllyharju, J., and Heino, J. (2018). Proline hydroxylation in collagen supports integrin binding by two distinct mechanisms. J. Biol. Chem. 293, 7645–7658.

Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., and Ideker, T. (2011). Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27, 431–432.

Stadelmann, W.K., Digenis, A.G., and Tobin, G.R. (1998). Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. The American Journal of Surgery 176, 26S–38S.

Stoward, P.J. (1966). Some comments on the mechanism of the schiff reaction. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 14, 681–683.

Stumpf, M., Cao, W., Klinge, U., Klosterhalfen, B., Kasperk, R., and Schumpelick, V. (2001). Increased distribution of collagen type III and reduced expression of matrix metalloproteinase 1 in patients with diverticular disease. Int J Colorectal Dis 16, 271–275.

Sun, W.Q., Xu, H., Sandor, M., and Lombardi, J. (2013). Process-induced extracellular matrix alterations affect the mechanisms of soft tissue repair and regeneration. J. Tissue Eng. 4, 2041731413505305.

Svensson, L., Närlid, I., and Oldberg, A. (2000). Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. FEBS Lett. 470, 178–182.

Takawale, A., Sakamuri, S.S.V.P., and Kassiri, Z. (2015). Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology. Compr. Physiol. 5, 687–719.

Tanaka, K., Matsumoto, E., Higashimaki, Y., Katagiri, T., Sugimoto, T., Seino, S., and Kaji, H. (2012). Role of osteoglycin in the linkage between muscle and bone. J. Biol. Chem. 287, 11616–11628.

Tasheva, E.S., Ke, A., Deng, Y., Jun, C., Takemoto, L.J., Koester, A., and Conrad, G.W. (2004). Differentially expressed genes in the lens of mimecan-null mice. Mol. Vis. 10, 403–416.

Tortorella, M., Pratta, M., Liu, R.Q., Abbaszade, I., Ross, H., Burn, T., and Arner, E. (2000). The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. J. Biol. Chem. 275, 25791–25797.

Vora, S.R., Guo, Y., Stephens, D.N., Salih, E., Vu, E.D., Kirsch, K.H., Sonenshein, G.E., and Trackman, P.C. (2010). Characterization of recombinant lysyl oxidase propeptide. Biochemistry 49, 2962–2972.

Wang, C., Yan, Q., Liu, H.-B., Zhou, X.-H., and Xiao, S.-J. (2011). Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushes and the following amidation reactions. Langmuir 27, 12058–12068.

Wang, J.C., Alanay, A., Mark, D., Kanim, L.E.A., Campbell, P.A., Dawson, E.G., and Lieberman, J.R. (2007). A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. Eur. Spine J. 16, 1233–1240.

Watté, J. Low temperature deposition of photocatalytically active TiO2 coatings on.

Weis, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.-J., and Eyre, D.R. (2010). Location of 3-hydroxyproline residues in collagen types I, II, III, and V/XI implies a role in fibril supramolecular assembly. J. Biol. Chem. 285, 2580–2590.

Wells, R.G. (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. Hepatology 47, 1394–1400.

Whipple, E.B., and Ruta, M. (1974). Structure of aqueous glutaraldehyde. J. Org. Chem. 39, 1666–1668.

Williams, C., Sullivan, K., and Black, L.D. (2015). Partially digested adult cardiac extracellular matrix promotes cardiomyocyte proliferation in vitro. Adv Healthc Mater 4, 1545–1554.

Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B., and Karin, M. (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. Genes Dev. 12, 3369–3381.

Xing, Q., Vogt, C., Leong, K.W., and Zhao, F. (2014). Highly Aligned Nanofibrous Scaffold Derived from Decellularized Human Fibroblasts. Adv. Funct. Mater. 24, 3027–3035.

Xing, Q., Yates, K., Tahtinen, M., Shearier, E., Qian, Z., and Zhao, F. (2015). Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation. Tissue Eng. Part C Methods 21, 77–87.

Yalak, G., and Olsen, B.R. (2015). Proteomic database mining opens up avenues utilizing extracellular protein phosphorylation for novel therapeutic applications. J. Transl. Med. 13, 125.

Yamauchi, M., and Shiiba, M. (2008). Lysine hydroxylation and cross-linking of collagen. Methods Mol. Biol. 446, 95–108.

Yamauchi, M., and Sricholpech, M. (2012). Lysine post-translational modifications of collagen. Essays Biochem 52, 113–133.

Yamaza, T., Kentaro, A., Chen, C., Liu, Y., Shi, Y., Gronthos, S., Wang, S., and Shi, S. (2010). Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Stem Cell Res Ther 1, 5.

Yannas, I.V., and Burke, J.F. (1980). Design of an artificial skin. I. Basic design principles. J. Biomed. Mater. Res. 14, 65–81.

Yannas, I.V., Lee, E., Orgill, D.P., Skrabut, E.M., and Murphy, G.F. (1989). Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 933–937.

Young, D.A., Ibrahim, D.O., Hu, D., and Christman, K.L. (2011). Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. Acta Biomater. 7, 1040–1049.

Zeeman, R., Dijkstra, P.J., van Wachem, P.B., van Luyn, M.J., Hendriks, M., Cahalan, P.T., and Feijen, J. (1999). Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. Biomaterials 20, 921–931.

Zeeman, R., Dijkstra, P.J., van Wachem, P.B., van Luyn, M.J., Hendriks, M., Cahalan, P.T., and Feijen, J. (2000). The kinetics of 1,4-butanediol diglycidyl ether crosslinking of dermal sheep collagen. J. Biomed. Mater. Res. 51, 541–548.

Zeltz, C., Orgel, J., and Gullberg, D. (2014). Molecular composition and function of integrin-based collagen glues-introducing COLINBRIs. Biochim. Biophys. Acta 1840, 2533–2548.

Zheng, C.H., and Levenston, M.E. (2015). Fact versus artifact: avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs. Eur Cell Mater 29, 224–36; discussion 236.

Zu, Y., Zhao, Q., Zhao, X., Zu, S., and Meng, L. (2011). Process optimization for the preparation of oligomycin-loaded folate-conjugated chitosan nanoparticles as a tumor-targeted drug delivery system using a two-level factorial design method. Int. J. Nanomedicine 6, 3429–3441.

ANEXO I

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Quantificação de peptídeos pela técnica de BCA

ECM	Enzima	p-valor
ECMt	Tripsina	$5,26\times10^{-3}$
ECMt	Pepsina	$4,76\times10^{-3}$
ECMo	Tripsina	$2,91\times10^{-3}$
ECMo	Pepsina	$4,19\times10^{-4}$
ECMo	Colagenase	$2,05\times10^{-2}$
ECMp	Tripsina	$3,07\times10^{-4}$
ECMp	Pepsina	$4,48\times10^{-4}$
ECMp	Colagenase	$4,87\times10^{-3}$

ANEXO II

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Quantificação de GAGs pela técnica de DMMB

ECM	Enzima	p-valor
ECMt	Tripsina	$5,32\times10^{-4}$
ECMt	Pepsina	$1,64\times10^{-3}$
ECMt	Colagenase	$3,77\times10^{-3}$
ECMo	Tripsina	$1,19\times10^{-3}$
ECMo	Pepsina	$3,09\times10^{-3}$
ECMo	Colagenase	$6,62\times10^{-5}$
ECMp	Tripsina	$1,56\times10^{-4}$
ECMp	Pepsina	$1,88\times10^{-6}$
ECMp	Colagenase	$5,72\times10^{-5}$

ANEXO III

Anotação funcional para o perfil proteômico de cada ECM

Protein ID	Description	LFQ intensity ECMt	LFQ intensity ECMo	LFQ intensity ECMp
A0A0A0MP88	Uncharacterized protein	0	28727	0
A0JNF4	DNA primase large subunit	0	0	1192600
A0N0X6	Leucine-rich repeat neuronal protein 1	0	0	95332
A2VDQ0	Intraflagellar transport 81	0	0	214540
A2VDS4	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	0	7471,7	0
A4FUE5	RAB3 GTPase activating protein catalytic subunit 1	0	0	0

A4IFA8	UPF0696 protein C11orf68 homolog	27541	0	0
A6QLB8	GSK3A protein	0	9912,1	0
A6QLE1	Tudor domain-containing protein 7	0	0	400720
A6QLF4	TRIB1 protein	15038	0	0
A6QLN5	PI4K2A protein	0	418620	0
A6QNZ5	MGC151537 protein	0	0	117110
A6QP16	Ubiquitin thioesterase ZRANB1	0	0	126550
A6QP30	CPN2 protein	0	0	221090
A6QPM5	ILDR2 protein	84388	0	0
A6QR40	Engulfment and cell motility protein 3	0	11952	0
A7MAZ2	STX12 protein	0	19348	0
A7YWN4	Calmodulin-lysine N-methyltransferase	53190	0	0
E1B6X6	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 1B	0	0	289800
E1B754	Microtubule associated serine/threonine kinase 2	0	285770	0
E1B7W2	Chromosome 2 C2orf72 homolog	28287	0	0
E1B847	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	0	0	166190
E1B8C2	Nucleolar protein with MIF4G domain 1	0	0	72911
E1B9Q8	Zinc finger protein 609	0	7116	0
E1BAN6	Taste receptor type 2	0	0	681200
E1BB91	Collagen type VI alpha 3 chain	0	0	131670
E1BBW2	Coiled-coil domain containing 191	0	0	0
E1BCX0	Ovo like zinc finger 3	0	0	455450
E1BD12	von Willebrand factor A domain containing 5B	0	0	226990
E1BD25	B-cell CLL/lymphoma 11B	6121	0	0

E1BDM8	DEAD-box helicase 6	0	0	0
E1BE33	Zinc finger E-box binding homeobox 2	105090	0	0
E1BEI7	Reticulon 4 receptor like 1	0	0	352680
E1BEJ7	Host cell factor C2	0	0	0
E1BEK4	RAD54 like 2	0	0	184060
E1BES5	Uncharacterized protein	19976	0	0
E1BFB0	Spectrin alpha, non-erythrocytic 1	0	0	146230
E1BG78	R3H domain and coiled-coil containing 1 like	51506	0	0
E1BIF6	Uncharacterized protein	0	0	505260
E1BIR1	Claspin	0	165020	0
E1BIT2	Mitochondrial elongation factor 1	0	0	399720
E1BJF4	DNA polymerase	0	0	118760
E1BJU4	NIMA related kinase 11	0	0	181040
E1BK89	Lactase	0	0	48845
E1BKJ5	Transformation/transcription domain associated protein	115480	0	0
E1BKN0	Lysine methyltransferase 2B	21453	0	0
E1BKY0	Zinc finger protein 197	0	0	0
E1BKZ0	Pericentrin	0	0	118760
E1BL01	Junctophilin 4	0	16754	0
E1BL14	Tetratricopeptide repeat domain 24	0	715460	0
E1BLN6	Keratinocyte proline rich protein	0	0	0
E1BLP0	PML-RARA regulated adaptor molecule 1	0	0	148180
E1BLY2	Uncharacterized protein	0	0	188140
E1BLZ0	Ubiquitinyl hydrolase 1	0	24991	0
E1BM42	KIAA1468	0	0	0

E1BMC4	Golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1	0	0	153630
E1BMV0	Claudin	0	0	237430
E1BN90	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 2	0	0	0
E1BND0	Ubiquitin specific peptidase 24	38133	0	0
E1BNH3	Stonin 2	0	0	216170
E1BNR0	Apolipoprotein B	0	0	93380
E1BNZ0	Kinase non-catalytic C-lobe domain containing 1	0	0	0
E1BP31	Uncharacterized protein	0	0	381310
E1BPX1	Vacuolar protein sorting 13 homolog C	0	0	106690
F1MBA0	Cytoskeleton-associated protein 2	1464400	0	0
F1MBS3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	0	0	154800
F1MBW3	Acyl-CoA synthetase long chain family member 4	0	0	596780
F1MCM5	Tyrosine-protein kinase receptor	0	15088	0
F1MD77	Laminin subunit gamma 1	0	0	469220
F1MDF3	ALS2, alsin Rho guanine nucleotide exchange factor	83776	0	0
F1MDJ4	Coiled-coil domain containing 93	0	0	92277
F1MF78	Spectrin repeat containing nuclear envelope protein 2	0	0	75391
F1MFR9	Rho guanine nucleotide exchange factor 16	0	30327	0
F1MGL2	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1	39914	0	0
F1MHL9	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	47416	0	0
F1MHU8	Immunoglobulin mu binding protein 2	0	0	71140

F1MI56	Ankyrin repeat domain 17	0	0	543060
F1MI83	Mitochondrial transcription termination factor 2	259740	0	0
F1MIB7	Apoptosis associated tyrosine kinase	0	0	145190
F1MIU7	Solute carrier family 27 member 3	0	0	462220
F1MJ64	Coiled-coil domain containing 28A	0	110590	0
F1MKV4	KIAA1549	0	0	372060
F1ML17	NFAT activating protein with ITAM motif 1	16306	0	0
F1ML80	SLC2A4 regulator	30015	0	0
F1MLY7	ATR serine/threonine kinase	0	30511	0
F1MM78	Zinc finger CCHC-type containing 8	0	0	0
F1MMP9	Guanylate cyclase	0	0	0
F1MP61	Uncharacterized protein	0	0	0
F1MPF3	Protocadherin Fat 2 precursor	0	308050	0
F1MPW8	Zinc finger homeobox 4	0	0	198520
F1MQ30	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	0	0	105240
F1MQ44	MCF.2 cell line derived transforming sequence-like 2	12600	0	0
F1MQ65	Myosin IE	0	3311,8	0
F1MQ84	Phosphodiesterase 4D interacting protein	0	0	28268
F1MRA0	Lamin tail domain containing 1	10505	0	0
F1MRZ5	Tenascin C	0	0	219480
F1MT78	Endothelial cell adhesion molecule	0	308050	0
F1MTH3	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	0	0	426460
F1MU52	PRKCA-binding protein	0	0	262610

F1MW01	Extra spindle pole bodies like 1, separase	0	0	0
F1MWB8	Dmx like 2	0	0	0
F1MWX8	MHC Class I JSP.1 precursor	0	0	0
F1MX94	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase	0	0	371840
F1MY85	Complement C5a anaphylatoxin	17175	0	0
F1N0C4	Zinc finger MYND-type containing 19	0	6085700	0
F1N0E0	PAX-interacting protein 1	0	22203	0
F1N0F7	Eukaryotic translation initiation factor 5	0	0	135250
F1N0P2	DEAD-box helicase 49	147610	0	0
F1N0Z3	ESX homeobox 1	0	598760	0
F1N1C7	AE binding protein 1	0	36886	0
F1N1C9	Bromodomain and WD repeat domain containing 3	0	0	419190
F1N1E2	Par-6 family cell polarity regulator gamma	0	0	166190
F1N1H2	Microtubule-associated protein 1S	315270	0	0
F1N1R4	DIS3 homolog, exosome endoribonuclease and 3'-5' exoribonuclease	0	0	470450
F1N1Z2	Ubiquitin specific peptidase 47	0	0	50210
F1N222	Protein SDA1 homolog	0	3883400	0
F1N2M2	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 7	35051	0	0
F1N3I3	Ubiquitin conjugating enzyme E2 O	10046	0	0
F1N3I6	WW and C2 domain containing 1	26462	0	0
F1N3U6	UV radiation resistance associated	0	0	309610
F1N446	Uncharacterized protein	239480	0	0

F1N4J2	Sacsin molecular chaperone	0	592130	0
F1N5U1	G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase	0	0	0
F1N5X8	RING-type E3 ubiquitin transferase	47229	0	0
F1N621	Uncharacterized protein	0	31159	0
F1N7E8	Non-specific serine/threonine protein kinase	25227	0	0
F1N7F6	Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2	0	0	153630
F1N7L8	Basal body orientation factor 1	0	0	2687300
F1N7Z6	Pappalysin 1	0	0	119390
G1K177	Cleavage stimulation factor subunit 2	0	0	45204
G3MWL5	Coiled-coil domain containing 38	0	0	0
G3MWW7	Proline rich 16	0	0	352680
G3MXN7	Uncharacterized protein	0	0	0
G3MXQ9	Glycine-N-acyltransferase like 2	0	56027	0
G3MYU4	Centrosomal protein of 290 kDa	0	0	366710
G3N0T2	Uncharacterized protein	315270	0	0
G3N182	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3G	19388	0	0
G3N1M8	Uncharacterized protein	0	0	380320
G3N2P1	Zinc finger protein 114	483740	0	0
G3N369	Uncharacterized protein	0	0	0
G3N381	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 17	0	0	76023
G3X6U0	Armadillo repeat containing X-linked 5	0	0	349740
G5E5L9	IQ motif and Sec7 domain 3	0	0	107310
G5E6N4	Palmitoyltransferase	0	0	366830
O02754	CCAAT/enhancer-binding protein alpha	12519	0	0

P02453	Collagen alpha-1(I) chain	12514000	0	0
P02465	Collagen alpha-2(I) chain	41561	0	0
P0C6R3	Carboxylesterase 4A	69940	0	0
P12378	UDP-glucose 6-dehydrogenase	0	0	108590
P19687	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-1	0	23120	0
P30205	Antigen WC1.1	0	0	62441
P41361	Antithrombin-III	0	0	0
Q08E01	Adducin 3	0	0	0
Q0VC20	Retinoic acid receptor RXR-gamma	0	0	191100
Q10569	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	0	0	150320
Q148L9	ST6 (Alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2	0	0	235250
Q17QL6	LOR protein	0	9578,3	0
Q17QN3	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	30950	0	0
Q24JZ4	Metadherin	20883	0	0
Q27974	Putative tyrosine-protein phosphatase auxilin	0	0	161290
Q28107	Coagulation factor V	0	0	0
Q28120	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	0	0	359690
Q28141	ATP-dependent RNA helicase A	84388	0	0
Q29S21	Keratin, type II cytoskeletal 7	0	0	0
Q2KIL9	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12-like	28054	0	0
Q2KJ55	Rho GTPase activating protein 25	0	70861	0
Q2KJ97	Neurochondrin	0	0	195200
Q2KJC6	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	0	0	303980

Q3MIB9	TGFB induced factor homeobox 1	0	0	547920
Q3SYT8	NADPH--cytochrome P450 reductase	0	0	258600
Q3SZ00	HADHA protein	0	0	0
Q3SZJ5	Transcription factor GATA-5	0	0	226990
Q3T028	Testis-specific gene 13 protein	0	0	218440
Q3T075	Syntaxin-8	56442	0	0
Q3ZCJ7	Tubulin alpha-1C chain	0	0	350740
Q56K13	Splicing factor 3B subunit 5	0	35556	0
Q5MD62	C-C chemokine receptor type 7	0	0	13017
Q70IB5	Putative MHC class II antigen	0	49127	0
Q7YRQ8	Tissue factor pathway inhibitor 2	0	0	81212
Q9GK68	Growth/differentiation factor 9	66153	0	0
Q9GLE4	Matrix metalloproteinase-14	0	0	282180

ANEXO IV

Anotação funcional de proteínas com quantificação de modificações pós traducionais em cada ECM

Protein IDs	Description	ECMt	ECMo	ECMp	Hydroxyproline site positions	Oxidation (M) site positions	Phospho (ST) site positions	Sulfation (Y) site positions	Deamidation (N) site positions
A6QP44	FUK protein	0	0	0			654		
A7E303	COL8A1 protein	0	0	0	368				
E1BF23	Myomesin 2	185940	0	0				32	22
E1BI02	Fibromodulin	0	0	271830		359			
E1BLA8	Golgi membrane protein 1	2231600	0	0		2; 11			
F1MSR8	Collagen alpha-1(II) chain	290800	0	0					
F1MW01	Extra spindle pole bodies like 1, separase	0	0	140400					
F1N0K0	Collagen alpha-1(XI) chain	0	68814	0	929; 931; 949; 952; 955; 956; 965				

F1N2Y2	Collagen type V alpha 2 chain	154980	0	0	130; 135; 136; 141				
F1N670	IKAROS family zinc finger 4	1977100	0	0	425			436	
G3MX46	Capicua transcriptional repressor	0	0	2697800		2058	2044		
G3N2V3	C2 calcium dependent domain containing 4C	0	0	2134400			36		
G3N3E4	Collagen type VI alpha 3 chain	0	0	402060					
P00978	Protein AMBP	0	0	159680					
P02453	Collagen alpha-1(I) chain	17998000	19126000	5030100	281; 284; 288; 291; 297; 302; 333; 342; 402; 408; 411; 428; 450; 459; 474; 480; 482; 483; 495; 503; 522; 528; 534; 543; 546; 548; 767;	180; 300; 728; 999			294;399;854;890

					770; 771; 773; 777; 785; 798; 806; 807; 816; 822; 839; 840; 849; 851; 858; 860; 870; 876; 884; 885; 894; 897; 918; 923; 924; 927; 929; 936; 945; 948; 972; 975; 986; 995; 996; 998; 100				
P02465	Collagen alpha-2(I) chain	64861000	45336000	55590000			829; 832; 835		270; 399; 456; 489; 688; 748; 766; 916
P04258	Collagen alpha-1(III) chain	0	0	1964100	260; 263; 269; 779; 781; 784; 785; 788; 839; 845; 854	260; 263; 269; 779; 781; 784; 785; 788; 839; 845; 854			
P19879	Mimecan	0	0	3107000					
Q05443	Lumican	0	0	176450					
Q9GKN8	Prolargin	0	0	377260					

ANEXO V

Análise de enriquecimento do Gene Ontology para o perfil proteico total

Biological Process Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
43589	4,75E-03	skin morphogenesis	P02465|P02453
48730	3,02E-02	epidermis morphogenesis	P02465|P02453
9653	3,02E-02	anatomical structure morphogenesis	Q9GLE4|Q9GK68|P19687|P12378|P02465|Q3MIB9|P02453
8544	3,02E-02	epidermis development	Q17QL6|P02465|P02453
7398	3,02E-02	ectoderm development	Q17QL6|P02465|P02453
32501	3,02E-02	multicellular organismal process	Q9GLE4|Q17QL6|Q2KJ97|Q28107|Q9GK68|P41361|P19687|P12378|P02465|Q3MIB9|P02453 |Q7YRQ8
43588	3,02E-02	skin development	P02465|P02453
7596	3,02E-02	blood coagulation	Q28107|P41361|Q7YRQ8
50817	3,02E-02	coagulation	Q28107|P41361|Q7YRQ8
7599	3,02E-02	hemostasis	Q28107|P41361|Q7YRQ8
30199	3,67E-02	collagen fibril organization	P02465|P02453
48856	3,67E-02	anatomical structure development	Q9GLE4|Q17QL6|Q2KJ97|Q9GK68|P19687|P12378|P02465|Q3MIB9|P02453
50878	3,89E-02	regulation of body fluid levels	Q28107|P41361|Q7YRQ8

Molecular Function Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
48407	2,68E-02	platelet-derived growth factor binding	P02465|P02453
5201	4,80E-02	extracellular matrix structural constituent	P02465|P02453

30674	4,80E-02	protein binding, bridging	Q17QL6|P02465
17124	4,80E-02	SH3 domain binding	Q27974|A6QR40
30280	4,80E-02	structural constituent of epidermis	Q17QL6
3958	4,80E-02	NADPH-hemoprotein reductase activity	Q3SYT8
4478	4,80E-02	methionine adenosyltransferase activity	Q2KJC6
3979	4,80E-02	UDP-glucose 6-dehydrogenase activity	P12378
16603	4,80E-02	glutaminyl-peptide cyclotransferase activity	Q28120

Cellular Component Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
5584	1,05E-03	collagen type I	P02465|P02453
5583	7,84E-03	fibrillar collagen	P02465|P02453
5581	3,54E-02	collagen	P02465|P02453
5576	3,54E-02	extracellular region	Q9GLE4|Q28107|P30205|P0C6R3|Q9GK68|P41361|P02465|P02453|Q7YRQ8

ANEXO VI

Análise de enriquecimento do Gene Ontology para proteínas com modificações pós traducionais presentes nas ECMs

Biological Process Gene Ontology Enriched Categories				
GO-ID	corr p-value		Description	Genes in test set
43589		3,52E-05	skin morphogenesis	P02465|P02453
48730		2,64E-04	epidermis morphogenesis	P02465|P02453
43588		6,45E-04	skin development	P02465|P02453
30199		7,99E-04	collagen fibril organization	P02465|P02453
10810		1,77E-03	regulation of cell-substrate adhesion	A7E303|P02453
9887		3,18E-03	organ morphogenesis	A7E303|P02465|P02453
8544		3,84E-03	epidermis development	P02465|P02453
7398		3,84E-03	ectoderm development	P02465|P02453
30198		3,84E-03	extracellular matrix organization	P02465|P02453
30155		4,98E-03	regulation of cell adhesion	A7E303|P02453
43062		5,78E-03	extracellular structure organization	P02465|P02453
34505		6,13E-03	tooth mineralization	P02453
32502		8,94E-03	developmental process	A7E303|Q9GKN8|P02465|P02453
9653		9,03E-03	anatomical structure morphogenesis	A7E303|P02465|P02453
60346		9,81E-03	bone trabecula formation	P02453
1501		1,00E-02	skeletal system development	P02465|P02453
1568		1,00E-02	blood vessel development	P02465|P02453
48729		1,00E-02	tissue morphogenesis	P02465|P02453
1944		1,00E-02	vasculature development	P02465|P02453
1957		1,00E-02	intramembranous ossification	P02453
60351		1,00E-02	cartilage development involved in endochondral bone morphogenesis	P02453

32964	1,00E-02	collagen biosynthetic process	P02453
60343	1,28E-02	trabecula formation	P02453
48513	1,58E-02	organ development	A7E303|P02465|P02453
10812	1,58E-02	negative regulation of cell-substrate adhesion	P02453
18298	1,58E-02	protein-chromophore linkage	P00978
60323	1,58E-02	head morphogenesis	P02453
60325	1,58E-02	face morphogenesis	P02453
60322	1,66E-02	head development	P02453
60324	1,66E-02	face development	P02453
10171	1,66E-02	body morphogenesis	P02453
7569	1,78E-02	cell aging	Q9GKN8
1958	1,78E-02	endochondral ossification	P02453
60350	1,92E-02	endochondral bone morphogenesis	P02453
48731	1,92E-02	system development	A7E303|P02465|P02453
32963	2,24E-02	collagen metabolic process	P02453
44259	2,32E-02	multicellular organismal macromolecule metabolic process	P02453
50673	2,32E-02	epithelial cell proliferation	A7E303
48856	2,35E-02	anatomical structure development	A7E303|P02465|P02453
7266	2,51E-02	Rho protein signal transduction	P02465
7162	2,51E-02	negative regulation of cell adhesion	P02453
60349	2,56E-02	bone morphogenesis	P02453
44236	2,56E-02	multicellular organismal metabolic process	P02453
10811	2,67E-02	positive regulation of cell-substrate adhesion	A7E303
9888	2,68E-02	tissue development	P02465|P02453
7179	2,69E-02	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	P02465
1649	2,69E-02	osteoblast differentiation	P02453
7568	2,69E-02	aging	Q9GKN8

31214	2,69E-02	biomineral formation	P02453
7275	2,78E-02	multicellular organismal development	A7E303|P02465|P02453
42476	3,02E-02	odontogenesis	P02453
48706	3,03E-02	embryonic skeletal system development	P02453
48593	3,03E-02	camera-type eye morphogenesis	A7E303
3008	3,03E-02	system process	P02465|P02453
7605	3,06E-02	sensory perception of sound	P02453
50954	3,21E-02	sensory perception of mechanical stimulus	P02453
45785	3,21E-02	positive regulation of cell adhesion	A7E303
7265	3,78E-02	Ras protein signal transduction	P02465
48592	4,09E-02	eye morphogenesis	A7E303
51216	4,14E-02	cartilage development	P02453
8217	4,43E-02	regulation of blood pressure	P02465
7178	4,94E-02	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	P02465

Molecular Function Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
48407	2,05E-04	platelet-derived growth factor binding	P02465|P02453
5201	8,34E-04	extracellular matrix structural constituent	P02465|P02453
19838	2,91E-03	growth factor binding	P02465|P02453
42802	2,91E-03	identical protein binding	P00978|P02465|P02453
19862	3,94E-03	IgA binding	P00978
5515	1,27E-02	protein binding	P19879|P00978|Q05443|Q9GKN8|P02465|P02453
19865	1,69E-02	immunoglobulin binding	P00978
5518	2,21E-02	collagen binding	Q05443
46332	3,70E-02	SMAD binding	P02465
30674	3,72E-02	protein binding, bridging	P02465

Cellular Component Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
5583	4,36E-08	fibrillar collagen	Q05443|P02465|P02453
5578	4,36E-08	proteinaceous extracellular matrix	P19879|Q05443|Q9GKN8|P02465|P02453
31012	6,16E-08	extracellular matrix	P19879|Q05443|Q9GKN8|P02465|P02453
5581	5,46E-07	collagen	Q05443|P02465|P02453
5584	1,74E-06	collagen type I	P02465|P02453
5576	2,94E-06	extracellular region	P19879|P00978|Q05443|Q9GKN8|P02465|P02453
44421	3,11E-06	extracellular region part	P19879|Q05443|Q9GKN8|P02465|P02453
44420	7,34E-06	extracellular matrix part	Q05443|P02465|P02453

ANEXO VII

Análise de enriquecimento do Gene Ontology para proteínas com modificações pós traducionais na ECMt

Biological Process Gene Ontology Enriched Categories			
GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
43589	8,29E-05	skin morphogenesis	P02465|P02453
48730	6,21E-04	epidermis morphogenesis	P02465|P02453
43588	1,52E-03	skin development	P02465|P02453
30199	1,88E-03	collagen fibril organization	P02465|P02453
8544	1,16E-02	epidermis development	P02465|P02453
7398	1,16E-02	ectoderm development	P02465|P02453
30198	1,16E-02	extracellular matrix organization	P02465|P02453
1555	1,35E-02	oocyte growth	Q9GK68
34505	1,35E-02	tooth mineralization	P02453
48601	1,35E-02	oocyte morphogenesis	Q9GK68
43062	1,35E-02	extracellular structure organization	P02465|P02453
9994	1,73E-02	oocyte differentiation	Q9GK68
70934	1,73E-02	CRD-mediated mRNA stabilization	Q28141
60346	1,73E-02	bone trabecula formation	P02453
48588	1,73E-02	developmental cell growth	Q9GK68
48599	1,73E-02	oocyte development	Q9GK68
9653	2,08E-02	anatomical structure morphogenesis	Q9GK68|P02465|P02453
32964	2,08E-02	collagen biosynthetic process	P02453
1957	2,08E-02	intramembranous ossification	P02453
60351	2,08E-02	cartilage development involved in endochondral bone morphogenesis	P02453
1501	2,09E-02	skeletal system development	P02465|P02453

1568	2,11E-02	blood vessel development	P02465|P02453
48729	2,11E-02	tissue morphogenesis	P02465|P02453
1944	2,11E-02	vasculature development	P02465|P02453
60343	2,22E-02	trabecula formation	P02453
10812	2,68E-02	negative regulation of cell-substrate adhesion	P02453
48255	2,68E-02	mRNA stabilization	Q28141
48477	2,68E-02	oogenesis	Q9GK68
60323	2,68E-02	head morphogenesis	P02453
60325	2,68E-02	face morphogenesis	P02453
43489	2,68E-02	RNA stabilization	Q28141
60322	2,85E-02	head development	P02453
60324	2,85E-02	face development	P02453
10171	2,85E-02	body morphogenesis	P02453
48523	2,91E-02	negative regulation of cellular process	Q24JZ4|Q9GK68|P02453
7292	2,91E-02	female gamete generation	Q9GK68
1958	2,91E-02	endochondral ossification	P02453
43488	2,91E-02	regulation of mRNA stability	Q28141
60350	3,11E-02	endochondral bone morphogenesis	P02453
43487	3,11E-02	regulation of RNA stability	Q28141
16049	3,53E-02	cell growth	Q9GK68
32963	3,53E-02	collagen metabolic process	P02453
34605	3,53E-02	cellular response to heat	Q28141
48519	3,67E-02	negative regulation of biological process	Q24JZ4|Q9GK68|P02453
44259	3,68E-02	multicellular organismal macromolecule metabolic process	P02453
50794	3,69E-02	regulation of cellular process	Q24JZ4|Q9GK68|Q28141|P02465|P02453
9887	3,69E-02	organ morphogenesis	P02465|P02453
7266	3,94E-02	Rho protein signal transduction	P02465
7162	3,94E-02	negative regulation of cell adhesion	P02453

44236	4,06E-02	multicellular organismal metabolic process	P02453
60349	4,06E-02	bone morphogenesis	P02453
50789	4,51E-02	regulation of biological process	Q24JZ4|Q9GK68|Q28141|P02465|P02453
7179	4,51E-02	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	P02465
1649	4,51E-02	osteoblast differentiation	P02453
31214	4,51E-02	biomineral formation	P02453
48856	4,78E-02	anatomical structure development	Q9GK68|P02465|P02453
9888	4,88E-02	tissue development	P02465|P02453
42476	4,99E-02	odontogenesis	P02453

Molecular Function Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
48407	3,57E-04	platelet-derived growth factor binding	P02465|P02453
5201	1,45E-03	extracellular matrix structural constituent	P02465|P02453
19838	6,57E-03	growth factor binding	P02465|P02453
51059	4,99E-02	NF-kappaB binding	Q24JZ4

ANEXO VIII

Análise de enriquecimento do Gene Ontology para proteínas com modificações pós traducionais na ECMo

Biological Process Gene Ontology Enriched Categories			
GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
43589	1,58E-04	skin morphogenesis	P02465|P02453
8544	5,27E-04	epidermis development	Q17QL6|P02465|P02453
7398	5,27E-04	ectoderm development	Q17QL6|P02465|P02453
48730	5,91E-04	epidermis morphogenesis	P02465|P02453
43588	1,73E-03	skin development	P02465|P02453
30199	2,38E-03	collagen fibril organization	P02465|P02453
8217	1,45E-02	regulation of blood pressure	P19687|P02465
30198	1,45E-02	extracellular matrix organization	P02465|P02453
34505	1,45E-02	tooth mineralization	P02453
52551	1,45E-02	response to defense-related nitric oxide production by other organism involved in symbiotic interaction	P19687
52564	1,45E-02	response to immune response of other organism involved in symbiotic interaction	P19687
52565	1,45E-02	response to defense-related host nitric oxide production	P19687
52572	1,45E-02	response to host immune response	P19687
43062	1,80E-02	extracellular structure organization	P02465|P02453
8015	1,80E-02	blood circulation	P19687|P02465
3013	1,80E-02	circulatory system process	P19687|P02465
9888	1,80E-02	tissue development	Q17QL6|P02465|P02453
75136	1,80E-02	response to host	P19687
60346	1,80E-02	bone trabecula formation	P02453

52173	1,80E-02	response to defenses of other organism involved in symbiotic interaction	P19687
52200	1,80E-02	response to host defenses	P19687
3008	2,09E-02	system process	P19687|P02465|P02453
30825	2,09E-02	positive regulation of cGMP metabolic process	P19687
30828	2,09E-02	positive regulation of cGMP biosynthetic process	P19687
32964	2,09E-02	collagen biosynthetic process	P02453
1957	2,09E-02	intramembranous ossification	P02453
60351	2,09E-02	cartilage development involved in endochondral bone morphogenesis	P02453
60087	2,60E-02	relaxation of vascular smooth muscle	P19687
60343	2,60E-02	trabecula formation	P02453
1501	2,67E-02	skeletal system development	P02465|P02453
48856	2,67E-02	anatomical structure development	Q17QL6|P19687|P02465|P02453
1568	2,71E-02	blood vessel development	P02465|P02453
90075	2,71E-02	relaxation of muscle	P19687
48729	2,71E-02	tissue morphogenesis	P02465|P02453
1944	2,71E-02	vasculature development	P02465|P02453
9653	2,75E-02	anatomical structure morphogenesis	P19687|P02465|P02453
10812	2,75E-02	negative regulation of cell-substrate adhesion	P02453
30826	2,75E-02	regulation of cGMP biosynthetic process	P19687
45986	2,75E-02	negative regulation of smooth muscle contraction	P19687
60323	2,75E-02	head morphogenesis	P02453
60325	2,75E-02	face morphogenesis	P02453
30823	2,93E-02	regulation of cGMP metabolic process	P19687
60322	2,93E-02	head development	P02453
60324	2,93E-02	face development	P02453
10171	2,93E-02	body morphogenesis	P02453
7275	3,06E-02	multicellular organismal development	Q17QL6|P19687|P02465|P02453

1958	3,20E-02	endochondral ossification	P02453
60350	3,52E-02	endochondral bone morphogenesis	P02453
45932	3,76E-02	negative regulation of muscle contraction	P19687
51701	3,76E-02	interaction with host	P19687
32502	3,78E-02	developmental process	Q17QL6|P19687|P02465|P02453
30216	3,90E-02	keratinocyte differentiation	Q17QL6
32963	3,90E-02	collagen metabolic process	P02453
44259	4,10E-02	multicellular organismal macromolecule metabolic process	P02453
9913	4,10E-02	epidermal cell differentiation	Q17QL6
30801	4,10E-02	positive regulation of cyclic nucleotide metabolic process	P19687
30804	4,10E-02	positive regulation of cyclic nucleotide biosynthetic process	P19687
30810	4,10E-02	positive regulation of nucleotide biosynthetic process	P19687
7266	4,10E-02	Rho protein signal transduction	P02465
18149	4,10E-02	peptide cross-linking	Q17QL6
6940	4,10E-02	regulation of smooth muscle contraction	P19687
42311	4,10E-02	vasodilation	P19687
45981	4,10E-02	positive regulation of nucleotide metabolic process	P19687
7162	4,10E-02	negative regulation of cell adhesion	P02453
44236	4,26E-02	multicellular organismal metabolic process	P02453
60349	4,26E-02	bone morphogenesis	P02453
48513	4,51E-02	organ development	Q17QL6|P02465|P02453
44403	4,63E-02	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	P19687
9887	4,63E-02	organ morphogenesis	P02465|P02453
7179	4,68E-02	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	P02465
1649	4,68E-02	osteoblast differentiation	P02453
31214	4,68E-02	biomineral formation	P02453

Molecular Function Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
48407	2,37E-04	platelet-derived growth factor binding	P02465|P02453
5201	6,40E-04	extracellular matrix structural constituent	P02465|P02453
30674	6,40E-04	protein binding, bridging	Q17QL6|P02465
19838	3,27E-03	growth factor binding	P02465|P02453
30280	4,54E-03	structural constituent of epidermis	Q17QL6
5198	8,00E-03	structural molecule activity	Q17QL6|P02465|P02453
5200	1,94E-02	structural constituent of cytoskeleton	Q17QL6
4383	1,98E-02	guanylate cyclase activity	P19687
9975	3,20E-02	cyclase activity	P19687
42802	3,20E-02	identical protein binding	P02465|P02453
16849	3,20E-02	phosphorus-oxygen lyase activity	P19687
46332	3,20E-02	SMAD binding	P02465
17124	4,16E-02	SH3 domain binding	A6QR40

A**NEXO IX**

Análise de enriquecimento do Gene Ontology para proteínas com modificações pós traducionais na ECMp

Biological Process Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
43589	1,27E-03	skin morphogenesis	P02465|P02453
48730	9,45E-03	epidermis morphogenesis	P02465|P02453
43588	2,30E-02	skin development	P02465|P02453
30199	2,84E-02	collagen fibril organization	P02465|P02453

Molecular Function Gene Ontology Enriched Categories

GO-ID	corr p-value	Description	Genes in test set
48407	1,13E-02	platelet-derived growth factor binding	P02465|P02453
5201	3,72E-02	extracellular matrix structural constituent	P02465|P02453
3958	3,72E-02	NADPH-hemoprotein reductase activity	Q3SYT8
4478	3,72E-02	methionine adenosyltransferase activity	Q2KJC6
3979	3,72E-02	UDP-glucose 6-dehydrogenase activity	P12378
19862	3,72E-02	IgA binding	P00978
16603	3,72E-02	glutaminyl-peptide cyclotransferase activity	Q28120

A**NEXO X**

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Diferenciação obteoblástica *in vitro*: Quantificação da atividade da ALP para SHEDs

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
Dia 9		
Colagenase - em etapas	Controle	$3{,}22\times10^{-2}$
Dia 14		
Tripsina - contínuo	Controle	$4{,}65\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$3{,}23\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$1{,}49\times10^{-3}$
Dia 21		
Tripsina - contínuo	Controle	$3{,}47\times10^{-6}$
Pepsina - contínuo	Controle	$1{,}79\times10^{-4}$
Colagenase - contínuo	Controle	$7{,}45\times10^{-4}$
Tripsina - em etapas	Controle	$3{,}35\times10^{-4}$
Pepsina - em etapas	Controle	$1{,}52\times10^{-4}$
Colagenase - em etapas	Controle	$1{,}56\times10^{-4}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$6{,}86\times10^{-3}$

ANEXO XI

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Diferenciação obteoblástica *in vitro*: Quantificação da atividade da ALP para MO-58

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
Dia 9		
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$3{,}69\times10^{-3}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$2{,}13\times10^{-4}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$1{,}79\times10^{-8}$
Tripsina em etapas - 25 µg/mL	Controle	$1{,}01\times10^{-2}$
Tripsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$6{,}83\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Controle	$3{,}45\times10^{-8}$
Colagenase contínuo - 250 µg/mL	Controle	$7{,}67\times10^{-6}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Controle	$2{,}13\times10^{-3}$
Colagenase em etapas - 25 µg/mL	Controle	$1{,}34\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Controle	$2{,}96\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$3{,}61\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$2{,}86\times10^{-6}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$6{,}63\times10^{-3}$
Pepsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$2{,}29\text{x}10^{-3}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina contínuo - 25 µg/mL	$2{,}81\times10^{-2}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$1{,}08\times10^{-3}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$1{,}14\times10^{-3}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 25 µg/mL	$7{,}99\times10^{-4}$
Tripsina em etapas - 25 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$3{,}24\times10^{-2}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 5 µg/mL	$2{,}39\times10^{-7}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$1{,}27\times10^{-4}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase contínuo - 25 µg/mL	$1{,}26\times10^{-4}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$1{,}54\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$1{,}21\times10^{-5}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$3{,}95\times10^{-2}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 5 µg/mL	$1{,}95\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase em etapas - 25 µg/mL	$1{,}71\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 250 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$9{,}74\times10^{-3}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina contínuo - 250 µg/mL	$9{,}14\times10^{-6}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Pepsina contínuo - 250 µg/mL	$2{,}28\times10^{-5}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$6{,}04\times10^{-3}$
Pepsina em etapas - 25 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$6{,}44\times10^{-3}$
Dia 14		
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Controle	$9{,}49\times10^{-11}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$1{,}71\times10^{-5}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$1{,}06\times10^{-3}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$1{,}29\times10^{-7}$
Tripsina em etapas - 25 µg/mL	Controle	$5{,}75\times10^{-14}$
Tripsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$2{,}05\times10^{-7}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Controle	$2{,}81\times10^{-7}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Controle	$9{,}25\times10^{-9}$
Colagenase contínuo - 250 µg/mL	Controle	$2{,}11\times10^{-2}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Controle	$1{,}69\times10^{-7}$
Colagenase em etapas - 25 µg/mL	Controle	$2{,}02\times10^{-6}$

Colagenase em etapas - 250 µg/mL	Controle	$2{,}32\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Controle	$9{,}14\times10^{-7}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$1{,}07\times10^{-11}$
Pepsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$4{,}73\times10^{-5}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$4{,}82\times10^{-9}$
Pepsina em etapas - 25 µg/mL	Controle	$5{,}18\times10^{-4}$
Pepsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$9{,}14\times10^{-5}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina contínuo - 25 µg/mL	$2{,}07\times10^{-2}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$4{,}87\times10^{-7}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$2{,}94\times10^{-5}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 25 µg/mL	$2{,}86\times10^{-3}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$1{,}08\times10^{-5}$
Tripsina em etapas - 25 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$1{,}36\times10^{-5}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 5 µg/mL	$2{,}67\times10^{-4}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Tripsina em etapas - 25 µg/mL	$8{,}61\times10^{-3}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$5{,}36\times10^{-9}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$6{,}97\times10^{-6}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$1{,}53\times10^{-6}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 25 µg/mL	$1{,}75\times10^{-4}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$1{,}69\times10^{-6}$
Colagenase em etapas - 25 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$5{,}64\times10^{-4}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 5 µg/mL	$1{,}29\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase em etapas - 25 µg/mL	$6{,}29\times10^{-8}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina contínuo - 25 µg/mL	$3{,}61\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina contínuo - 250 µg/mL	$1{,}04\times10^{-5}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Pepsina contínuo - 250 µg/mL	$1{,}19\times10^{-3}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 25 µg/mL	$5{,}68\times10^{-3}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$5{,}02\times10^{-4}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 5 µg/mL	$2{,}41\times10^{-4}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Pepsina em etapas - 25 µg/mL	$3{,}29\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 250 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$2{,}29\times10^{-3}$
Dia 21		
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Controle	$4{,}39\times10^{-4}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$2{,}68\times10^{-4}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$4{,}44\times10^{-6}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$3{,}69\times10^{-8}$
Tripsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$8{,}12\times10^{-5}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Controle	$1{,}33\times10^{-2}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Controle	$1{,}19\times10^{-5}$
Colagenase contínuo - 250 µg/mL	Controle	$1{,}61\times10^{-6}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Controle	$2{,}32\times10^{-2}$
Colagenase em etapas - 25 µg/mL	Controle	$1{,}54\times10^{-4}$
Colagenase em etapas - 250 µg/mL	Controle	$9{,}22\times10^{-9}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Controle	$3{,}93\times10^{-7}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Controle	$3{,}15\times10^{-7}$
Pepsina contínuo - 250 µg/mL	Controle	$5{,}28\times10^{-7}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Controle	$1{,}36\times10^{-5}$
Pepsina em etapas - 25 µg/mL	Controle	$1{,}85\times10^{-7}$
Pepsina em etapas - 250 µg/mL	Controle	$2{,}09\times10^{-9}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$5{,}11\times10^{-5}$

Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina contínuo - 250 µg/mL	$5{,}41\times10^{-5}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 25 µg/mL	$6{,}91\times10^{-4}$
Tripsina em etapas - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$5{,}91\times10^{-5}$
Tripsina em etapas - 25 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$8{,}16\times10^{-3}$
Tripsina contínuo - 5 µg/mL	Tripsina em etapas - 5 µg/mL	$3{,}39\times10^{-6}$
Tripsina contínuo - 25 µg/mL	Tripsina em etapas - 25 µg/mL	$2{,}13\times10^{-3}$
Tripsina contínuo - 250 µg/mL	Tripsina em etapas - 250 µg/mL	$4{,}32\times10^{-5}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase contínuo - 25 µg/mL	$2{,}29\times10^{-3}$
Colagenase contínuo - 5 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$3{,}33\times10^{-5}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase contínuo - 250 µg/mL	$3{,}22\times10^{-5}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 25 µg/mL	$6{,}27\times10^{-4}$
Colagenase em etapas - 5 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$1{,}79\times10^{-5}$
Colagenase em etapas - 25 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$2{,}71\times10^{-5}$
Colagenase contínuo - 25 µg/mL	Colagenase em etapas - 25 µg/mL	$3{,}95\times10^{-6}$
Colagenase contínuo - 250 µg/mL	Colagenase em etapas - 250 µg/mL	$1{,}4\times10^{-4}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina contínuo - 250 µg/mL	$3{,}48\times10^{-2}$
Pepsina em etapas - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$2{,}32\times10^{-2}$
Pepsina em etapas - 25 µg/mL	Pepsina em etapas - 250 µg/mL	$1{,}51\times10^{-2}$
Pepsina contínuo - 5 µg/mL	Pepsina em etapas - 5 µg/mL	$8{,}42\times10^{-6}$
Pepsina contínuo - 25 µg/mL	Pepsina em etapas - 25 µg/mL	$1{,}79\times10^{-4}$

ANEXO XII

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Diferenciação obteoblástica *in vitro*: Quantificação da atividade da ARS para SHEDs

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
Dia 14		
Tripsina - em etapas	Controle	$3{,}05\times10^{-2}$
Pepsina - em etapas	Controle	$1{,}61\times10^{-2}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$4{,}09\times10^{-2}$
Dia 21		
Tripsina - em etapas	Controle	$2{,}87\times10^{-2}$
Pepsina - em etapas	Controle	$3{,}73\times10^{-2}$
Tripsina - em etapas	Pepsina - em etapas	$2{,}79\times10^{-3}$

ANEXO XIII

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Diferenciação obteoblástica *in vitro*: Quantificação da atividade da ARS para MO-58

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
Dia 14		
Tripsina - contínuo	Controle	$1{,}22\times10^{-9}$
Tripsina - em etapas	Controle	$2{,}15\times10^{-7}$
Colagenase - contínuo	Controle	$6{,}96\times10^{-6}$
Colagenase - em etapas	Controle	$3{,}75\times10^{-9}$
Pepsina - contínuo	Controle	$3{,}91\times10^{-8}$
Pepsina - em etapas	Controle	$4{,}71\times10^{-4}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$1{,}85\times10^{-2}$

Tripsina - em etapas	Pepsina - em etapas	$7{,}19\times10^{-4}$
Tripsina - em etapas	Colagenase - em etapas	$4{,}79\times10^{-3}$
Colagenase - em etapas	Pepsina - em etapas	$6{,}16\times10^{-5}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$2{,}45\times10^{-3}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$3{,}91\times10^{-2}$
Pepsina - contínuo	Pepsina - em etapas	$2{,}89\times10^{-3}$
Dia 21		
Pepsina - contínuo	Controle	$7{,}29\text{x}10^{-5}$
Colagenase - contínuo	Controle	$2{,}97\times10^{-4}$
Tripsina - em etapas	Controle	$1{,}41\times10^{-9}$
Pepsina - em etapas	Controle	$4{,}13\text{x}10^{-2}$
Colagenase - em etapas	Controle	$1{,}88\times10^{-5}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$4{,}83\times10^{-2}$
Tripsina - em etapas	Pepsina - em etapas	$1{,}55\times10^{-4}$
Tripsina - em etapas	Colagenase - em etapas	$3{,}1\times10^{-2}$
Colagenase - em etapas	Pepsina - em etapas	$4{,}12\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$3{,}4\times10^{-8}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$4{,}98\times10^{-5}$
Pepsina - contínuo	Pepsina - em etapas	$3{,}16\times10^{-3}$

ANEXO XIV

Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Adesão Celular (Alamar Blue) para BMMSCs MO-58

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
4h		
Tripsina - contínuo	Controle	$4{,}9\times10^{-6}$
Tripsina - em etapas	Controle	$6{,}28\times10^{-8}$
Colagenase - em etapas	Controle	$3{,}12\times10^{-7}$
Colagenase - contínuo	Controle	$1{,}1\times10^{-9}$
Pepsina - contínuo	Controle	$2{,}71\text{x}10^{-5}$
Pepsina - em etapas	Controle	$7{,}82\text{x}10^{-8}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$1{,}41\times10^{-2}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$8{,}07\times10^{-3}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$4{,}98\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$3{,}29\times10^{-2}$
Tripsina - em etapas	Colagenase - em etapas	$4{,}42\times10^{-2}$

ANEXO XV

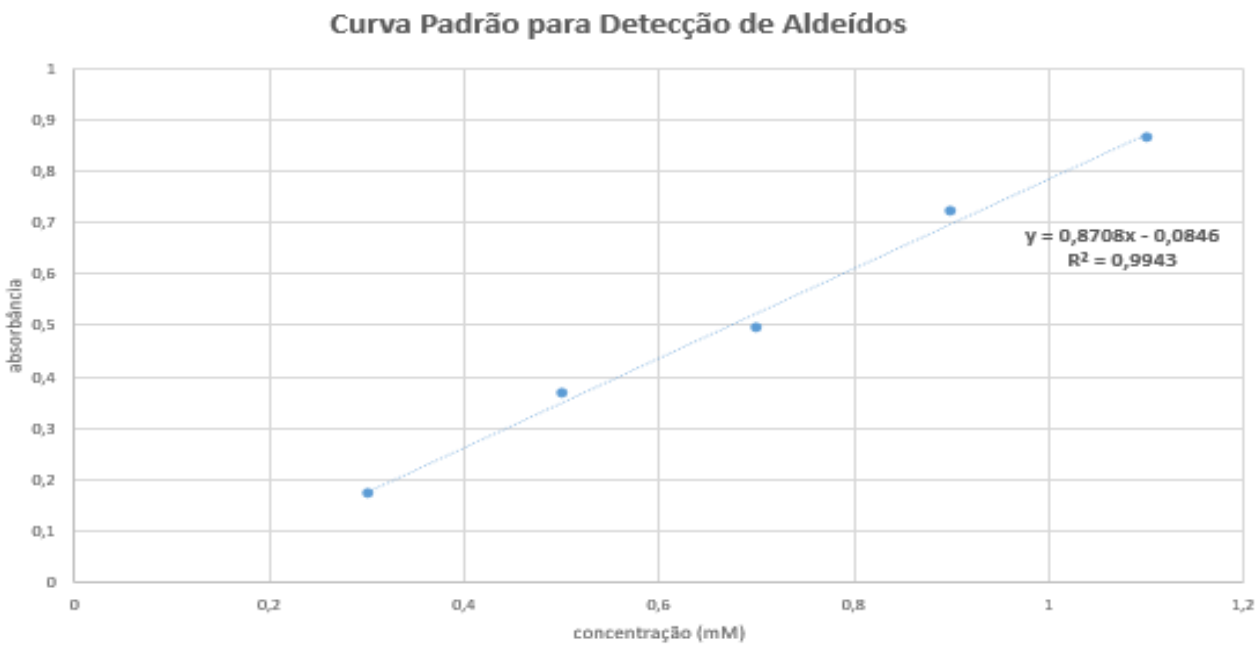
Tabela de p-valores significativos para o teste-t de Student (α = 0,05) – Proliferação Celular (Alamar Blue) para BMMSCs MO-58

Amostra 1	Amostra 2	p-valor
Dia 4		
Tripsina - contínuo	Controle	$7{,}48\times10^{-8}$
Tripsina - em etapas	Controle	$3{,}09\times10^{-9}$
Colagenase - em etapas	Controle	$9{,}08\times10^{-8}$
Colagenase - contínuo	Controle	$3{,}47\times10^{-6}$

Pepsina - contínuo	Controle	$1,48x10^{-5}$
Pepsina - em etapas	Controle	$6,33x10^{-7}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$2,15\times10^{-3}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$8,05\times10^{-5}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$7,82\times10^{-4}$
Colagenase - em etapas	Tripsina - em etapas	$1,88\times10^{-2}$
Pepsina - em etapas	Tripsina - em etapas	$1,88\times10^{-4}$
Dia 8		
Tripsina - contínuo	Controle	$9,84\times10^{-9}$
Tripsina - em etapas	Controle	$1,03\times10^{-7}$
Colagenase - em etapas	Controle	$4,68\times10^{-6}$
Colagenase - contínuo	Controle	$1,56\times10^{-6}$
Pepsina - contínuo	Controle	$7,55x10^{-6}$
Pepsina - em etapas	Controle	$1,75x10^{-3}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$1,68\times10^{-2}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$1,55\times10^{-2}$
Pepsina - contínuo	Pepsina - em etapas	$4,66\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$2,76\times10^{-3}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$3,44\times10^{-3}$
Tripsina - em etapas	Pepsina - em etapas	$6,89\times10^{-3}$
Colagenase - em etapas	Tripsina - em etapas	$1,18\times10^{-4}$
Dia 12		
Tripsina - contínuo	Controle	$1,26\times10^{-6}$
Tripsina - em etapas	Controle	$9,99\times10^{-4}$
Colagenase - contínuo	Controle	$1,08\times10^{-3}$
Pepsina - contínuo	Controle	$1,36x10^{-4}$
Pepsina - em etapas	Controle	$3,41x10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$3,89\times10^{-3}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$8,07\times10^{-3}$
Pepsina - contínuo	Pepsina - em etapas	$1,08\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$1,57\times10^{-2}$
Colagenase - em etapas	Tripsina - em etapas	$2,28\times10^{-2}$
Dia 15		
Tripsina - contínuo	Controle	$1,31\times10^{-7}$
Tripsina - em etapas	Controle	$6,18\times10^{-6}$
Colagenase - contínuo	Controle	$2,06\times10^{-3}$
Colagenase - em etapas	Controle	$1,09\times10^{-6}$
Pepsina - em etapas	Controle	$= 2,14x10^{-4}$
Tripsina - contínuo	Tripsina - em etapas	$5,33\times10^{-5}$
Colagenase - contínuo	Colagenase - em etapas	$1,72\times10^{-4}$
Pepsina - contínuo	Pepsina - em etapas	$3,09\times10^{-4}$
Tripsina - contínuo	Colagenase - contínuo	$1,21\times10^{-2}$
Tripsina - contínuo	Pepsina - contínuo	$1,04\times10^{-3}$
Tripsina - em etapas	Pepsina - em etapas	$1,08\times10^{-2}$
Colagenase - em etapas	Pepsina - em etapas	$4,53\times10^{-3}$

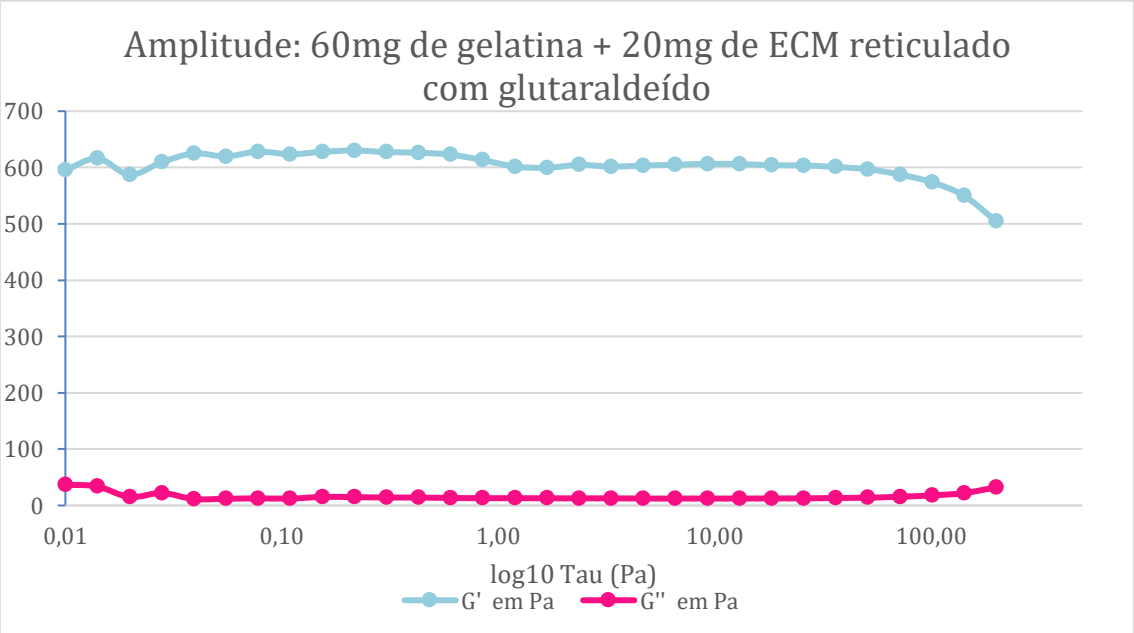
ANEXO XVI

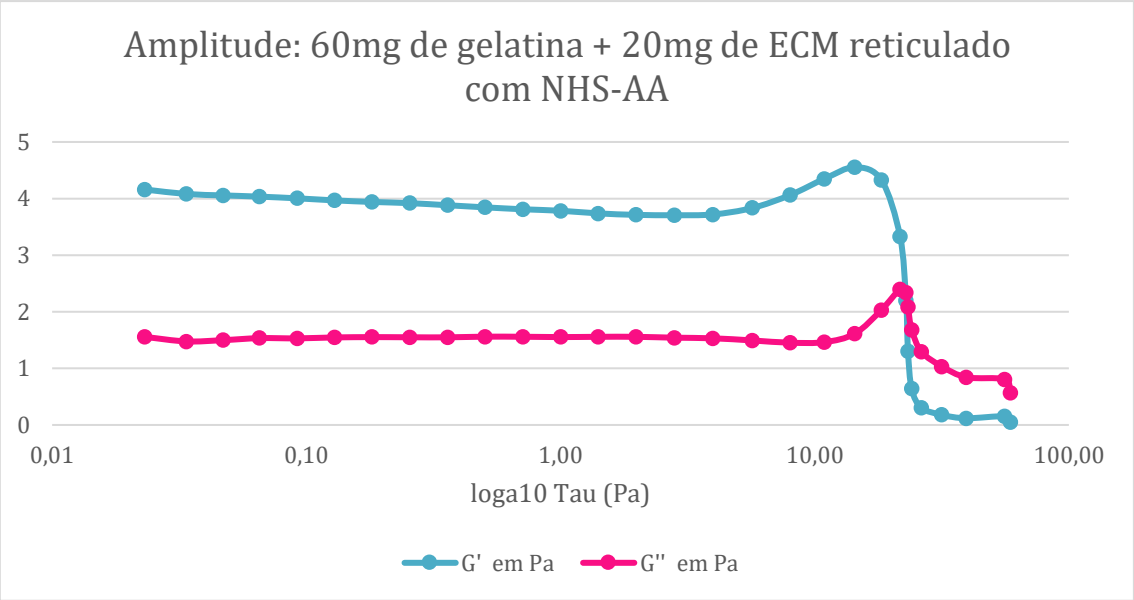
Curva padrão para detecção de aldeídos, utilizando acetaldeído e Reagente de Schiff

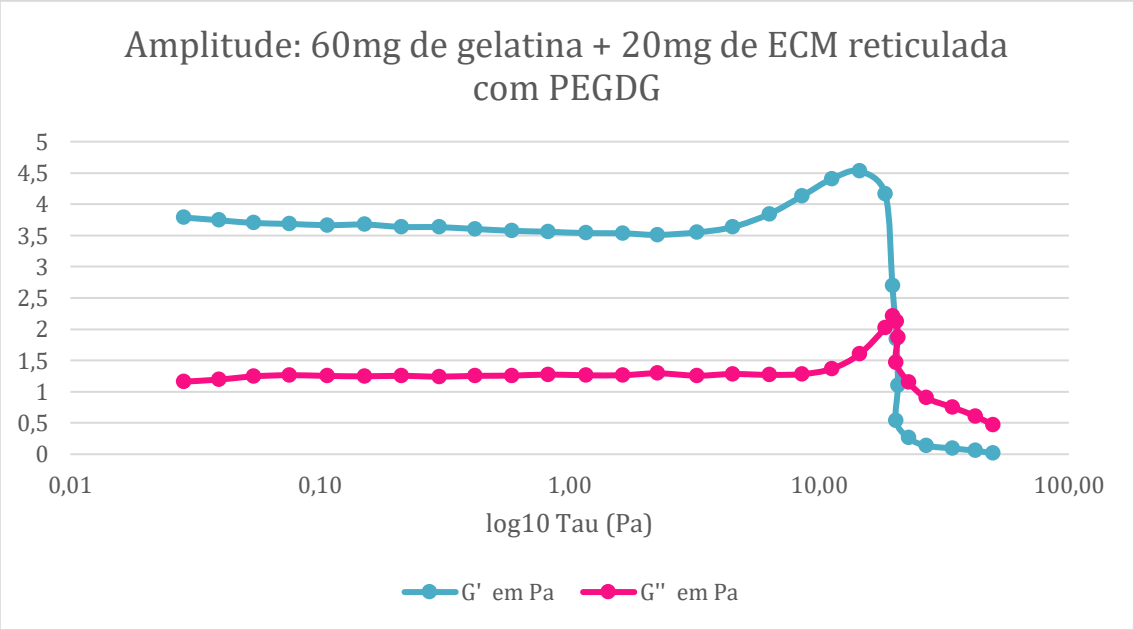


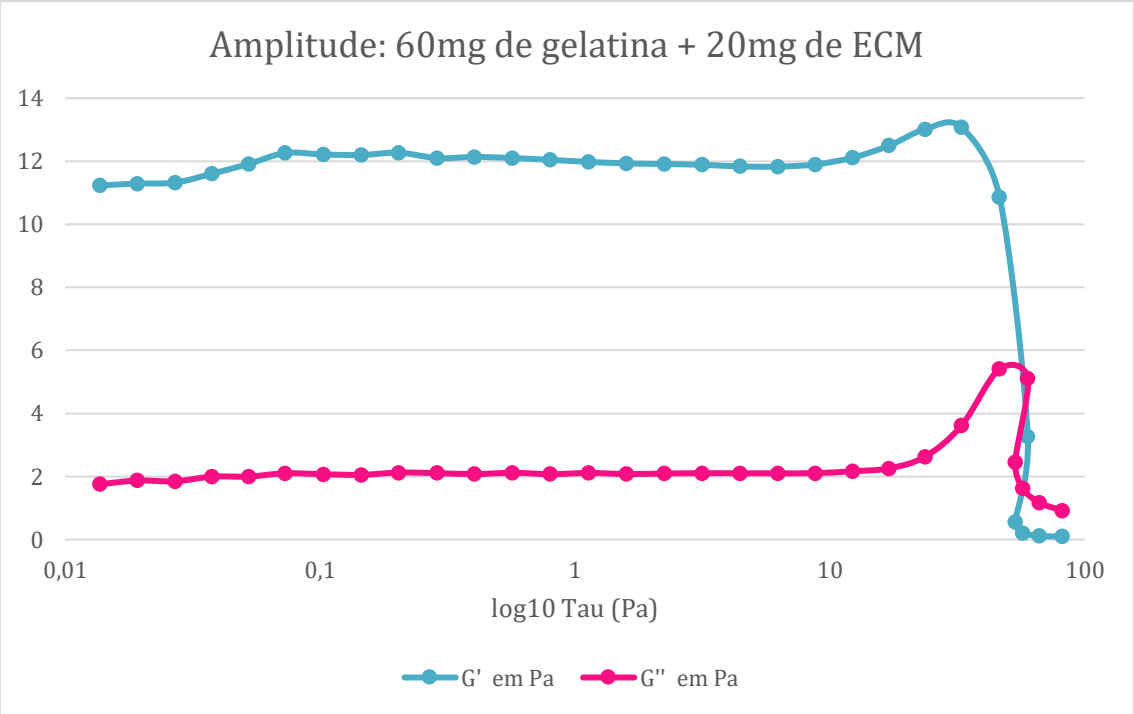
ANEXO XVII

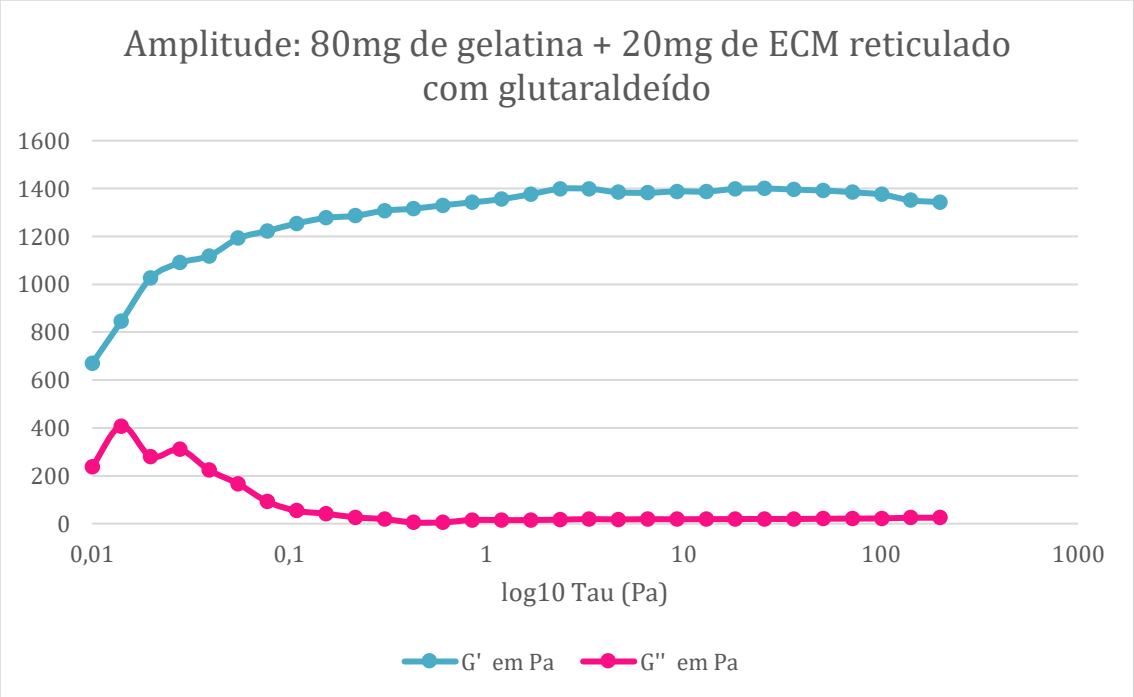
Gráficos de reogolia – amplitude

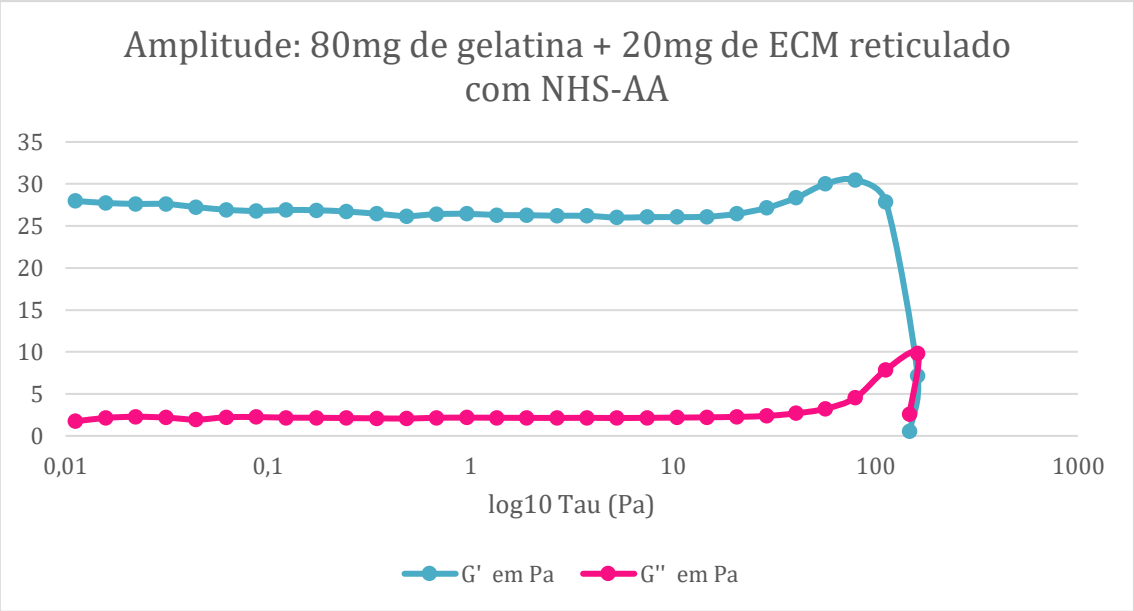


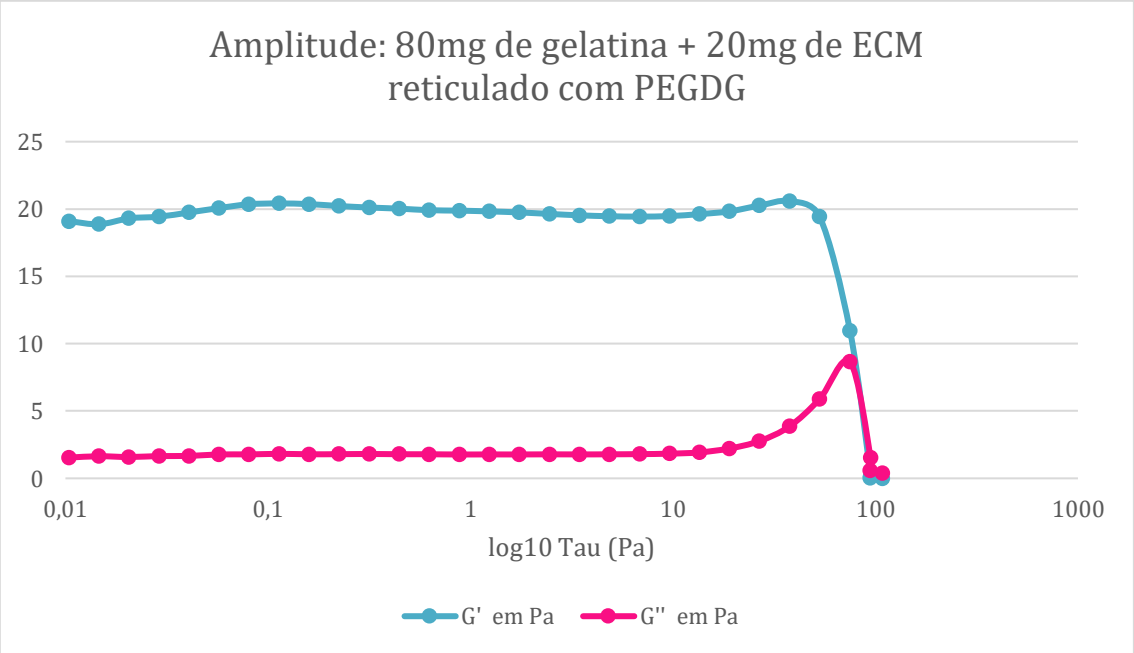

Amplitude: 60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com NHS-AA
5
4
3
2
1
0
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
loga10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa

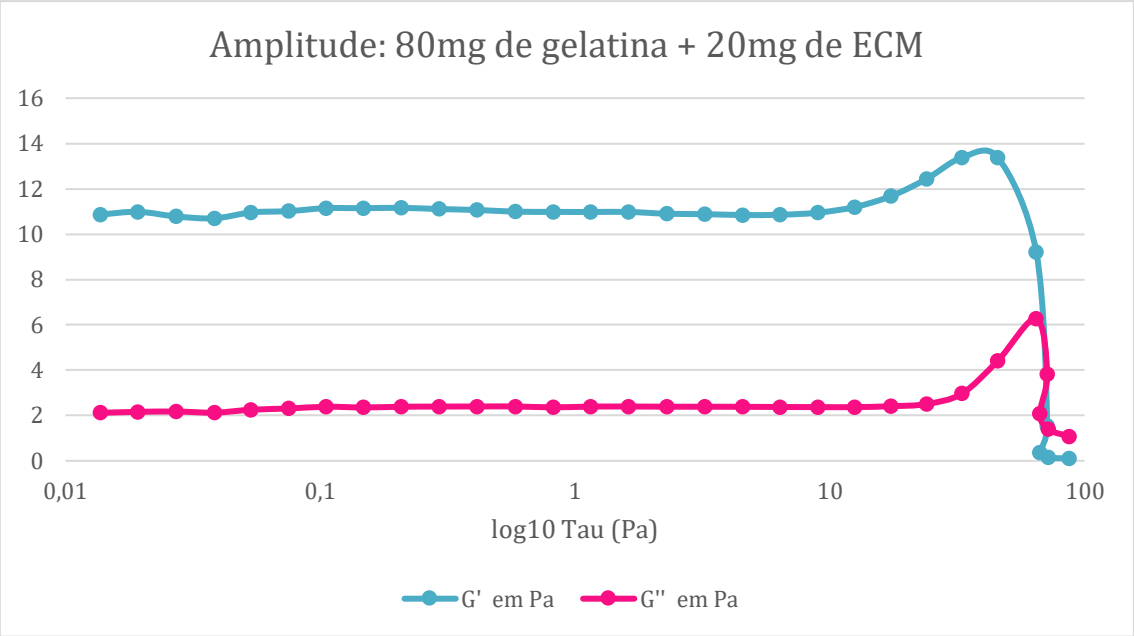

Amplitude: 60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulada com PEGDG
5
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
log10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa


Amplitude: 60mg de gelatina + 20mg de ECM
14
12
10
8
6
4
2
0
0,01
0,1
1
10
100
log10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa


Amplitude: 80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com glutaraldeído
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
log10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa

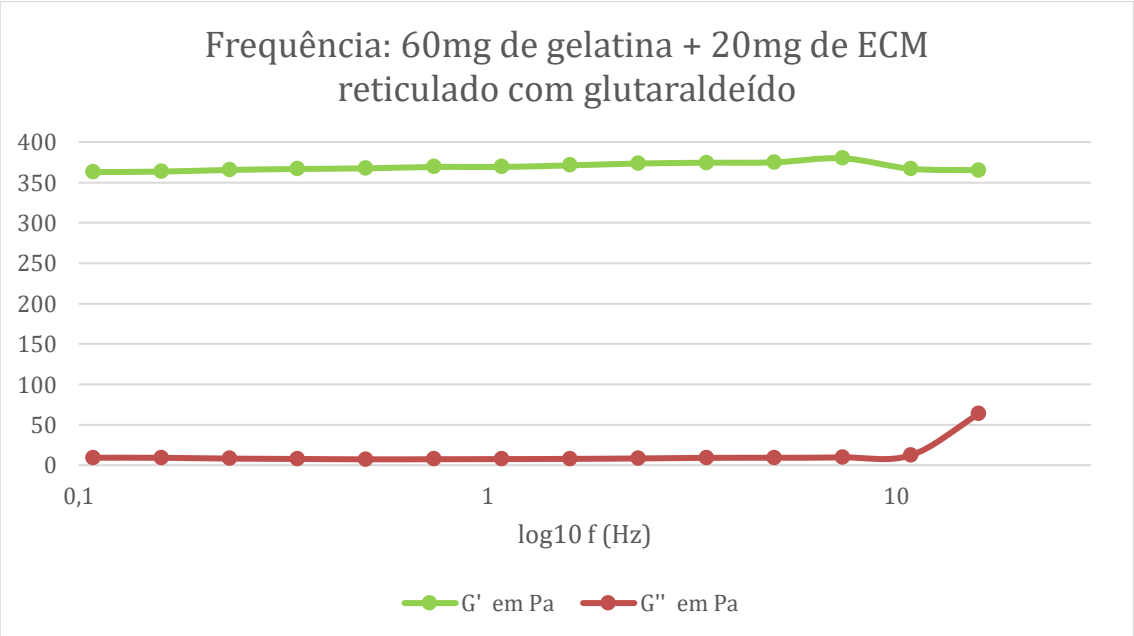

Amplitude: 80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com NHS-AA
35
30
25
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
log10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa

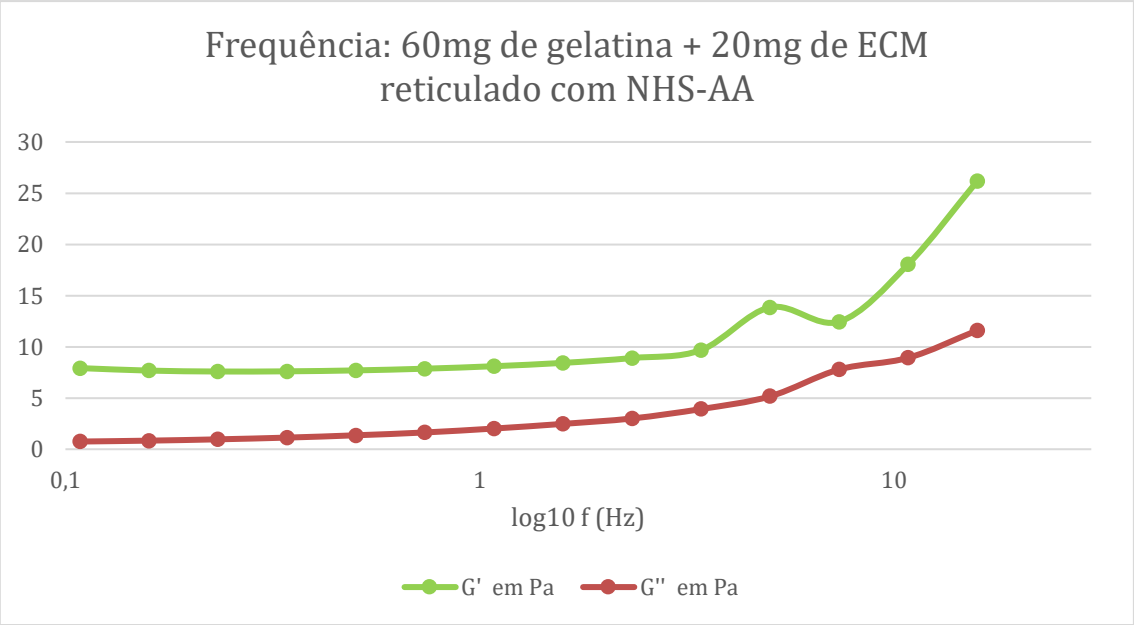

Amplitude: 80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com PEGDG
25
20
15
10
5
0
0,01
0,1
1
10
100
1000
log10 Tau (Pa)
G' em Pa
G'' em Pa

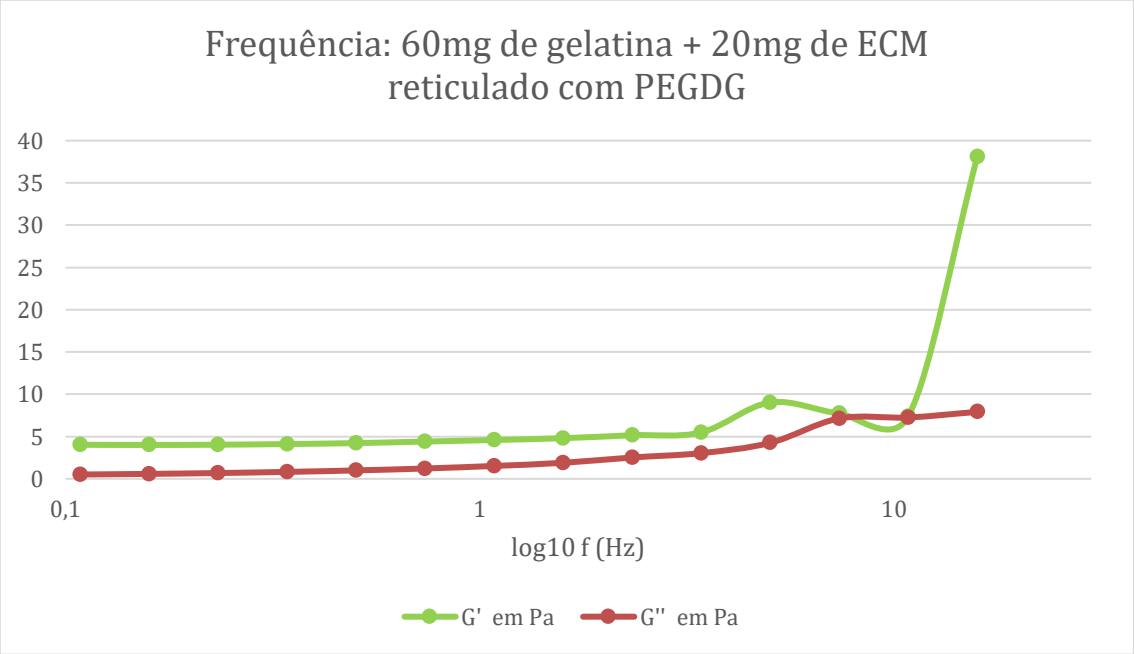


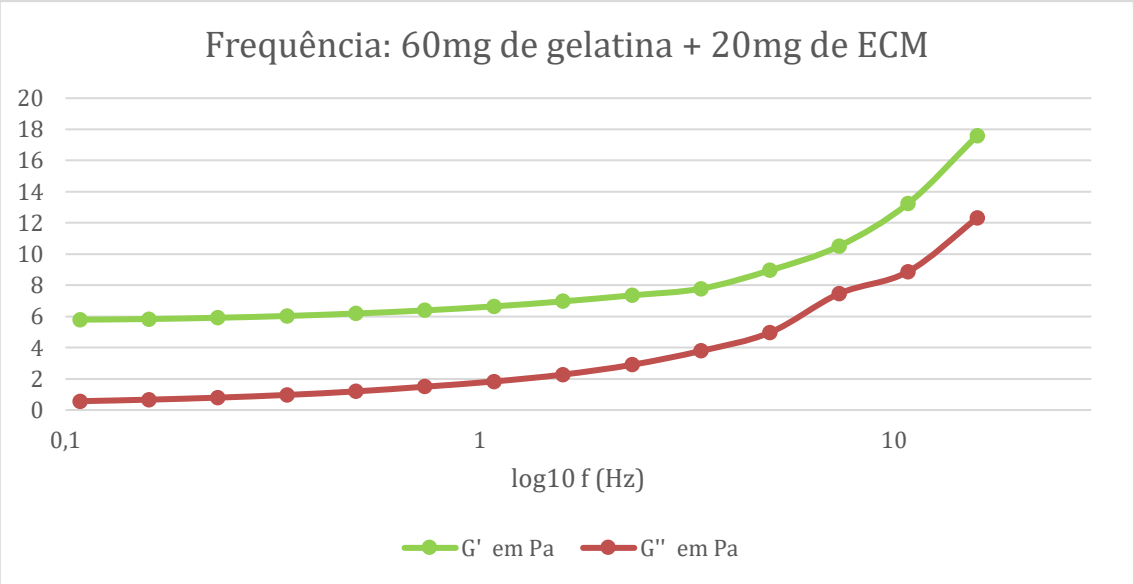
ANEXO XVII

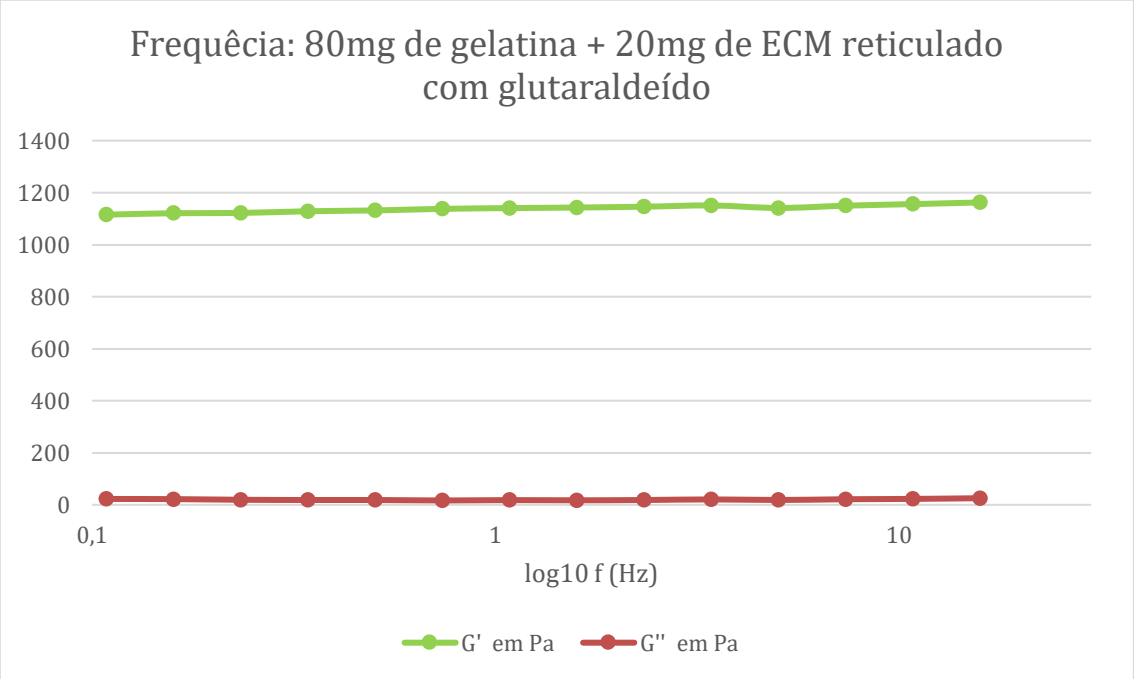
Gráficos de reogolia – frequência

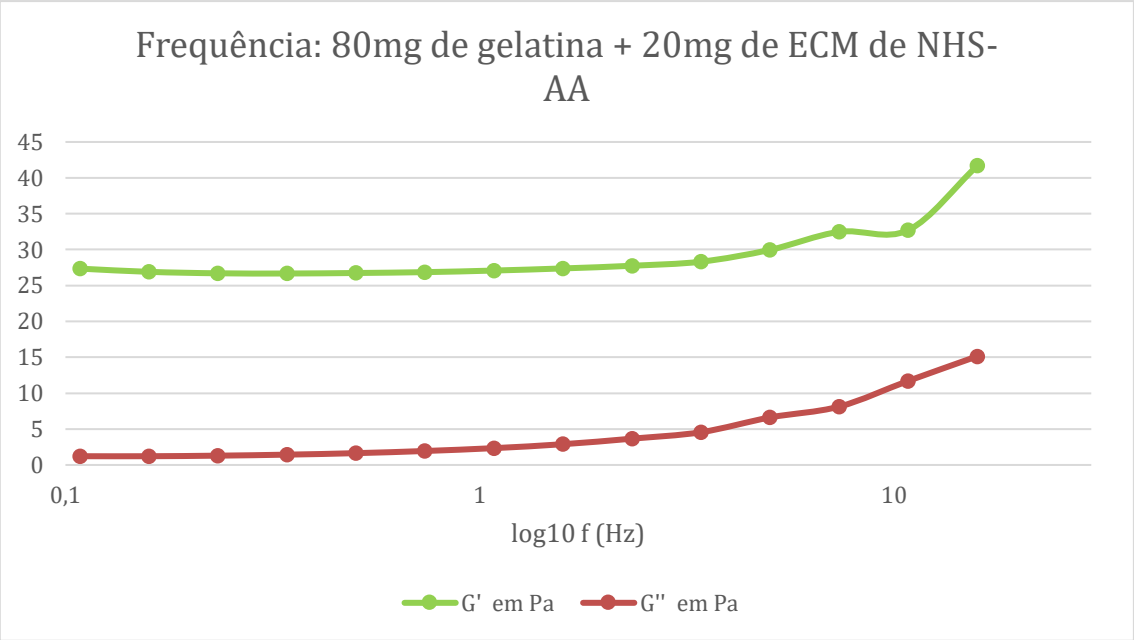


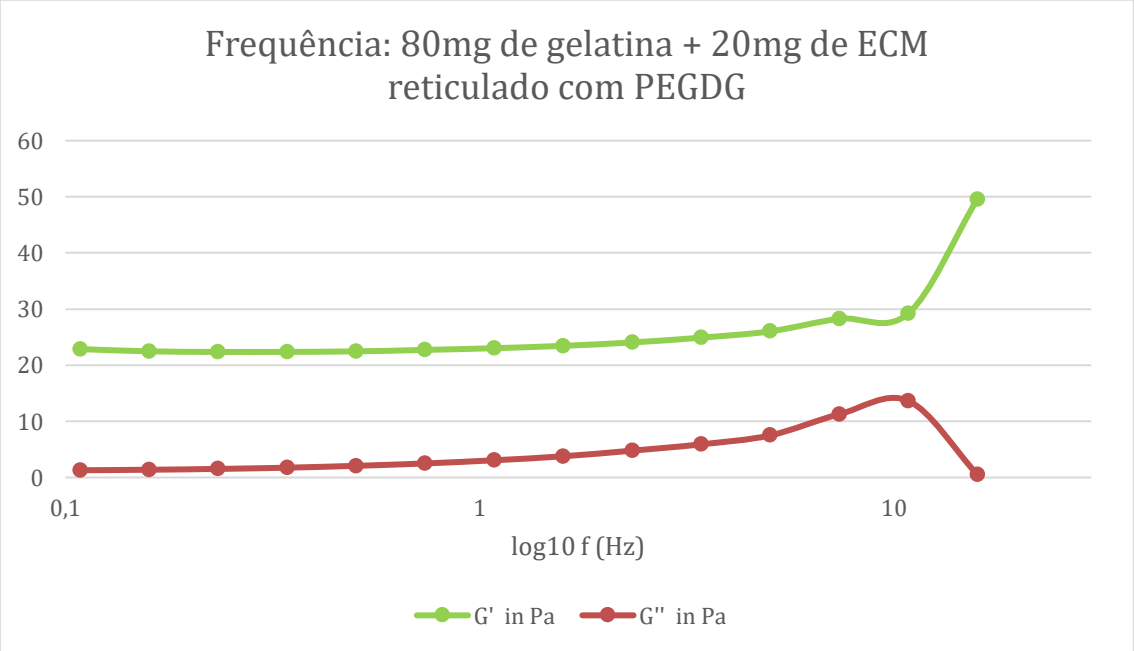

Frequência: 60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com NHS-AA
30
25
20
15
10
5
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa

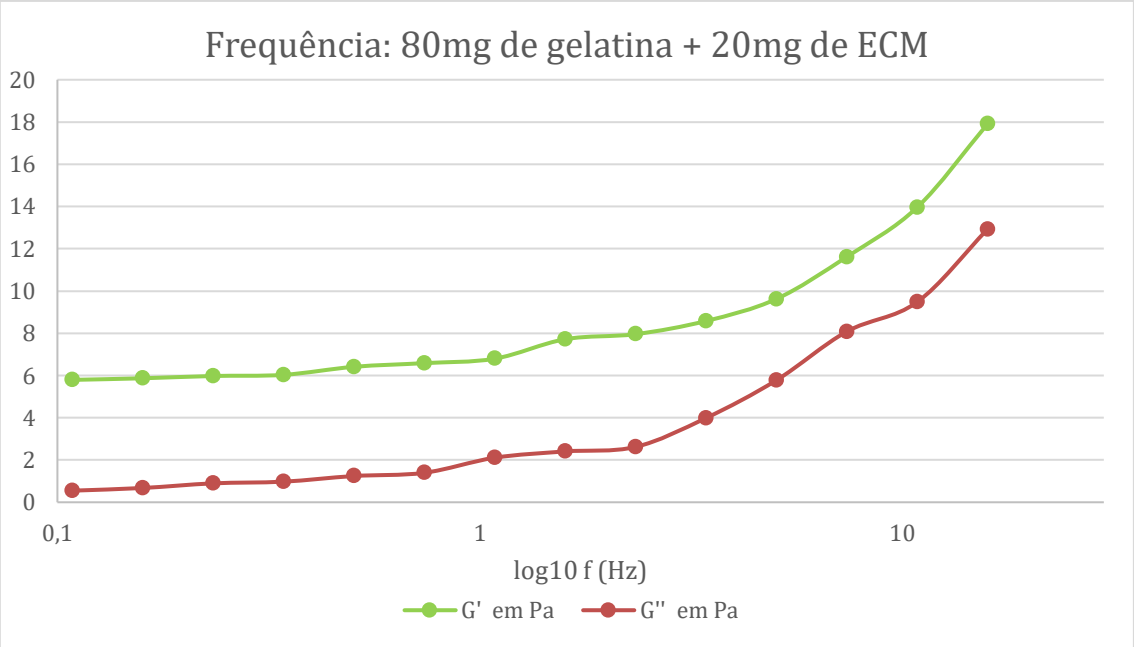

Frequência: 60mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com PEGDG
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa


Frequência: 60mg de gelatina + 20mg de ECM
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa


Frequêcia: 80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com glutaraldeído
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa


Frequência: 80mg de gelatina + 20mg de ECM de NHS-AA
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa


Frequência: 80mg de gelatina + 20mg de ECM reticulado com PEGDG
60
50
40
30
20
10
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' in Pa
G'' in Pa


Frequência: 80mg de gelatina + 20mg de ECM
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0,1
1
10
log10 f (Hz)
G' em Pa
G'' em Pa

SÚMULA CURRICULAR

Gabriela M. Monteiro Lobato
01 de outubro de 1990. São Paulo – SP, Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016 – atual Mestrado em Química
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – Laboratório de Biomateriais Poliméricos (LBP)
Título: Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos (bolsa CNPq)

2011 – 2015 Bacharelado em Biotecnologia
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2015

Mar/2014 – Dez/2014 Iniciação científica em bioquímica e biologia molecular – Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (LBGA)
Trabalho de conclusão de Curso: Identificação de linhagens de Saccharomyces cerevisae resistentes à alta concentração de sacarose.

Jan/2013 – Dez/2013 Iniciação científica em biologia celular e produtos naturais – Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN)
Título: Efeitos da cedrelona, uma substância isolada da Trichilia catigua, na angiogênese (bolsa FAPESP).

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Jan/2015 – Dez/2015 Estagiária do programa CarreirAché – Pesquisa e Desenvolvimento/ Patentes
Aché Laboratórios Farmacêuticos, Guarulhos, Brasil.
Área: Novas moléculas sintéticas e patentes

Jan/2014 – Fev/2014 Estágio de Verão: Programa Bolsas de Verão do CNPEM
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Laboratório Nacional de Biociências – Facility de Espectroscopia de Massas, Campinas, Brasil
Área: Câncer e proteômica

Set/2012 – Ago/2014 Análista Financeiro
Consultoria e Soluções em Biotecnologia Jr. (CSB Jr.), São Carlos, Brasil

TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

1. **Monteiro Lobato, G. M**.; Catalani, L. H. Gelation study of extracellular matrix digestion products for tissue engineering In: 49th IUPAC World Chemistry Congress, 2017, São Paulo. 49th IUPAC World Chemistry Congress, 2017.

2. **Monteiro Lobato, G. M**.; Russo, P.S.T.; Winck, F.V.; Catalani, L. H. Gelation Study of Extracellular Matrix Digestion Products for Tissue Engineering. In: SPCell Workshop – São Paulo School for Advanced Science in Cell Biology, 2018, São Paulo. SPCell Workshop – São Paulo School for Advanced Science in Cell Biology, 2018.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANUAIS

1. Amaral Montanheiro, T. L., Montagna, L. S., Patrulea, V., Jordan, O., Borchard, G., Lobato, G. M. M., ... & Lemes, A. P. Evaluation of cellulose nanocrystal addition on morphology, compression modulus and cytotoxicity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) scaffolds. *Journal of Materials Science*, 1-13.

2. Moitas, M. L.; Monteiro Lobato, G.M.; Cunha-Santino, M. B.; Matos, D. M. S.. First record of herbivory of the invasive macrophyte Hedychium coronarium J. König (Zingiberaceae). *Biota Neotropica*, v. 13, p. 368-370, 2013.