



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

WANDERSON GABRIEL GOMES DE MELO

**INTEGRAÇÃO DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS E BIOLÓGICOS PARA
AVALIAÇÃO DE HIDROGEL DE GOMA DE MANDIOCA INCORPORADO COM
CRISINA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Teresina, PI

2025

WANDERSON GABRIEL GOMES DE MELO

**INTEGRAÇÃO DE MÉTODOS COMPUTACIONAIS E BIOLÓGICOS PARA
AVALIAÇÃO DE HIDROGEL DE GOMA DE MANDIOCA INCORPORADO COM
CRISINA NA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência.

Linha de Pesquisa: Biotecnologia Celular e Aplicabilidades.

Orientador: Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto.

TERESINA. PI

2025

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

M528i Melo, Wanderson Gabriel Gomes de.
Integração de métodos computacionais e biológicos para
avaliação de hidrogel de goma de mandioca incorporado com crisina
na regeneração óssea. / Wanderson Gabriel Gomes de Melo. -- 2025.
86 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias
Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2025.

“Orientador: Prof. Dr. “Napoleão Martins Argôlo Neto.”

1. Crisina. 2. Hidrogel. 3. Osteoindução. 4. Imunomodulação. I.
Argôlo Neto, Napoleão Martins. II. Título.

CDD 631.52

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

Integração de métodos computacionais e biológicos para avaliação de hidrogel de goma de mandioca incorporado com crisina na regeneração óssea

Wanderson Gabriel Gomes de Melo

Banca examinadora:



Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto

(Presidente / Orientador) / NUPCELT / CCA / UFPI



Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima

(Examinador Externo) UESPI



Prof. Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

(Examinador Externo) / LIMAV/CCN/UFPI



Prof. Dr. José Milton Elias de Matos

(Examinador Externo) LIMAV/CCN/UFPI

Dedico,
A Deus, nosso Pai Celestial,
À minha mãe, por ser meu porto-seguro,
À minha família, por ser meu alicerce,
E ao meu gato, pela fiel companhia.
Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua misericórdia constante, por ter me sustentado nas dificuldades e me guiado com sabedoria ao longo desta caminhada acadêmica.

À minha família, base e alicerce de tudo o que sou. Em especial, agradeço à minha mãe, Sheila, e ao meu pai, Gabriel, pelo amor incondicional, pela paciência, pelos ensinamentos e por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais incertos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Napoleão, cuja orientação se estende desde 2017, agradeço profundamente pela confiança depositada, pela dedicação, pelas correções rigorosas e por ter sido um verdadeiro mestre em minha trajetória científica.

À Profa. Dra. Maria Acelina, minha eterna gratidão por ter enxergado potencial em mim quando eu ainda estava dando meus primeiros passos. Foi por sua generosidade e sensibilidade que tive a oportunidade de ingressar no núcleo e trilhar este caminho.

Aos amigos que caminharam comigo nesta jornada, oferecendo apoio, incentivo e companheirismo inestimáveis: Camile, Marina, Nayla, Sávvia, Vitória, Leticya, Louenny e Kamila. À Professora Dra. Dayseanny, também do NUPCelt, agradeço pela escuta, pelo incentivo e pelas contribuições acadêmicas e pessoais. Estendo minha gratidão à Dra. Regina, pesquisadora de pós-doutorado, pela atenção, disponibilidade e pelas orientações valiosas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional (PPGTAIR), por proporcionar a estrutura acadêmica e científica essencial ao desenvolvimento deste trabalho. À CAPES e à FAPEPI, pelo apoio financeiro e institucional, fundamentais para a realização desta pesquisa.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para este percurso, deixo registrado meu mais sincero e respeitoso agradecimento.

“Você não tem que lutar para ser melhor que ninguém, você precisa lutar para ser melhor a cada dia consigo mesmo.”

Olavo Luiz Pimentel de Carvalho (1947-2022)

Filósofo, escritor e ensaísta brasileiro

Condecorado com a ordem do Rio Branco grau de Grã-cruz
por serviços excepcionais prestados à Nação.

RESUMO

A busca por biomateriais que otimizem a reparação óssea é uma demanda crescente na medicina moderna, exigindo materiais que mimetizem a matriz extracelular, promovam neoformação óssea e modulem a resposta inflamatória. Hidrogéis baseados em polissacarídeos naturais, como o de goma de mandioca (HGM), emergem como plataformas promissoras devido às propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, modulabilidade estrutural *in vitro* e disponibilidade na flora regional. A crisina, um flavonoide natural encontrado em plantas, mel e própolis, possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e osteoprotetoras *in vitro* possivelmente relevantes para o reparo ósseo. Contudo, estudos com a interação entre HGM e crisina na reparação óssea ainda são escassos. Diante disso, este estudo teve como objetivo investigar a interação entre a molécula de crisina e o HGM, bem como a integração de suas propriedades físico-químicas para as características fisiopatológicas de interesse à reparação óssea, num modelo *in silico*, como etapa preditora para um futuro estudo *in vitro*. Para tal, utilizou-se uma abordagem multifacetada, combinando validações experimentais preliminares *in vitro* e previsões computacionais *in silico*. Os ensaios *in vitro* confirmaram a biocompatibilidade do HGM puro, demonstrando ser não-hemolítico (<5% de hemólise), não citotóxico para células sinalizadoras medicinais (MSCs), e induzir uma resposta inflamatória inicial moderada em macrófagos, compatível com as descrições prévias de reparação óssea. Complementarmente, as investigações *in silico* predisseram o potencial bioativo da crisina e a viabilidade da funcionalização HGM-Cr, identificando alvos chave em vias osteoimunológicas (PPARG, GSK-3B, ESR1, PTGS2, PARP1), interações favoráveis com proteínas relevantes por docking molecular, um perfil ADMET predito compatível com aplicação local, e a viabilidade termodinâmica da formação do complexo HGM-crisina por DFT. Embora a validação experimental direta *in vitro* da formulação incorporada (HGM-Cr) seja uma limitação do estudo, a combinação da biocompatibilidade experimental comprovada da matriz HGM com as fortes previsões *in silico* sobre a crisina e sua interação justificam racionalmente a proposta da formulação HGM-Cr como um biomaterial funcional biointerativo para estudos *in vitro* de osteocondução e osteointegração. Além disso, etapas *in silico* podem contribuir para a prospecção de baixo custo de biomateriais bioativos, com perspectiva de uso na medicina regenerativa.

Palavras-chave: crisina, hidrogel, osteoindução, imunomodulação, rede PPI.

ABSTRACT

The search for biomaterials that optimize bone repair is a growing demand in modern medicine, requiring materials that mimic the extracellular matrix, promote bone neoformation and modulate the inflammatory response. Hydrogels based on natural polysaccharides, such as cassava gum hydrogel (CGH), emerge as promising platforms due to their biocompatibility, biodegradability, *in vitro* structural modulation and availability in regional flora. Chrysin, a natural flavonoid found in plants, honey and propolis, has anti-inflammatory, antioxidant and osteoprotective properties *in vitro* that are possibly relevant for bone repair. However, studies on the interaction between CGH and chrysin in bone repair are still scarce. Therefore, this study aimed to investigate the interaction between the chrysin molecule and CGH, as well as the integration of its physicochemical properties for the pathophysiological characteristics of interest to bone repair, in an *in silico* model, as a predictive step for a future *in vitro* study. To this end, a multifaceted approach was used, combining preliminary *in vitro* experimental validations and *in silico* computational predictions. *In vitro* assays confirmed the biocompatibility of pure CGH, demonstrating that it is non-hemolytic (<5% hemolysis), non-cytotoxic to medicinal signaling cells (MSCs), and induces a moderate initial inflammatory response in macrophages, consistent with previous descriptions of bone repair. Complementarily, *in silico* investigations predicted the bioactive potential of chrysin and the feasibility of CGH-Cr incorporation, identifying key targets in osteoimmunological pathways (PPARG, GSK-3B, ESR1, PTGS2, PARP1), favorable interactions with relevant proteins by molecular docking, a predicted ADMET profile compatible with local application, and the thermodynamic feasibility of CGH-Cr complex formation by DFT. Although direct *in vitro* experimental validation of the functionalized formulation (CGH-Cr) is a limitation of the study, the combination of the proven experimental biocompatibility of the CGH matrix with the strong *in silico* predictions about chrysin and its interaction rationally justify the proposal of the CGH-Cr formulation as a biointeractive functional biomaterial for *in vitro* studies of osteoconduction and osteointegration. Furthermore, *in silico* steps may contribute to the prospection of low-cost bioactive biomaterials, with the prospect of use in regenerative medicine.

Keywords: chrysin, hydrogel, osteoinduction, immunomodulation, PPI network.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Processo de reparo ósseo após lesão..... | 18 |
| Figura 2 – Representação esquemática do microambiente inicial da reparação tecidual..... | 19 |
| Figura 3 – Mobilização e diferenciação celular na fase proliferativa do reparo ósseo..... | 20 |
| Figura 4 – Micrografia mostrando a formação do tecido ósseo..... | 21 |
| Figura 5 – Regulação da Sclerostina na homeostase óssea..... | 23 |
| Figura 6 – Representação esquemática das três principais propriedades de um biomaterial osteoindutor..... | 24 |
| Figura 7 – Diversidade de componentes utilizados na formulação de biomateriais naturais e sintéticos para aplicações na regeneração tecidual..... | 25 |
| Figura 8 – Representação do uso de hidrogel funcionalizado com compostos bioativos na regeneração de lesões ósseas..... | 26 |
| Figura 9 – Sinalização da Via BMP-2 na diferenciação osteogênica..... | 30 |
| Figura 10 – Interação entre as vias de sinalização Wnt/ β -catenina e BMP-2 na osteogênese..... | 31 |
| Figura 11 – Interação das células-sinalizadoras medicinais (MSC) com o sistema imunológico na modulação da resposta inflamatória e regeneração óssea..... | 32 |
| Figura 12 – Estrutura 2D e 3D da molécula da crisina..... | 33 |

Capítulo 1:

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Imagens representativas da morfologia celular após 96 horas de cultivo..... | 47 |
| Figura 2 – Avaliação da biocompatibilidade do hidrogel de goma de mandioca (HGM)..... | 48 |
| Figura 3 – Interseção e conectividade funcional entre os genes-alvo da crisina e os genes relacionados à osteogênese..... | 50 |
| Figura 4 – Análise de clusters da rede PPI dos genes compartilhados entre a crisina e a osteogênese..... | 53 |
| Figura 5 – Análise de Gene Ontology (GO) do Cluster 1..... | 54 |
| Figura 6 – Representações tridimensionais dos complexos formados entre a crisina e os alvos osteoimunológicos selecionados..... | 57 |
| Figura 7 – Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Métricas de centralidade calculadas para os genes compartilhados entre a crisina e a osteogênese na rede PPI..... | 51 |
| Tabela 2 – Energia de interação (kcal/mol) entre a crisina e diferentes alvos osteogênicos, em comparação com inibidores padrão utilizados como referência..... | 56 |
| Tabela 3 – Perfil farmacocinético e toxicogenômico predito para a crisina com base em ferramentas <i>in silico</i> | 59 |
| Tabela 4 – Valores de Energia Livre de Gibbs (G) e Entalpia (H) calculados pela Teoria do Funcional da Densidade | 60 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 Fisiopatogenia do reparo ósseo | 18 |
| 2.2 Biomateriais na regeneração óssea | 23 |
| 2.3 Hidrogéis como biomateriais: propriedades e aplicações | 25 |
| 2.4 Goma de mandioca como componente de hidrogéis | 27 |
| 2.5 Células sinalizadoras medicinais na regeneração óssea..... | 28 |
| 2.6 Crisina e seu potencial na medicina regenerativa e engenharia tecidual | 33 |
| 3. CAPÍTULO 1* | 35 |
| Introdução | 37 |
| Materiais e métodos | 39 |
| Obtenção do Hidrogel de Goma de Mandioca | 39 |
| Isolamento e cultivo de células-sinalizadoras medicinais (MSCs) e macrófagos peritoneais (MΦ) | 40 |
| Avaliação de biocompatibilidade de HGM | 41 |
| Farmacologia de redes aplicada à predição de alvos osteogênicos da crisina..... | 43 |
| Docking molecular com alvos envolvidos em vias osteoimunológicas | 44 |
| Predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas da crisina (ADMET)..... | 45 |
| Simulações Computacionais por Teoria do Funcional da Densidade (DFT) | 45 |
| Análise estatística | 46 |
| Resultados..... | 47 |
| Isolamento e expansão celular | 47 |
| Avaliação da biocompatibilidade do hidrogel de goma de mandioca (HGM) | 48 |
| Análise de farmacologia de redes e ontologia genética..... | 49 |
| Análise de docking molecular entre a crisina e alvos de vias osteogênicas e inflamatórias | 55 |
| Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas da crisina (ADMET)..... | 58 |
| Simulações por DFT | 59 |
| Discussão | 62 |
| Agradecimentos | 67 |
| Contribuição dos autores | 67 |
| Declaração de Interesses..... | 67 |
| Financiamento | 68 |
| Disponibilidade dos dados..... | 68 |
| Referências | 68 |

| | |
|--------------------------------|----|
| Material suplementar | 75 |
| 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS: | 76 |
| 5. REFERÊNCIAS: | 77 |
| 6. ANEXOS:..... | 84 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

A busca por biomateriais que acelerem e otimizem a reparação óssea é uma das principais demandas da medicina moderna, impulsionada pelo envelhecimento da população, pelo aumento de lesões e doenças ósseas, e pela necessidade de superar as limitações dos tratamentos convencionais (Wang *et al.*, 2024; Wubneh *et al.*, 2018). Nesse contexto, biomateriais projetados para o reparo ósseo devem apresentar propriedades imunomoduladoras, capazes de regular a resposta inflamatória local e sistêmica, além de exercerem ação antimicrobiana, antioxidante e antiapoptótica, atributos que favorecem diretamente a regeneração tecidual e contribuem para a prevenção de complicações como osteomielites e pseudoartroses, frequentemente associadas a desfechos clínicos desfavoráveis (Dec; Modrzejewski; Pawlik, 2022; Lu *et al.*, 2016). O desenvolvimento de biomateriais que integrem essas características multifuncionais é fundamental para melhorar os tratamentos reparativos e ampliar as opções terapêuticas disponíveis (Festas; Ramos; Davim, 2020).

Para uma adaptação adequada a um microambiente de reparação, os biomateriais devem apresentar semelhança à matriz extracelular, com características tridimensionais que mimetizem as estruturas proteicas de forma adequada para promover um adequado crescimento celular e a regeneração de tecidos (Ho *et al.*, 2022). Neste contexto, os hidrogéis são candidatos promissores por sua versatilidade de composição físico-químicas e estrutural. A possível combinação de hidrogéis com células, proteínas, e demais produtos bioativos pode induzir ou potencializar efeitos reparativos e imunomoduladores como a regulação da resposta antiinflamatória e ativação de fatores pro-angiogênicos. Pesquisas realizadas por Li *et al.* (2024) e Zhang *et al.* (2021), utilizando hidrogéis a base de gelatina metacrilatada contendo vesículas exossomais de células sinalizadoras medicinais (MSC) mostraram potencial osteogênico induzindo o reparo ósseo.

A goma de mandioca, um polissacarídeo natural extraído da raiz da *Manihot esculenta*, tem ganhado atenção como um componente viável para a formulação de hidrogéis, devido à sua compatibilidade com sistemas biológicos, biodegradabilidade *in vitro* e abundância na flora regional do Nordeste do Brasil (Fang *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024a). Dessa forma, apresenta um potencial promissor para a produção de hidrogéis destinados a implantes experimentais em tecidos ósseos. A goma de mandioca é rica em amilose e amilopectina. A amilose confere características de gelificação e formação de

filmes, essenciais para a estrutura de hidrogéis, enquanto a amilopectina contribui para a estabilidade e viscoelasticidade.

A capacidade da goma de mandioca de formar géis, aliada à sua alta capacidade de absorção de água, favorece a formação de estruturas porosas que mimetizam a matriz extracelular do tecido ósseo, podendo vir a facilitar a proliferação celular e o transporte de nutrientes. Além disso, a estrutura ramificada da amilopectina, juntamente com a linearidade da amilose, confere à goma de mandioca uma rede intermolecular que, teoricamente, pode ser modulada para controlar a degradação e a liberação de fatores de crescimento em implantes ósseos. A presença de grupos hidroxila em sua estrutura molecular pode permitir a modificação química para melhorar a adesão celular e a osteointegração. Além disso, a sua biodegradabilidade e não toxicidade *in vitro* são características favoráveis para o desenvolvimento de estudos *in vivo* (Das *et al.*, 2024; Fang *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2024a).

A associação de hidrogéis a substâncias com potencial antioxidante e anti-inflamatório, podem, teoricamente, otimizar os resultados da reparação do tecido ósseo. A crisina (Chr), um flavonoide natural abundantemente encontrado na própolis e no mel, especialmente aqueles provenientes da rica flora piauiense, pode ser uma alternativa economicamente viável para substituir antioxidantes sintéticos de elevado custo. Sua potente atividade antioxidante, que combate o estresse oxidativo e os danos celulares, tem sido demonstrada em estudos *in vitro* (Mani; Natesan, 2018; Oršolić *et al.*, 2022).

Este flavonóide pode modular, *in vitro*, vias moleculares associadas à inflamação, inibindo a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B (Wu *et al.*, 2022), e modular a osteogênese, promovendo a expressão de marcadores osteogênicos, como a fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN), essenciais para a diferenciação osteoblástica e a formação de matriz óssea (Cao *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2021). Além disso, possui efeitos antioxidantes e antiapoptóticos, contribuindo para a manutenção da viabilidade celular durante o processo de regeneração tecidual (Li; Wang, 2022).

A possível utilização de Chr extraída localmente da própolis e do mel do Piauí não apenas reduziria significativamente os custos de produção em diversas indústrias (farmacêutica, cosmética e alimentícia), mas também impulsionaria a economia regional (Salatino; Salatino; Negri, 2021).

O Piauí é um dos maiores produtores e exportadores de mel do Brasil, com uma cadeia apícola consolidada que envolve centenas de famílias. O maior aproveitamento da própolis e do mel, através da possível extração de Chr para fins comerciais em larga escala, agregaria valor aos produtos apícolas do estado, gerando novas oportunidades de emprego e renda para apicultores e cooperativas locais. Isso fortaleceria a agricultura familiar, incentivaria a sustentabilidade da produção e posicionaria o Piauí como um polo de inovação e desenvolvimento de produtos naturais de alto valor agregado (Abreu; Carvalho; Filho, 2024).

As MSC, também conhecidas com células-tronco mesenquimais, é uma das linhagens celulares mais utilizadas em estudos em medicina regenerativa por serem obtidas de tecidos somáticos por métodos minimamente invasivos, sua capacidade de diferenciação mesodermal *in vitro* e propriedades parácrinas anti-inflamatórias, angiogênicas, antiapoptóticas e quimiotáticas *in vitro* (Melo *et al.*, 2024; Renesme *et al.*, 2022). Podendo ser obtidas da região perivascular de diversos sítios, como a medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical, e são amplamente utilizadas em estudos de reparação tecidual (Argôlo Neto *et al.*, 2016). No reparo ósseo, as MSC podem assumir o fenótipo osteoblástico e favorecer a deposição de matriz óssea rica em cálcio, desempenhando um papel central no processo de consolidação óssea.

Além disso, estas células atuam como maestros do processo de reparação tecidual, estabelecendo a ativação e modulação direta de vias de sinalização molecular ligadas à inflamação e ao crescimento, que induzem a secreção de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que influenciam positivamente o microambiente celular, contribuindo para a formação de um ambiente propício à reparação óssea e à modulação da resposta imune (Caplan, 2017; Dominici *et al.*, 2006). Dessa forma, a utilização de MSC em combinação com hidrogéis, representa uma abordagem promissora para potencializar a reparação óssea por meio da modulação de fatores como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), um dos principais responsáveis pelos efeitos osteoindutores e imunomoduladores no tratamento de lesões ósseas.

Diante do exposto, considera-se que a possibilidade de incorporação do HGM com Chr pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de biomateriais com propriedades osteoindutoras, imunomoduladoras e antioxidantes, dadas as propriedades de ambos. A incorporação desse flavonoide natural em uma matriz

polimérica vegetal visa ampliar o potencial terapêutico do sistema, promovendo um microambiente favorável à regeneração óssea e ao controle da resposta inflamatória. Além disso, pode contribuir, a longo prazo, para o estímulo à produção regional de mandioca e ampliação do valor agregado da produção apícola, pelo acréscimo de aplicações técnico-científicas.

Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo investigar a interação entre a molécula de Chr e o HGM, bem como a integração de suas propriedades físico-químicas para as características fisiopatológicas de interesse à reparação óssea (osteoimunomodulação), num modelo predominantemente *in silico*, como etapa preditora para um futuro estudo *in vitro*. A avaliação *in vitro* restringiu-se à obtenção e caracterização de MSC, macrófagos (MO) e na investigação da biocompatibilidade do HGM, estabelecendo as bases biológicas para a futura aplicação do HGM-Chr. A abordagem *in silico* se propôs a: 1) Identificar e validar os alvos terapêuticos da crisina na reparação óssea e sua interação com proteínas de osteoimunomodulação, utilizando farmacologia de redes, redes de interação proteína-proteína, análise de ontologia gênica, *docking* molecular, predições ADMET; 2) Prever as características estruturais e comportamentais da crisina, do HGM e do sistema HGM-Cr por meio de cálculos da Teoria do Funcional da Densidade.

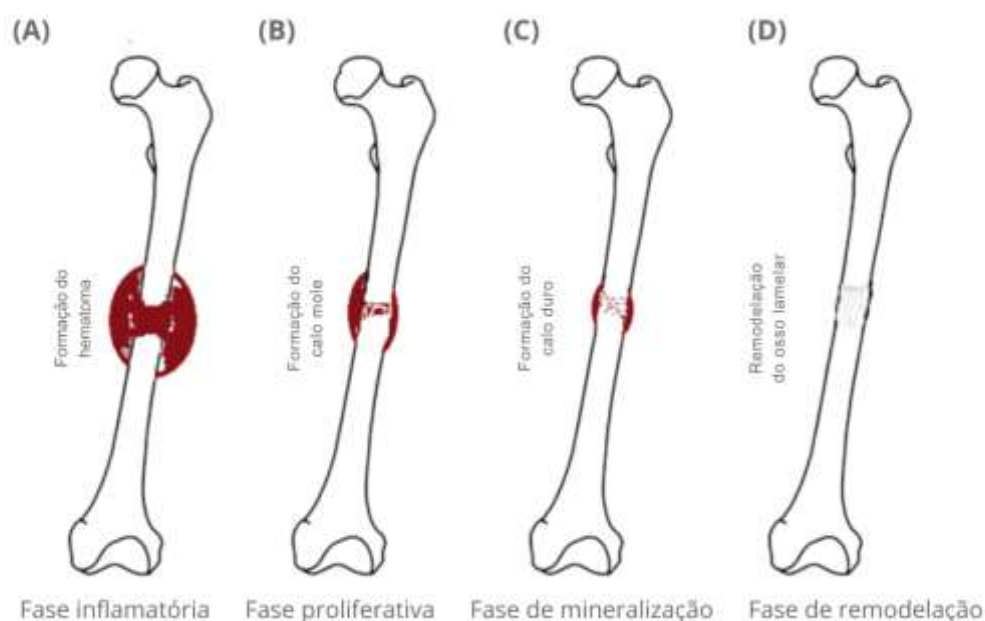
Esta dissertação está estruturada em cinco seções. Sendo a primeira, uma introdução geral, contextualizando o tema e destacando a relevância do estudo. A segunda seção consiste na revisão de literatura, abordando os principais conceitos e temas relacionados à pesquisa. A terceira seção, chamada de capítulo 1, apresenta o manuscrito científico nas normas do periódico *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, contendo os resultados obtidos e as discussões pertinentes. A quarta seção traz as considerações finais e implicações dos achados. Por fim, a quinta seção inclui as referências bibliográficas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiopatogenia do reparo ósseo

O reparo ósseo é um processo complexo e dinâmico que se inicia imediatamente após a ocorrência de uma lesão, envolvendo uma sequência de eventos celulares e moleculares coordenados no intuito de restaurar a integridade do tecido, didaticamente categorizado em 4 fases: uma fase inflamatória, uma fase proliferativa, uma fase de mineralização e por fim, uma fase de remodelação (ElHawary *et al.*, 2021) (Figura 1).

Figura 1. Processo de reparo ósseo após lesão: (A) Na fase inflamatória, forma-se um hematoma que inicia a resposta de cicatrização. (B) Durante a fase proliferativa, ocorre a formação de um calo mole de tecido fibroso e cartilaginoso para estabilizar a fratura. (C) Na fase de mineralização, o calo mole se torna duro e começa a unir as extremidades ósseas. (D) Finalmente, na fase de remodelação, o osso lamelar substitui o calo ósseo, restaurando a estrutura original



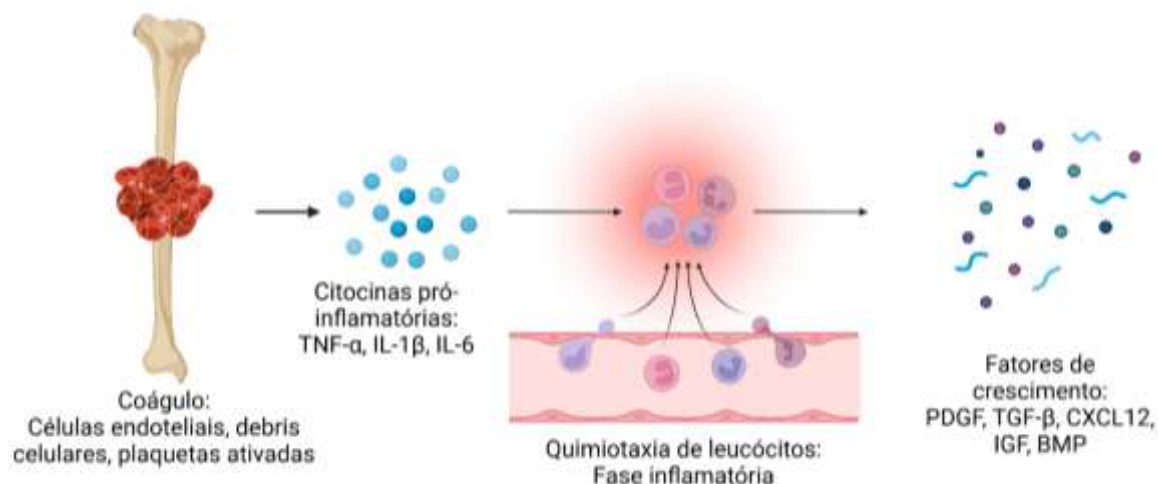
Fonte: Adaptado de Shaik; Kumar; Palaniswamy (2023)

A fase inflamatória é desencadeada pela resposta ao dano tecidual, no qual a ativação das vias moleculares de coagulação induz a rápida formação de um hematoma ao redor da área lesionada, com finalidade de estabilização mecânica da região e formação de um microambiente propício para a regulação do processo de regeneração óssea (Maruyama *et al.*, 2020). Esse processo envolve a ativação plaquetária e de células endoteliais, que liberam uma série de fatores bioquímicos, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o TGF- β , que desempenham papéis fundamentais na modulação da resposta celular inicial (Duda *et al.*, 2023). Em pesquisa realizada por Tao, Ma e Yang (2024), utilizando o agente imunossupressor ciclosporina A em modelo murino, observou-se alterações significativas no padrão de citocinas e

fatores de crescimento sintetizados, associando o achado à redução de índices de osteogênese e aumento de osteólise.

Portanto o microambiente inicial rico em plaquetas, células endoteliais, e fatores de coagulação ativados induz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1-beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6), que regulam a ativação da resposta imunológica, induzindo a quimiotaxia e diapedese de neutrófilos e monócitos, fundamental no processo de remoção de debris celulares e no preparo tecidual para a fase subsequente de proliferação (Maruyama *et al.*, 2020) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do microambiente inicial da reparação tecidual. O coágulo formado por plaquetas ativadas, células endoteliais e debris celulares estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Essas moléculas promovem a ativação imunológica, favorecendo a quimiotaxia e a diapedese de neutrófilos e monócitos. Este processo é essencial para a remoção de debris celulares e para o preparo do tecido, facilitando a transição para a fase proliferativa da cicatrização

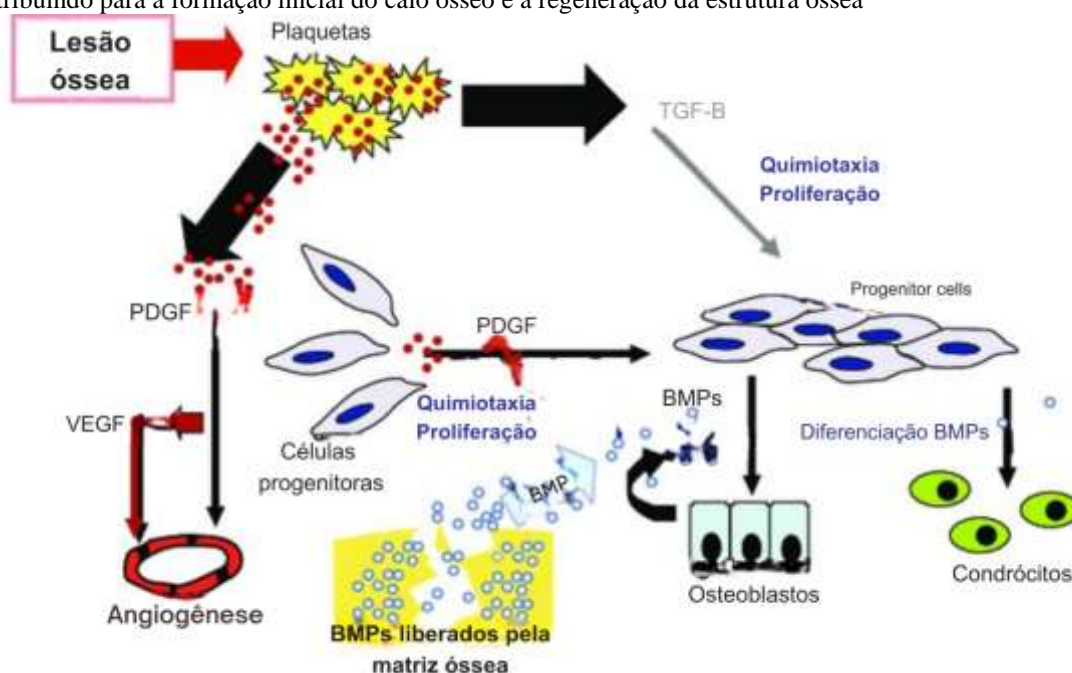


Fonte: Autoria própria.

Instaurada a fase inflamatória, o processo de reparo ósseo transita para a fase proliferativa, na qual o hematoma, agora rico em células inflamatórias e fatores de crescimento, atua como um nicho para a mobilização e diferenciação de células progenitoras (Schell *et al.*, 2017). Neste contexto, o processo de quimiotaxia, regulado pela síntese e liberação de fatores de crescimento e quimiocinas produzidas por células inflamatórias e endoteliais, induz a migração de células indiferenciadas estromais medulares e pré-osteoblastos periosteais para o local da lesão (Ghodadra; Singh, 2008) (Figura 3). Impulsionadas por fatores de crescimento como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), estas células então se diferenciam em osteoblastos e condrócitos, contribuindo para a formação inicial do calo ósseo. De acordo com Ding *et al.* (2021) os condrócitos sintetizam uma matriz

cartilaginosa rica em colágeno tipo II e proteoglicanos, formando o calo mole que estabiliza temporariamente a fratura, estes são regulados por TGF- β e pelo fator de transcrição Forkhead box O1 (FOXO1). Em seus estudos demonstrou que a ausência de FOXO1 leva a maior formação de cartilagem inicial, porém uma menor formação óssea posterior (Ding *et al.*, 2021).

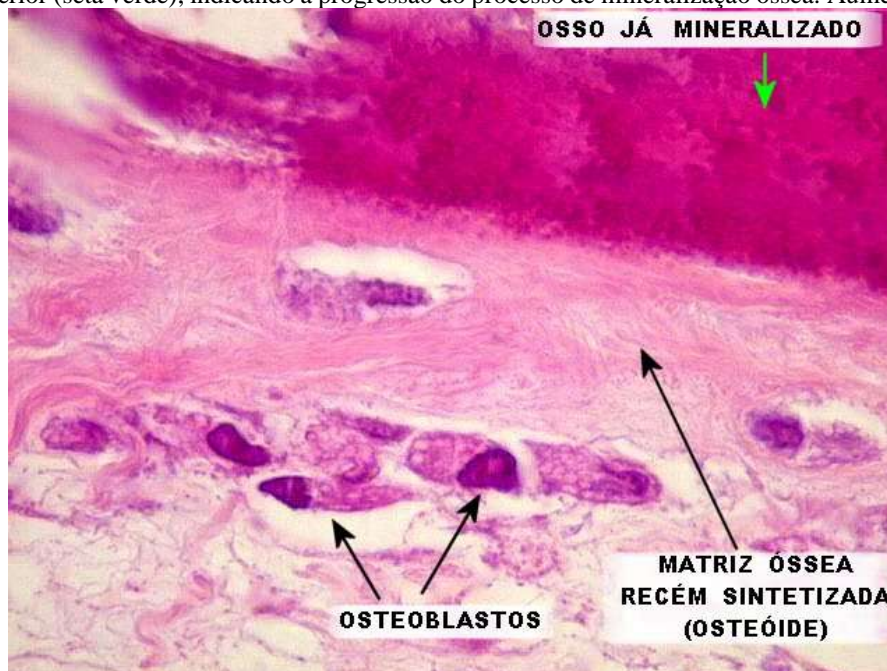
Figura 3. Mobilização e diferenciação celular na fase proliferativa do reparo ósseo. Na fase proliferativa, o hematoma rico em fatores de crescimento como PDGF e TGF- β mobiliza células progenitoras através da quimiotaxia. Esses fatores promovem a angiogênese mediada por VEGF e ativam células progenitoras que, sob a ação dos BMPs liberados pela matriz óssea, diferenciam-se em osteoblastos e condroblastos, contribuindo para a formação inicial do calo ósseo e a regeneração da estrutura óssea



Fonte: Adaptado de Ghodadra; Singh, (2008).

Na fase de mineralização, a matriz chamada osteóide passa por um processo de deposição mineral no intuito de fortalecer o calo ósseo (Figura 4), mediado por uma sequência coordenada de eventos bioquímicos, nos quais íons de cálcio e fosfato são depositados na matriz, levando à formação de cristais de hidroxiapatita, que conferem rigidez e resistência ao tecido em desenvolvimento, este processo é regulado por proteínas produzidas pelos osteoblastos, como osteocalcina (OC) e fosfatase alcalina (FA) (Salhotra *et al.*, 2020). A OC atua como uma proteína de ligação ao cálcio, facilitando a nucleação de cristais de hidroxiapatita na matriz extracelular (Martiniakova *et al.*, 2024). Já a FA é responsável pela exocitose de fosfato inorgânico para o meio extracelular para que ocorra a formação de hidroxiapatita (Halling Linder; Enander; Magnusson, 2016).

Figura 4. Micrografia mostrando a formação do tecido ósseo. A matriz óssea recém-sintetizada, chamada osteoide, é visível como uma camada não mineralizada adjacente aos osteoblastos (seta preta), que são células responsáveis pela deposição de matriz extracelular. O osso já mineralizado pode ser observado na região superior (seta verde), indicando a progressão do processo de mineralização óssea. Aumento de 400x.



Fonte: (Neupatimagem-UNICAMP, acesso em março de 2025).

Durante essa fase, o microambiente local é modificado para favorecer o depósito mineral. As células osteoblásticas continuam a secretar colágeno tipo I e outras proteínas da matriz, criando um arcabouço que sustenta a deposição mineral subsequente (Salhotra *et al.*, 2020). A mineralização é fortemente influenciada pela ativação da via Wnt/ β -catenina, iniciada pela ligação de proteínas Wnt aos receptores Frizzled e pela estabilização da β -catenina no núcleo celular, o que regula a diferenciação osteoblástica e a expressão de genes associados à mineralização (detalhado na seção 2.5), como o gene SPP1, que codifica a osteopontina (OTP), responsável pela adesão e interação entre as células, a matriz extracelular e os cristais de hidroxapatita, consolidando a mineralização do tecido (Murshed, 2018). À medida que o calo mole se transforma em calo duro, agora formado por tecido ósseo primário mineralizado, começa a substituir a cartilagem e a matriz osteoide (Jiang *et al.*, 2024).

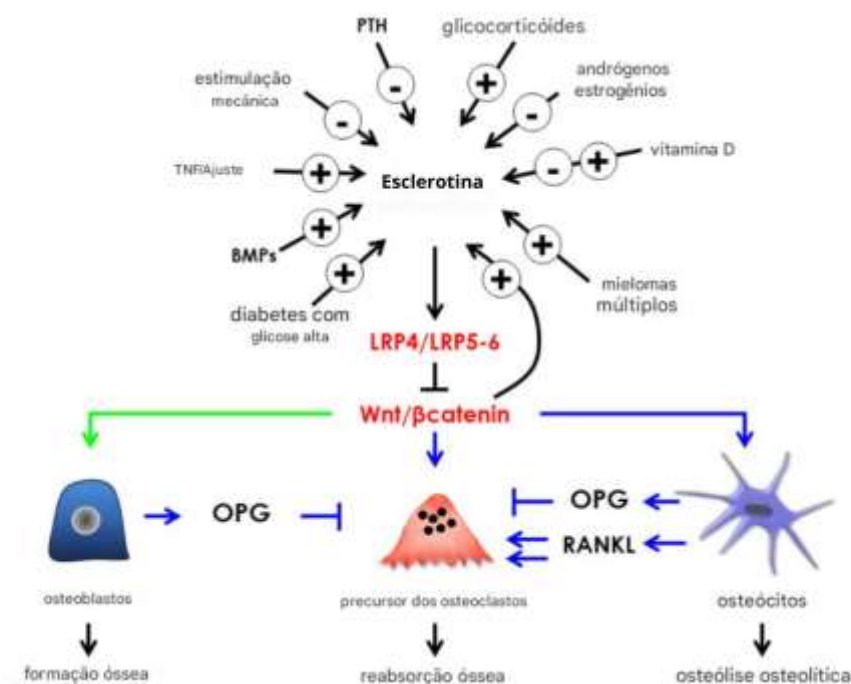
Essa transição marca o início da fase de remodelação, onde há uma ativação coordenada de osteoclastos e osteoblastos, células responsáveis pela reabsorção e formação óssea, respectivamente (Bahney *et al.*, 2019). Durante este processo, os osteoclastos degradam a matriz cartilaginosa e osteoide, enquanto os osteoblastos depositam nova matriz óssea lamelar, que adquire resistência adequada para suportar cargas biomecânicas (Hart *et al.*, 2020). À medida que a matriz amadurece, os

osteoblastos são incorporados à estrutura como osteócitos, organizados em torno de canalículos que permitem a comunicação celular e o transporte de íons, regulando o ambiente bioquímico para uma mineralização eficiente (Blair *et al.*, 2017).

A remodelação do osso lamelar recém-formado conclui o processo natural de reparo ósseo, resultando em um tecido que se integra gradualmente ao osso circundante, restaurando sua resistência e funcionalidade, no entanto, diante de lesões mais complexas ou em pacientes com capacidade regenerativa limitada, surge a necessidade de recorrer a intervenções que auxiliem na restauração do tecido (Junior; Henrique, 2020).

Além das vias de sinalização envolvidas no processo de reparo ósseo, diferenciação e crescimento celular, deposição de matriz óssea como BMP/Smad e Wnt/ β -catenina, proteínas reguladoras como Sclerotin e noggin desempenham papéis de suma importância no equilíbrio da regeneração óssea e diferenciação osteogênica. A Sclerotin, uma glicoproteína secretada pelos osteócitos, atua como um inibidor negativo da via Wnt ao se ligar aos receptores LRP5/6, bloqueando a sinalização necessária para a ativação da β -catenina (Delgado-Calle; Sato; Bellido, 2017). Isso resulta na supressão da formação óssea, sendo um mecanismo chave para evitar a ossificação descontrolada (Figura 5). Por outro lado, o Noggin regula negativamente a via BMP ao se ligar às proteínas BMP, prevenindo sua interação com os receptores celulares. Essa modulação é essencial para evitar a hiperatividade da via BMP/Smad, garantindo um controle fino entre formação e remodelação óssea (Khattab *et al.*, 2019). Juntas, essas proteínas atuam como reguladores homeostáticos, assegurando que a regeneração óssea ocorra de maneira controlada e eficiente.

Figura 5. Regulação da Sclerostina na homeostase óssea: fatores como estímulos mecânicos, hormônios, BMPs e condições patológicas influenciam sua expressão, modulando a via Wnt/ β -catenina e o equilíbrio entre formação óssea (osteoblastos) e reabsorção óssea (osteoclastos), mediado por OPG e RANKL.



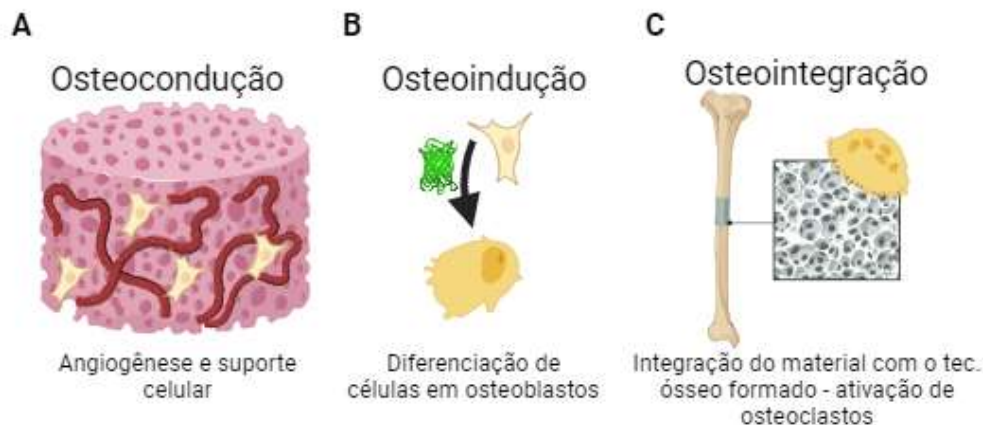
Fonte: Adaptado de Marini *et al.* (2023)

A regeneração óssea é um processo biológico complexo que envolve a interação de múltiplos fatores, incluindo células, proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento e sinais mecânicos (Salhotra *et al.*, 2020). Em muitos casos clínicos, como grandes fraturas, defeitos ósseos ou perda de osso devido a doenças, a capacidade de regeneração natural do tecido ósseo é insuficiente para garantir uma cicatrização completa. Nesse contexto, o uso de biomateriais tem se destacado como uma abordagem promissora na medicina regenerativa para acelerar e otimizar o processo de cicatrização óssea (Wang *et al.*, 2024).

2.2 Biomateriais na regeneração óssea

Biomateriais são substâncias projetadas para interagir com sistemas biológicos e desempenhar um papel terapêutico ou funcional. Na reparação óssea, eles podem servir como arcabouços (scaffolds) tridimensionais, proporcionando suporte estrutural, facilitando a adesão, proliferação e diferenciação celular e adaptáveis ao local da lesão (Dec; Modrzejewski; Pawlik, 2022). O objetivo principal de um biomaterial osteoindutor é mimetizar as propriedades químicas e físicas da matriz óssea natural, promovendo a osteocondução, osteoindução, e osteointegração (Figura 6) (Perić Kačarević *et al.*, 2020).

Figura 6. Representação esquemática das três principais propriedades de um biomaterial osteoindutor. (A) Osteocondução: o biomaterial serve como suporte estrutural para o crescimento celular e promove angiogênese no local da lesão. (B) Osteoindução: estímulo da diferenciação de células progenitoras em osteoblastos, promovendo a formação de novo tecido ósseo. (C) Osteointegração: integração física e funcional do biomaterial com o tecido ósseo circundante, ativando a remodelação óssea através da ação de osteoclastos e osteoblastos.



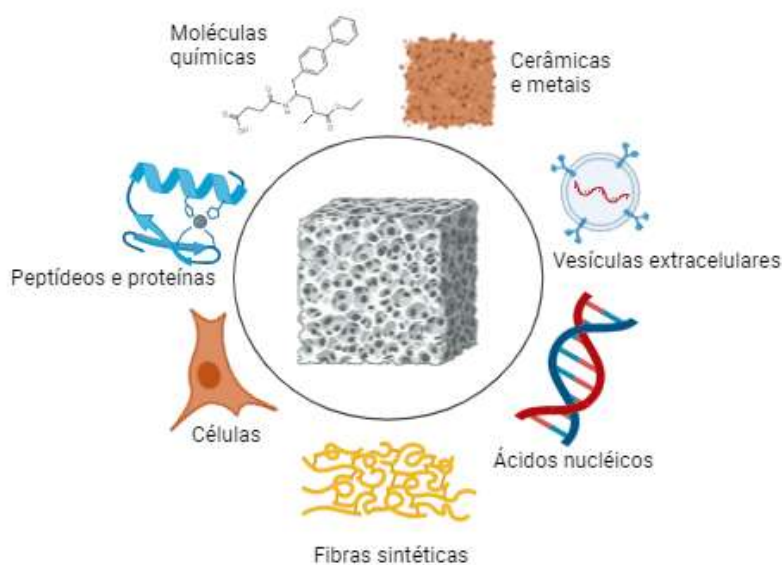
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os biomateriais podem ser classificados em várias categorias, incluindo polímeros naturais e sintéticos, cerâmicas e metais (Festas; Ramos; Davim, 2020). Cada tipo possui características distintas que influenciam seu uso na regeneração óssea. Polímeros naturais, como colágeno, quitosana e alginato, têm sido amplamente utilizados devido à sua biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis (Su *et al.*, 2021). No entanto, a pesquisa tem se expandido para incluir materiais mais acessíveis e versáteis, como os derivados de polissacarídeos naturais, exemplificados pela goma de mandioca (Lima *et al.*, 2024b). Já os biomateriais sintéticos, como o ácido polilático (PLA) e o ácido poliglicólico (PGA), são customizáveis em termos de suas propriedades mecânicas e taxa de degradação, oferecendo flexibilidade no design de scaffolds (Alvarez Echazú *et al.*, 2022).

Um aspecto relevante na escolha de biomateriais para a regeneração óssea é a sua interação com o sistema imunológico. Além de promover a formação de tecido ósseo, os biomateriais devem possuir propriedades imunomoduladoras, que ajudam a controlar a resposta inflamatória inicial, prevenindo rejeições e complicações no processo de cicatrização (Lee, Jinkyu *et al.*, 2019a). A capacidade de regular a inflamação local é um fator decisivo para garantir que o processo de regeneração ocorra de forma eficaz, sem resultar em reações adversas que possam comprometer a integração do material com o osso nativo.

Outra característica relevante dos biomateriais aplicados à regeneração óssea é sua capacidade de atuar como plataformas para liberação controlada de fatores bioativos, como proteínas, citocinas, peptídeos ou ácidos nucleicos, que participam ativamente da modulação da inflamação, da angiogênese e da diferenciação osteogênica. A formulação desses sistemas pode envolver a incorporação de diversos componentes, como moléculas químicas, fibras, cerâmicas, MSC, vesículas extracelulares e compostos bioativos de origem natural, como os flavonoides. Estes últimos, assim como antimicrobianos e antioxidantes, atuam na proteção contra infecções e no controle do estresse oxidativo, favorecendo um microambiente mais adequado à regeneração, aumentando as chances de sucesso da intervenção terapêutica (Amiryaghoubi *et al.*, 2020). A figura 7 ilustra a diversidade de componentes que podem ser utilizados na formulação de biomateriais voltados à regeneração tecidual.

Figura 7. Diversidade de componentes utilizados na formulação de biomateriais naturais e sintéticos para aplicações na regeneração tecidual



Fonte: Elaborado pelo autor.

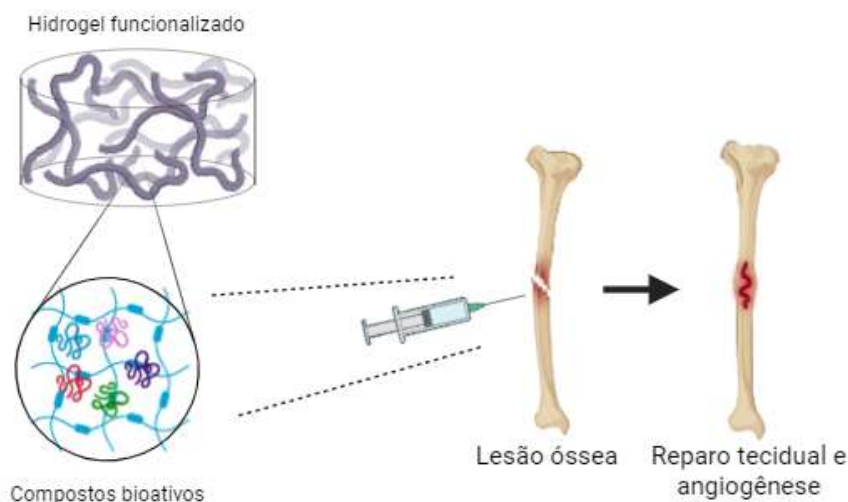
2.3 Hidrogéis como biomateriais: propriedades e aplicações

Hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos que podem absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, mantendo sua estrutura por período suficiente para garantir o processo de reparo. Devido à sua alta capacidade de retenção de água e à estrutura porosa e flexível que imita as propriedades físicas e mecânicas da matriz extracelular, os hidrogéis são utilizados como biomateriais para engenharia de tecidos, particularmente na regeneração óssea, cartilaginosa e cutânea (Ho *et al.*, 2022).

Uma das principais propriedades dos hidrogéis é sua diversidade de composição. Os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de polímeros naturais, como alginato, goma de mandioca, colágeno e quitosana, ou de polímeros sintéticos, como poliacrilamida e polietilenoglicol (PEG) (Chen *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2024; Lima *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). A escolha do tipo de polímero depende das necessidades clínicas específicas, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades mecânicas (Peppas; Hoffman, 2020). Em casos de regeneração óssea, por exemplo, a biodegradabilidade é essencial, pois o material deve apoiar a formação óssea inicial e depois ser absorvido naturalmente, evitando a necessidade de remoção cirúrgica posterior (Amiryaghoubi *et al.*, 2020). Polímeros como o ácido polilático-co-glicólico (PLGA) são utilizados justamente por suas propriedades degradáveis e sua capacidade de serem gradualmente substituídos por novo tecido ósseo (Seyyed Nasrollah; Karimi-Soflou; Karkhaneh, 2023). Por outro lado, em aplicações que envolvem curativos para feridas crônicas, como úlceras diabéticas, a biocompatibilidade é fundamental para promover cicatrização sem provocar reações adversas (Saharan *et al.*, 2024).

Na regeneração óssea, os hidrogéis atuam como arcabouços tridimensionais que facilitam a adesão, proliferação e diferenciação celular, enquanto proporcionam suporte mecânico temporário ao defeito ósseo. Além de servirem como arcabouços físicos, os hidrogéis podem ser funcionalizados com moléculas bioativas, como fatores de crescimento, proteínas, peptídeos ou ácidos nucleicos, para promover a osteogênese e a angiogênese (Lee, Jinkyu *et al.*, 2019) (figura 8).

Figura 8. Representação do uso de hidrogel funcionalizado com compostos bioativos na regeneração de lesões ósseas



Fonte: Elaborado pelo autor.

A maleabilidade e capacidade de preencher defeitos irregulares, são característica especialmente úteis dos hidrogéis na regeneração de fraturas complexas ou defeitos ósseos de grandes dimensões. Além disso, a alta porosidade dos hidrogéis permite a difusão de nutrientes e oxigênio para as células, facilitando a sobrevivência celular e o crescimento tecidual (Chyzy; Plonska-Brzezinska, 2020).

Hidrogéis também têm sido alvo de modificações para melhorar suas propriedades mecânicas, como a adição de nanopartículas, fibras de reforço ou cerâmicas bioativas. Essas modificações são essenciais quando os hidrogéis precisam suportar forças mecânicas significativas, como ocorre em defeitos ósseos de grandes dimensões ou áreas sujeitas a carga constante (Cardoso *et al.*, 2024). O desenvolvimento de hidrogéis híbridos, que combinam polímeros naturais e sintéticos com aditivos bioativos, tem sido uma área de crescente interesse para o avanço dos biomateriais em terapias regenerativas (Mohanty *et al.*, 2024).

2.4 Goma de mandioca como componente de hidrogéis

A goma de mandioca é um polissacarídeo natural extraído das raízes da *Manihot esculenta*, planta amplamente cultivada em regiões tropicais (Amelework; Bairu, 2022). Esse composto tem atraído crescente interesse como biomaterial devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e abundante disponibilidade, características essenciais para seu uso na engenharia de tecidos e, mais especificamente, na formulação de hidrogéis para aplicações regenerativas (Fang *et al.*, 2022).

Como polissacarídeo, a goma de mandioca é composta por moléculas de amilose e amilopectina, que proporcionam a capacidade de formar estruturas tridimensionais com elevada retenção de água, similar à matriz extracelular dos tecidos. Isso faz da goma de mandioca um material promissor para a criação de hidrogéis, especialmente em aplicações que exigem hidratação, maleabilidade e suporte celular, como a regeneração óssea (Lima *et al.*, 2024).

Uma das principais vantagens do uso da goma de mandioca na criação de hidrogéis é sua biocompatibilidade, uma característica importante para qualquer biomaterial em contato com tecidos vivos. Estudos demonstram que a goma de mandioca, por ser um material natural, não induz reações imunológicas adversas quando implantada no corpo, o que a torna segura para aplicações biomédicas (Compart *et al.*, 2023).

A goma de mandioca também apresenta propriedades mecânicas e reológicas que podem ser ajustadas para diferentes aplicações clínicas (El Halal *et al.*, 2018). Por meio de modificações químicas ou físicas, como reticulação com agentes químicos ou adição de nanopartículas, suas propriedades mecânicas podem ser otimizadas para atender às necessidades de regeneração óssea ou de outros tecidos, onde é necessário um suporte mais rígido e durável (Chen, 2019).

Os hidrogéis de goma de mandioca já têm sido testados com diferentes finalidades, incluindo a liberação controlada de medicamentos (Fang *et al.*, 2022), atividade antimicrobiana (Lima *et al.*, 2024) e na reparação tecidual, em curativos para feridas relacionadas a diabetes (Savekar *et al.*, 2024).

Outra propriedade interessante dos polissacarídeos em geral, é sua capacidade de ser funcionalizada com compostos bioativos, como fatores de crescimento, proteínas, peptídeos e flavonoides, como a crisina (Mohanty *et al.*, 2024). A combinação da goma de mandioca, por exemplo, com esses agentes bioativos permite a criação de hidrogéis multifuncionais que servem como arcabouços físicos para o crescimento celular, e promovem ativamente a osteogênese, angiogênese e a modulação da resposta imunológica no local da lesão (Liu *et al.*, 2021). Além disso, esses hidrogéis funcionalizados, podem ser projetados para liberar gradualmente os compostos bioativos, proporcionando uma liberação controlada que sustenta o processo de regeneração por períodos prolongados (Thönes *et al.*, 2019).

No contexto da medicina regenerativa, a goma de mandioca apresenta uma solução acessível e ecologicamente sustentável para a criação de biomateriais. Sua abundância em regiões tropicais, como o Brasil, e sua fácil obtenção tornam este material atraente para uso em larga escala, reduzindo os custos de produção em comparação com biomateriais mais sofisticados e raros. Isso é especialmente importante em países em desenvolvimento, onde a demanda por tratamentos regenerativos de baixo custo é elevada.

2.5 Células sinalizadoras medicinais na regeneração óssea

As células sinalizadoras medicinais (MSC) são uma das principais ferramentas da medicina regenerativa devido à sua capacidade de modulação imunológica e regeneração tecidual. Essas células são amplamente estudadas por sua plasticidade e capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, além de sua habilidade em modular o

microambiente inflamatório, facilitando a regeneração de tecidos danificados (Song; Scholtemeijer; Shah, 2020). São conhecidas por células sinalizadoras medicinais devido a capacidade de atuar como "fábricas celulares" de moléculas sinalizadoras (Caplan, 2017).

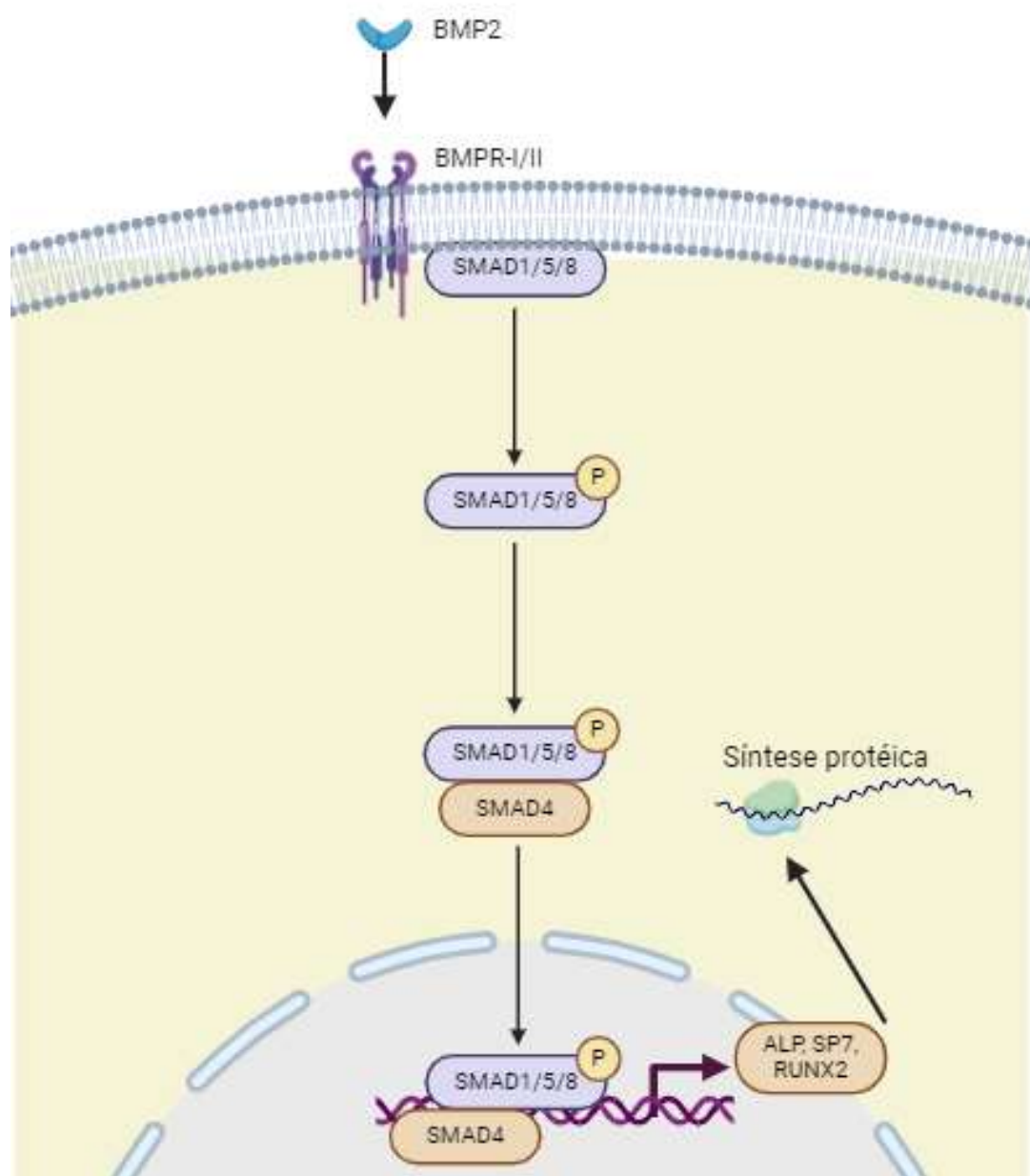
As MSC são células multipotentes que podem ser isoladas de várias fontes adultas, incluindo medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, dentre outros. Elas apresentam a capacidade de se diferenciar em células do tecido mesodérmico, como os osteoblastos, condrócitos e mioblastos, sendo especialmente atrativas para a regeneração óssea (Lee *et al.*, 2019). A caracterização das MSC, de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular, envolve a expressão de marcadores de superfície específicos, como CD73, CD90 e CD105, a ausência de marcadores hematopoiéticos, como CD34, CD45 e CD14, e a capacidade de se diferenciar em três linhagens celulares (osteogênica, adipogênica e condrogênica) quando induzidas *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Além de sua plasticidade, ou seja, capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares, as MSC possuem uma notável capacidade de migrar para os locais de lesão, onde desempenham um papel fundamental na regeneração tecidual. Isso se dá principalmente por meio da secreção de fatores bioativos, quimiocinas, responsáveis pela migração celular, e citocinas como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2), que modulam a resposta inflamatória, estimulam a angiogênese e promovem a diferenciação celular (Vizoso *et al.*, 2017).

Os mecanismos moleculares que regem a atuação das MSC na regeneração óssea são complexos e envolvem tanto a diferenciação celular direta quanto a modulação do microambiente tecidual. No contexto osteogênico, estas células podem ser induzidas a se diferenciar em osteoblastos, células responsáveis pela síntese de matriz óssea, através da ativação de vias de sinalização específicas, como as vias BMP/Smad, Wnt/ β -catenina e MAPK/ERK (Chen *et al.*, 2016). Essas vias são ativadas por fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas tipo-2 (BMP-2), que promovem a expressão de genes osteogênicos, como RUNX2, ALP e SP7, fundamentais para o processo de mineralização óssea (Cai *et al.*, 2021).

A via de sinalização BMP/Smad é particularmente importante para a diferenciação osteogênica (Figura 9). O fator de crescimento BMP-2 liga-se aos receptores específicos de BMP (BMP-I e BMP-II) na membrana celular das MSC, fosforilando as proteínas Smad1, Smad5 e Smad8. Essas proteínas ativadas por meio de fosforilação se associam a Smad4 e translocam-se para o núcleo, onde regulam positivamente a transcrição de genes osteogênicos (Beederman *et al.*, 2013).

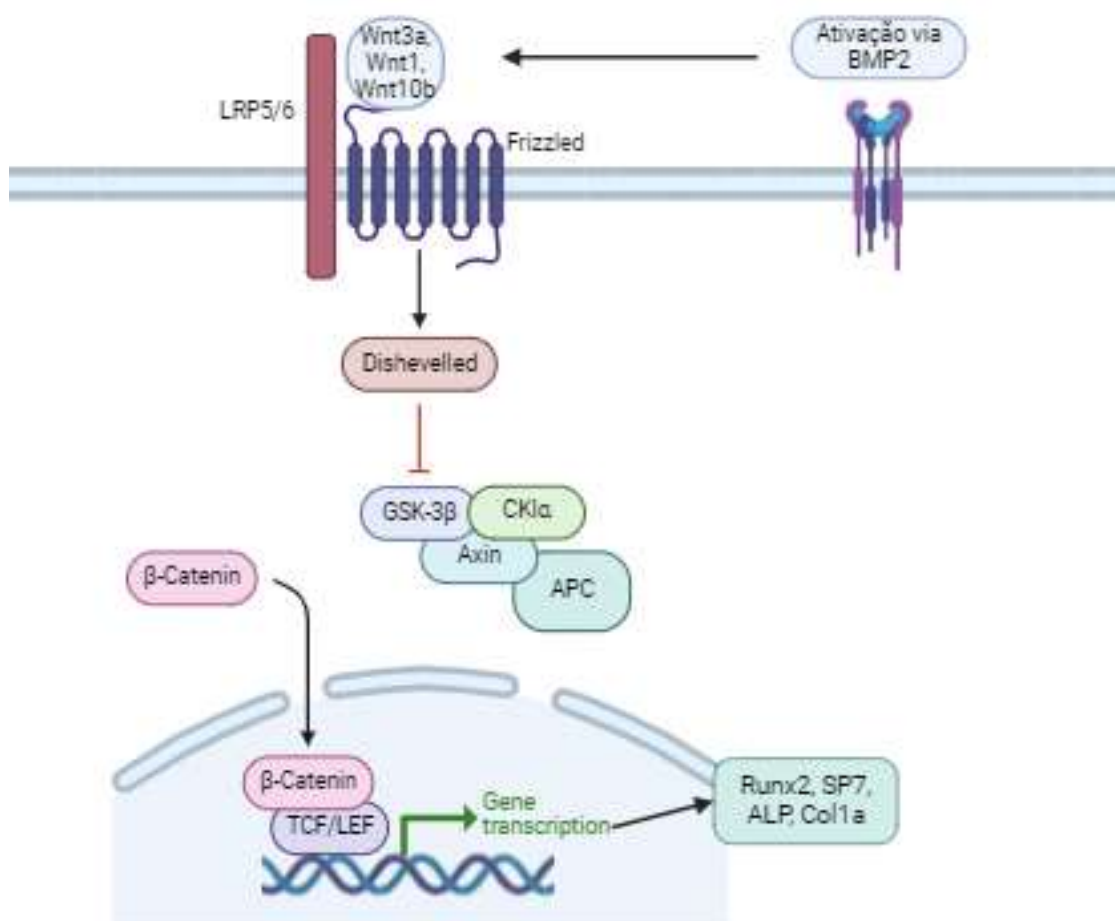
Figura 9. Sinalização da Via BMP-2 na diferenciação osteogênica. A proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) liga-se aos receptores BMPRI e BMPRII na superfície celular, levando à fosforilação dos fatores SMAD1/5/8. Os SMADs fosforilados se associam com SMAD4, formando um complexo que é translocado para o núcleo. No núcleo, este complexo ativa a transcrição de genes osteogênicos (Runx2, ALP e SP7), promovendo a síntese de proteínas essenciais para a formação óssea



Fonte: Autoria própria.

Além disso, a ativação da via Wnt/ β -catenina é fundamental para a proliferação celular e a formação óssea (Figura 10). Quando a via Wnt é ativada, a β -catenina se acumula no citoplasma e se transloca para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição para promover a expressão de genes como Runx2, Sp7, ALP, que suportam a formação óssea (Houschyar *et al.*, 2019).

Figura 10. Interação entre as vias de sinalização Wnt/ β -catenina e BMP-2 na osteogênese. A ativação da via BMP-2 induz a expressão de proteínas Wnt (Wnt3a, Wnt1, Wnt10b) e correceptores LPR (LPR5 e LPR6). As Wnt se ligam ao receptor Frizzled/LRP, ativando a proteína *Dishevelled*, que inibe o complexo de degradação GSK-3 β /Axin/CKI α /APC, permitindo o acúmulo de β -catenina. A β -catenina é translocada para o núcleo, onde se associa a fatores de transcrição TCF/LEF promovendo a transcrição de genes osteogênicos.

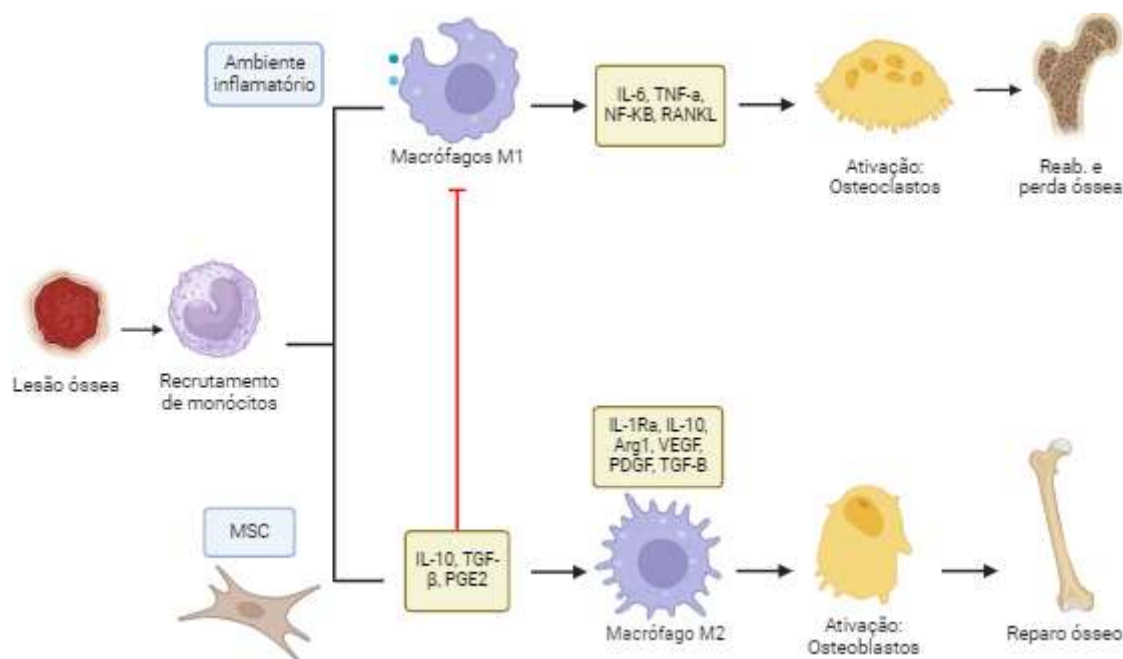


Fonte: Autoria própria.

Além de seu papel na diferenciação osteogênica, as MSC secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- β e PGE2, que suprimem a resposta inflamatória exacerbada, promovendo um ambiente regenerativo propício (Song; Scholtemeijer; Shah, 2020). Essa imunomodulação é especialmente importante nos estágios iniciais da cicatrização óssea, onde uma resposta inflamatória controlada é essencial para evitar

complicações, como ativação de osteoclastos, fibrose e rejeição de implantes. As MSC são capazes de interagir com células do sistema imune inato e adaptativo (figura 11), modulando suas funções e, assim, favorecendo a regeneração tecidual (Wang *et al.*, 2022).

Figura 11. Interação das células sinalizadoras medicinais (MSC) com o sistema imunológico na modulação da resposta inflamatória e regeneração óssea. As MSC interagem com células do sistema imune inato, como macrófagos, modulando suas funções para favorecer a regeneração tecidual. Em um ambiente inflamatório de lesão óssea, há recrutamento de monócitos que são prontamente diferenciados ao fenótipo M1, estes produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , NF- κ B e RANKL) levando a ativação de osteoclastos, promovendo reabsorção e perda óssea. Em contrapartida, as propriedades imunomoduladoras das MSC, polarizam macrófagos para o perfil M2, que, por meio da secreção de IL-10, TGF- β e VEGF, ativam osteoblastos, induzem proliferação e diferenciação celular, promovendo o reparo e regeneração óssea.



Fonte: Autoria própria.

Outro mecanismo relevante envolve a capacidade das MSC de secretar vesículas extracelulares, como exossomas, que contêm proteínas, RNAs e microRNAs (miRNA), atuando como mediadores de sinalização intercelular (Vyas *et al.*, 2023). Tan *et al.* (2020) relata 23 estudos em que exossomas derivados de MSC promoveram a proliferação e diferenciação de células progenitoras em osteoblastos, além da supressão de respostas inflamatórias prejudiciais ao processo de cicatrização óssea.

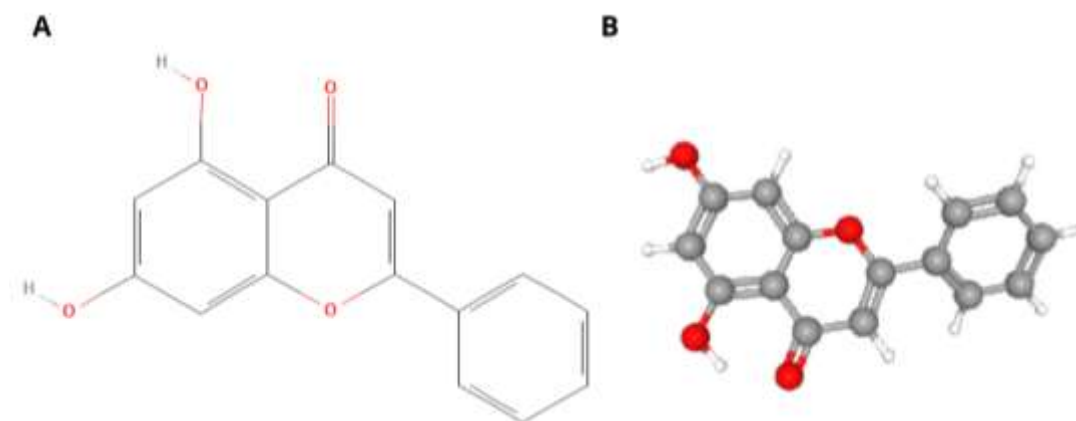
Na regeneração óssea, as MSC têm se mostrado promissoras em inúmeros estudos pré-clínicos (Cabrera-Pérez *et al.*, 2019; Harman; Marx; Van de Walle, 2021; Jia *et al.*, 2021; Ofiteru *et al.*, 2020). Aplicações terapêuticas incluem o uso de MSC em combinação com biomateriais, como hidrogéis, para promover a cicatrização de fraturas

e defeitos ósseos críticos (Ji *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021). Quando incorporadas em hidrogéis funcionalizados, as MSC contribuem diretamente para a neoformação óssea e regulam o microambiente inflamatório, promovendo uma regeneração mais eficiente e controlada.

2.6 Crisina e seu potencial na medicina regenerativa e engenharia tecidual

A crisina (Figura 12) é um flavonoide natural amplamente encontrado em plantas, como as espécies do gênero *Passiflora* (maracujá), e em produtos apícolas, como a própolis e o mel (Mani; Natesan, 2018). A crisina tem sido estudada por suas ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, neuroprotetoras e osteoprotetoras. Este flavonoide atua inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulando vias inflamatórias, como a NF- κ B e a COX-2, o que contribui para a redução do estresse oxidativo e da inflamação (Ibrahim *et al.*, 2021). Essas propriedades têm despertado interesse crescente no uso dessa substância na medicina regenerativa e na engenharia tecidual, particularmente no campo da regeneração óssea, no qual pode desempenhar um papel importante na modulação da osteogênese e principalmente na proteção contra o estresse oxidativo.

Figura 12. Estrutura 2D e 3D da molécula da crisina. (A) A imagem 2D exibe a disposição atômica e as ligações químicas da crisina, um flavonoide com estrutura básica composta por dois anéis benzênicos ligados a um anel pirona. (B) A imagem 3D mostra a conformação espacial da crisina, destacando as regiões aromáticas e a geometria plana da molécula. Os átomos estão representados por cores padrão: carbono (cinza), oxigênio (vermelho) e hidrogênio (branco)



Fonte: Extraído do PubChem® (2024).

Na regeneração óssea, a crisina promoveu a diferenciação osteogênica em MSC por meio da ativação das vias de sinalização ERK/MAPK e Smad (Li; Wang, 2022). Estudos indicam que a crisina pode regular a expressão de genes osteogênicos como Runx2, Col1A1, ALP e osteocalcina (OCN), facilitando a formação de nódulos

mineralizados e a síntese da matriz óssea (Cao *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2021; Li; Wang, 2022; Wu *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

A crisina atua na inibição da via RANKL/RANK, essencial para a diferenciação dos osteoclastos e, conseqüentemente, para a reabsorção óssea. Ao inibir a expressão de RANKL, a crisina suprime a ativação dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea e promovendo um ambiente mais favorável à formação óssea (Ibrahim *et al.*, 2021).

Outro mecanismo importante envolve a ativação da via de sinalização BMP/Smad. A crisina, em particular, tem sido associada ao aumento da expressão de BMP-2, ativando a sinalização Smad e promovendo a transcrição de genes osteogênicos (Cao *et al.*, 2022). Além disso, a via Wnt/ β -catenina também é favorecida pela presença de flavonóides, que aumentam a estabilidade da β -catenina no citoplasma, permitindo sua translocação para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes importantes para a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Zhang *et al.*, 2023).

Na engenharia tecidual, a crisina e outros flavonoides têm sido incorporados a biomateriais, como hidrogéis e scaffolds, com o propósito de aprimorar sua bioatividade, favorecer a regeneração óssea e conferir propriedades adicionais, como atividade antimicrobiana e potencial antiproliferativo (Abbasalizadeh *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2015; Menon *et al.*, 2018; Alipour *et al.*, 2021). A crisina complexada com cobre aumentou a biocompatibilidade e promoveu a osteogênese em células pré-osteoblásticas e melhorou a angiogênese, fator importante para a vascularização do tecido ósseo (Zhang *et al.*, 2023).

A capacidade da crisina em proteger as células contra o estresse oxidativo é uma característica altamente desejável na engenharia tecidual, onde as células frequentemente enfrentam condições adversas, como hipóxia ou exposição a altos níveis de espécies ROS (Mani; Natesan, 2018). Li e Wang (2022) relataram que a crisina foi capaz de ativar a via de sinalização da PI3K/Akt/Nrf2, induzindo a síntese de enzimas antioxidantes hemoxigenase-1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD) e, inibindo a produção de ROS por meio da inibição da via Jak/STATs.

O desenvolvimento de novos biomateriais funcionais contendo crisina, combinados com MSC, oferece uma abordagem promissora para o tratamento de defeitos ósseos e outras condições degenerativas. Além disso, sua ampla gama de atividades biológicas, como modulação imunológica, efeitos antioxidantes e promoção da osteogênese, tornando a abordagem altamente valiosa para futuras terapias regenerativas.

3. CAPÍTULO 1*

* Manuscrito elaborado de acordo com as normas do periódico “*International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*” (Fator de Impacto 2.5, ISSN 1563-535X)

Predição *in silico* das propriedades osteoindutoras e imunomoduladoras do hidrogel de goma de mandioca incorporado a crisina

Wanderson Gabriel Gomes de Melo^a e Napoleão Martins Argôlo Neto^{a*}

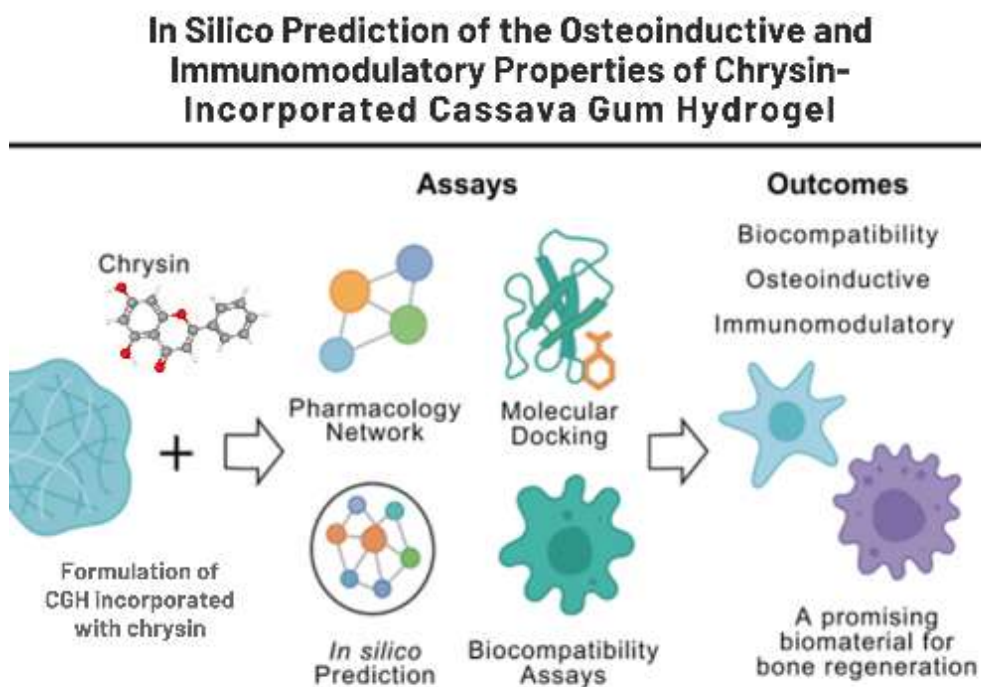
^a Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa em Células-Tronco, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil

*Autor Correspondente:

Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa em Células-Tronco, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina. Piauí, Brasil.

E-mail: argolo_napoleao@ufpi.edu.br

Graphical Abstract:



Predição *in silico* das propriedades osteoindutoras e imunomoduladoras do Hidrogel de Goma de Mandioca incorporado a Crisina

Há uma demanda mundial por soluções eficazes na reparação óssea, impulsionada pelo envelhecimento populacional, traumas e limitações das terapias atuais. O Brasil destaca-se como potencial protagonista dada sua vasta produção de mandioca, mel e própolis. A sinergia desses recursos naturais favorece a produção de hidrogéis à base de goma de mandioca (HGM) enriquecidos com o derivado apícola crisina (Cr), com propriedades gelificantes e antioxidantes promissoras. Este estudo objetivou investigar a incorporação da molécula de Cr com o HGM, para as características fisiopatológicas de interesse à reparação óssea, num modelo predominantemente *in silico*, como etapa preditora para um futuro estudo *in vitro*. Avaliou-se a biocompatibilidade do HGM por ensaios experimentais *in vitro* preliminares e investigou-se o potencial bioativo da Cr e a viabilidade de sua incorporação ao HGM por estratégias computacionais *in silico*. O HGM demonstrou biocompatibilidade em ensaios *in vitro*, sendo não-hemolítico (<5% de hemólise), não citotóxico e induzindo resposta inflamatória moderada em macrófagos. Análises *in silico* predisseram que a crisina possui alvos moleculares relevantes para osteoimunomodulação (PPARG, GSK-3B, ESR1, PTGS2, PARP1), interage favoravelmente com proteínas osteoimunológicas e tem perfil ADMET compatível com aplicação local. Simulações DFT indicaram que a formação do complexo HGM-crisina é termodinamicamente favorável. Em conjunto, esses achados corroboram a viabilidade teórica e experimental preliminar da formulação HGM-crisina como biomaterial funcional biointerativo, justificando validação funcional adicional em estudos futuros.

Palavras-chave: bioinformática; imunomodulação; bioativos naturais; diferenciação osteogênica; rede PPI.

Introdução

O reparo ósseo é um processo biológico coordenado, mas frequentemente limitado em lesões extensas ou condições clínicas adversas. Globalmente, milhões de indivíduos são afetados anualmente por fraturas complexas, perdas ósseas e doenças degenerativas,

gerando uma demanda crescente por soluções regenerativas eficazes. Os custos associados a esses desafios são expressivos, sobrecarregando os sistemas de saúde com despesas diretas de tratamento e reabilitação, além de perdas econômicas indiretas [1-3]. Nesse contexto, o desenvolvimento de hidrogéis bioativos capazes de mimetizar a matriz natural e liberar compostos com atividade osteoindutora e imunomoduladora de forma controlada tem se mostrado uma estratégia promissora na engenharia de tecidos [4,5]. Tais abordagens aliam-se à atuação de células sinalizadoras medicinais (MSCs), responsáveis por orquestrar o processo de reparo tecidual^[6].

Dentre os diversos biopolímeros naturais utilizados na formulação de hidrogéis, a goma de mandioca (*Manihot esculenta*) se destaca por suas propriedades hidrofílicas, biocompatibilidade, facilidade de processamento e abundância em regiões tropicais, com destaque no âmbito Nordeste brasileiro, características que a tornam um material viável para aplicações biomédicas em países em desenvolvimento^[7, 8]. Sua estrutura polissacarídica permite a incorporação de compostos bioativos sem comprometer a estabilidade da matriz, tornando-a uma excelente candidata à incorporação^[9].

Dentre os compostos naturais com potencial osteoindutor, os flavonoides têm atraído cada vez mais atenção. A crisina (5,7-di-hidroxi-flavona), encontrada no mel, própolis e plantas do gênero *Passiflora*, apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e moduladoras da diferenciação celular^[10]. Estudos recentes demonstraram que a crisina pode atuar em vias osteogênicas importantes, como a proteína morfogenética óssea/Smad (BMP/Smad), Wnt/ β -catenina e cinases reguladas por sinais extracelulares, que pertencem à via da proteína cinase ativada por mitógeno (ERK/MAPK). Essas ações promovem a expressão de genes osteoblásticos, como fator de transcrição runt-related 2 (RUNX2), a fosfatase alcalina (ALP) e a osteocalcina (OCN), ao mesmo tempo que

inibem a reabsorção óssea mediada pela via do ligante do receptor do fator nuclear kappa-B/ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (RANKL/RANK) [11-13].

Apesar das evidências experimentais promissoras sobre os efeitos da crisina na diferenciação osteoblástica, sua incorporação em matrizes poliméricas naturais, como a goma de mandioca, permanece pouco explorada no contexto do reparo ósseo. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo investigar a incorporação da molécula de Cr com o HGM, para as características fisiopatológicas de interesse à reparação óssea, num modelo predominantemente *in silico*, como etapa preditora para um futuro estudo *in vitro*. Para tanto, empregou-se uma abordagem multifacetada, que incluiu a avaliação da biocompatibilidade de HGM por meio de ensaios experimentais *in vitro* preliminares, bem como a investigação das propriedades e do potencial bioativo da crisina e a viabilidade predita de sua incorporação ao HGM através de estratégias computacionais *in silico*, abrangendo a caracterização físico-química (simulada por DFT), análise de farmacologia de redes, predição de interações moleculares e perfil farmacocinético e toxicológico (ADMET), visando elucidar a viabilidade científica dessa formulação como um biomaterial funcional biointerativo para uso em engenharia de tecidos ósseos.

Materiais e métodos

Obtenção do Hidrogel de Goma de Mandioca

Os biomateriais utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). A síntese e caracterização físico-química do hidrogel de goma de mandioca (HGM) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Lima et al.^[8].

Isolamento e cultivo de células-sinalizadoras medicinais (MSCs) e macrófagos peritoneais (MΦ)

Quatro ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 30 dias de idade e peso médio de $260 \pm 2,6$ g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), foram utilizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA n.º 686/2021). Os animais foram mantidos em condições convencionais de alojamento, com ração e água fornecidas *ad libitum*, temperatura controlada (25 °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. A eutanásia foi conduzida conforme as diretrizes da Resolução Normativa n.º 37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal^[14]. O protocolo utilizado consistiu na administração intraperitoneal de lidocaína 2% na dose de 10 mg/kg, seguida, após 10 minutos, da aplicação de tiopental sódico (0,5 g) na dose de 150 mg/kg, também por via intraperitoneal.

O isolamento das células sinalizadoras medicinais derivadas da medula óssea (MSCs) foi realizado conforme descrito por Argôlo-Neto et al.^[15], com modificações. Após a dissecação dos membros pélvicos, os fêmures foram coletados e imersos em solução tampão fosfato (PBS) suplementada com 10% de solução antibiótica (penicilina-estreptomicina). Em condições estéreis, as epífises ósseas foram removidas e o canal medular foi lavado com meio de cultivo específico para MSCs (DMEM alto teor de glicose suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de solução antibiótico-antimicótica). A suspensão obtida foi filtrada por malha de aço inoxidável de 0,04 mm, centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o pellet celular foi ressuspensionado em meio fresco. As células foram

então semeadas em frascos de cultivo de poliestireno e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂

Os macrófagos peritoneais (MΦ) foram isolados segundo o protocolo descrito por Ray e Dittel^[16]. Após tricotomia e assepsia da região abdominal, foram injetados 10 mL de PBS suplementado com 10% de solução antibiótica na cavidade peritoneal. Após leve massagem abdominal, o fluido peritoneal foi aspirado com seringa estéril e centrifugado. O pellet celular resultante foi ressuscitado em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de glutamina e 1% de solução antibiótico-antimicótica. As células foram cultivadas em frascos de poliestireno e mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ até a realização dos ensaios.

Avaliação de biocompatibilidade de HGM

A biocompatibilidade do HGM foi avaliada segundo as diretrizes estabelecidas pela norma ISO 10993^[17], utilizando extratos aquosos obtidos a partir do material liofilizado. Para a preparação dos extratos, o HGM puro foi incubado na proporção de 0,2 g/mL, a 37 °C por 24 horas sob agitação constante. Utilizou-se meio de cultivo livre de soro (DMEM) para os ensaios de viabilidade celular (MTT) e produção de óxido nítrico, e solução tampão PBS para o ensaio de hemólise. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram filtrados e empregados nos ensaios de hemocompatibilidade, citotoxicidade e resposta imunológica inicial.

Ensaio de hemólise quantitativa

O potencial hemolítico do HGM foi avaliado conforme protocolo descrito por Sæbø et al.^[18], utilizando hemácias de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). O sangue foi coletado com anticoagulante e centrifugado para obtenção da fração eritrocitária, que foi lavada três vezes com tampão PBS até completa remoção do plasma. Em seguida, foi preparada

uma suspensão de hemácias a 1%. Alíquotas de 100 µL da suspensão de eritrócitos foram misturadas com 100 µL dos extratos de HGM (100%, 75%, 50% e 25%) em microtubos estéreis e incubadas a 37 °C por 60 min. Tween 80 foi utilizado como controle positivo de lise, e PBS como controle negativo.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1700 rpm por 5 min, e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços com fundo transparente. A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplacas. Os valores obtidos das amostras tratadas com o composto de teste (OD_{test}) foram normalizados em relação às amostras de controle positivas (100% de lise; OD_{pos}) e negativas (não tratadas; OD_{neg}) para fornecer a razão de hemólise (HR) usando a equação 1:

$$OHR (\%) = \left(\frac{OD_{test} - OD_{neg}}{OD_{pos} - OD_{neg}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Ensaio de MTT

O ensaio de citotoxicidade através de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina) foi realizado com MSCs, conforme protocolo adaptado de Ng et al.^[19]. As células foram semeadas a densidade de $1,31 \times 10^3$ células/poço em placas de 96 poços contendo 100 µL de meio de cultivo. Após 24 horas de incubação para aderência, os extratos do HGM foram aplicados em concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%, mantendo-se células não tratadas como controle. Após 24 e 48h de exposição, adicionou-se solução de MTT (5 mg/mL), obtendo-se concentração final de 0,5 mg/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas a 37 °C, o meio foi removido, e os cristais de formazan foram dissolvidos com 100 µL de DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm utilizando leitor de microplacas (BioTek Elx800, Winooski, VT, EUA). Os dados foram expressos como densidade óptica (OD), proporcional à quantidade de células viáveis.

Quantificação de óxido nítrico

A quantificação de óxido nítrico foi realizada com MΦ cultivados em RPMI-1640 suplementado. As células foram semeadas a 2×10^5 células/poço e incubadas com extratos de HGM por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. A produção de NO foi determinada pela dosagem de nitrito no sobrenadante, utilizando o reagente de Griess, conforme protocolo adaptado de Carvalho et al.^[20]. A curva padrão foi preparada com nitrito de sódio (1 a 150 μM). A absorbância foi medida a 550 nm em leitor de microplacas (BioTek ELx800). O lipopolissacarídeo (LPS, 1 μg/mL) foi utilizado como controle positivo para ativação pró-inflamatória dos macrófagos.

Farmacologia de redes aplicada à predição de alvos osteogênicos da crisina

A estrutura bidimensional, tridimensional e a notação SMILES da crisina foram obtidas a partir do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; CID: 5281607). A sequência SMILES foi inserida na plataforma SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) para a identificação de alvos proteicos putativos, conforme metodologia descrita por Luo et al.^[21]. Paralelamente, genes relacionados à osteogênese foram obtidos no banco GeneCards (<https://www.genecards.org>), com base em critérios de relevância biológica, conforme adaptação de Fan et al.^[22].

A interseção entre os alvos da crisina e os genes osteogênicos foi determinada utilizando a ferramenta Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Os genes resultantes da interseção foram inseridos na plataforma STRING 11.0 (<https://string-db.org>) para construção da rede de interação proteína-proteína (PPI), considerando interações de alta confiança (score $\geq 0,7$). A rede foi exportada em formato tabular e analisada no software Cytoscape® 3.7.1, com cálculo de métricas de centralidade (grau, proximidade e intermediabilidade). A análise de agrupamento funcional foi realizada com

o algoritmo Markov Clustering Algorithm (MCL), com parâmetro de inflação ajustado para 3,0.

Docking molecular com alvos envolvidos em vias osteoimunológicas

A análise de acoplamento molecular foi realizada com alvos proteicos previamente descritos como relevantes para vias osteoimunológicas. As estruturas tridimensionais foram obtidas do banco Protein Data Bank (PDB), correspondendo aos complexos entre agonistas e receptores das seguintes proteínas: interleucina 6 (IL-6/IL-6R, PDB: 8QY5), interleucina 1 β (IL-1RA/IL-1R, PDB: 1IRA), complexo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α /TNFR1, PDB: 7KP8), ciclo-oxigenase 2 (COX-2, PDB: 5IKQ). Além disso, foram incluídas proteínas reguladoras das vias Wnt e BMP: glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3 β , PDB: 4PTC), Noggin (PDB: 1M4U), Sclerotin (PDB: 2K8P), receptor de estrogênio (ER, PDB: 1R5K) e receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ , PDB: 2YFE). As estruturas foram preparadas no software Discovery Studio, com remoção de moléculas de água, ligantes e cofatores, e definição do sítio ativo com base nos resíduos críticos de interação descritos na literatura.

A estrutura da crisina (CID: 5281607) foi obtida no banco PubChem, em formato SDF, e otimizada no software Avogadro utilizando o campo de força MMFF94s. O acoplamento molecular foi realizado no software Molegro Virtual Docker (MVD), com cálculo da energia de ligação (kcal/mol) e análise qualitativa das interações entre a crisina e os resíduos ativos das proteínas selecionadas. Inibidores comparativos descritos para cada alvo foram utilizados como referência.

Predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas da crisina (ADMET)

As propriedades farmacocinéticas e toxicológicas da crisina foram avaliadas por meio da plataforma ADMETlab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com>), utilizando a notação SMILES obtida no banco PubChem. Foram analisados parâmetros relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), incluindo permeabilidade intestinal, biodisponibilidade oral, ligação a proteínas plasmáticas, metabolismo hepático (CYP450), meia-vida estimada, toxicidade hepática, genotoxicidade e potencial carcinogênico. Os dados preditivos foram organizados em formato tabular e utilizados para complementar a avaliação do potencial farmacológico e da segurança da crisina.

Simulações Computacionais por Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

A estrutura da crisina (5,7-dihydroxiflavona) foi inicialmente construída utilizando o software Avogadro (versão 1.9.1), com geometria inicial baseada na conformação planar mais estável da literatura. A maltotriose, adotada como modelo representativo do hidrogel de goma de mandioca (HGM), foi também desenhada no Avogadro a partir de três unidades de α -D-glucopiranosose com ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$. Para simular a funcionalização do HGM, foi simulada uma ligação do tipo ponte de hidrogênio entre a crisina e a maltotriose (HGM-Cr).

As três estruturas (crisina, HGM e HGM-Cr) foram submetidas à otimização completa da geometria molecular utilizando o pacote ORCA (versão 6.0.1). Os cálculos foram conduzidos com o funcional híbrido B3LYP e base de funções def2-SVP, empregando o formalismo de aproximação RIJCOSX para ganho de eficiência computacional. Após a otimização, foram realizados cálculos de frequência vibracional para obtenção dos espectros teóricos de infravermelho (FTIR) e para determinação dos parâmetros termodinâmicos, incluindo a energia livre de Gibbs (G) e a entalpia (H) a

298,15 K. A interação entre a crisina e o HGM foi avaliada com base na variação da energia livre de Gibbs (ΔG) e da entalpia (ΔH) do sistema, conforme as seguintes equações:

$$\Delta G_{\text{interação}} = G_{\text{HGM-Cr}} - (G_{\text{HGM}} + G_{\text{Crisina}}) \quad (2)$$

$$\Delta H_{\text{interação}} = H_{\text{HGM-Cr}} - (H_{\text{HGM}} + H_{\text{Crisina}}) \quad (3)$$

Os espectros FTIR foram gerados em unidades de número de onda (cm^{-1}) e transmitância (%), permitindo a comparação qualitativa com os dados experimentais. Os arquivos de saída foram processados com auxílio de scripts em Python para a convolução espectral e geração dos gráficos, empregando função de perfil pseudo-Voigt com largura a meia altura ajustada para 10 cm^{-1} .

Análise estatística

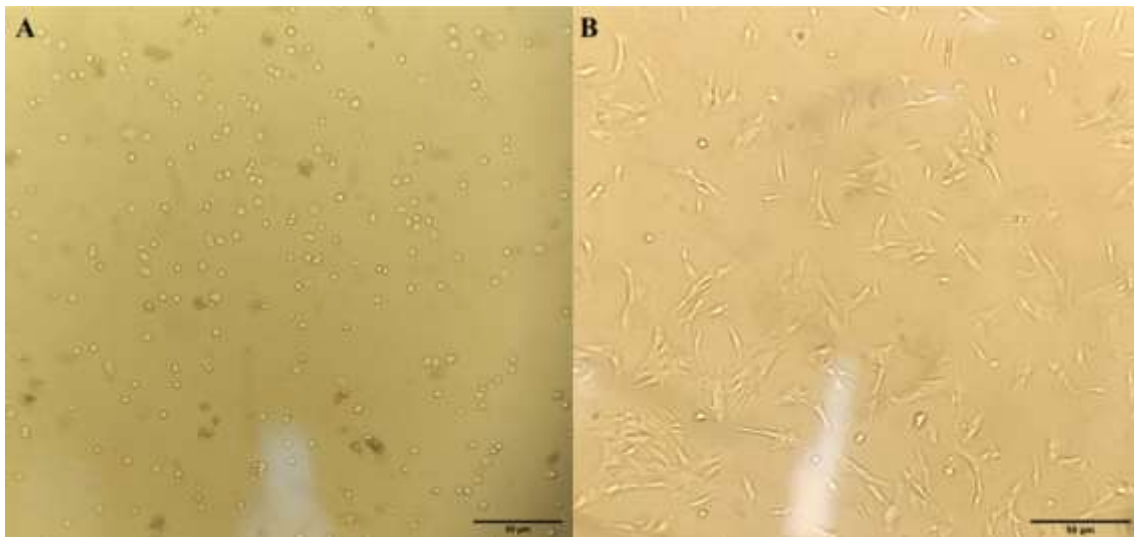
Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism[®] versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), com aplicação de testes apropriados a cada conjunto de dados. Para o ensaio de produção de óxido nítrico (NO), utilizou-se ANOVA one-way seguida de pós-teste de Dunnett, comparando os tratamentos com o controle negativo. Os dados do ensaio MTT foram analisados por ANOVA two-way, também seguida de pós-teste de Dunnett, avaliando os efeitos combinados do tempo e da concentração. Já os resultados do ensaio de hemólise foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparação múltipla entre grupos. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Isolamento e expansão celular

As características morfológicas das culturas de MSCs e MΦ estão apresentadas na Figura 1. As MSCs exibiram padrão fibroblastóide típico, com citoplasma alongado, núcleo excêntrico e crescimento em monocamada aderente, indicando viabilidade e estabilidade morfológica em meio de cultivo enriquecido. Os MΦ, por sua vez, apresentaram morfologia arredondada, com citoplasma compacto e aderência parcial ao substrato, formando monocamada de baixa confluência, conforme esperado para culturas primárias não ativadas.

Figura 1 – Imagens representativas da morfologia celular após 96 horas de cultivo. (A) Macrófagos peritoneais (MO) com morfologia arredondada e padrão de adesão característico. (B) Células sinalizados medicinais da medula óssea (MSCs) com morfologia fibroblastoide e crescimento aderente. Microscopia óptica com objetiva de 10×, escala de 50 μm.



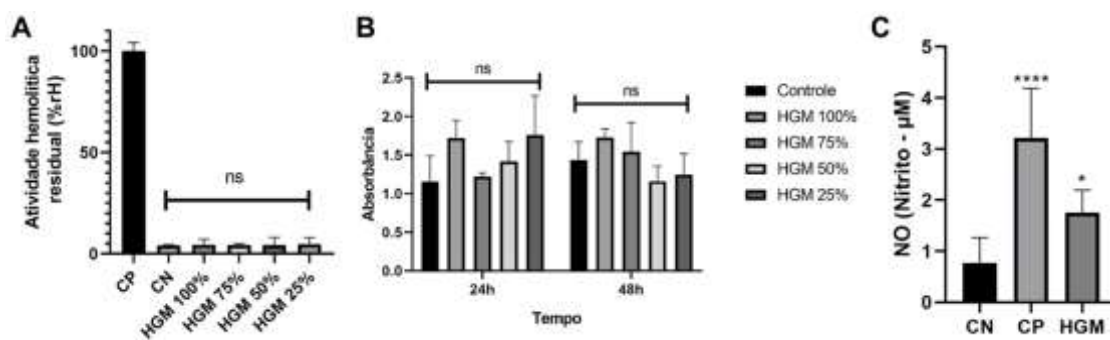
Avaliação da biocompatibilidade do hidrogel de goma de mandioca (HGM)

A biocompatibilidade do HGM foi avaliada por meio de ensaios de hemólise, MTT e produção de NO (Figura 2). A atividade hemolítica residual dos hidrogéis foi quantificada com base na liberação de hemoglobina por hemácias expostas aos extratos de HGM em diferentes concentrações, o CP apresentou hemólise máxima ~100%, enquanto CN e todas as concentrações de HGM apresentaram atividade hemolítica <5% ($p > 0,05$).

O potencial citotóxico do HGM foi avaliado por meio do ensaio de MTT, o qual não evidenciou diferença significativa entre os grupos tratados e o controle, tanto em 24 quanto em 48 horas de exposição ($p > 0,05$). Observou-se uma tendência de aumento da atividade metabólica nas concentrações de 75% e 100%, sugerindo possível estímulo à proliferação celular, embora sem significância estatística.

Por fim, a produção de NO por macrófagos tratados com HGM foi significativamente maior que no grupo controle negativo (CN), mas significativamente menor que no grupo tratado com LPS ($p < 0,05$).

Figura 2. Avaliação da biocompatibilidade do hidrogel de goma de mandioca (HGM). (A) Porcentagem de hemólise induzida por extratos de HGM em diferentes concentrações. (B) Viabilidade celular de MSCs após 24 e 48 horas de exposição. (C) Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais após 24 horas de incubação. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.



Análise de farmacologia de redes e ontologia genética

A análise farmacológica das redes relacionadas à osteogênese da crisina mostrou potencial promissor. Suas estruturas bidimensional e tridimensional foram obtidas do banco de dados PubChem. Identificaram-se 61 genes-alvo potenciais associados à crisina.

Em paralelo, foram obtidos 1852 genes relacionados à osteogênese. A interseção entre esses dois conjuntos revelou 23 genes compartilhados, o que representa 1,24% do total de genes osteogênicos e 37,7% dos genes-alvo da crisina (Figura 3A). Esses genes foram considerados como alvos moleculares convergentes, potencialmente envolvidos na mediação dos efeitos osteoindutores da crisina.

Na etapa seguinte, os genes compartilhados foram analisados quanto às suas interações em uma rede de interação proteína–proteína (PPI) (Figura 3B). As métricas de centralidade (grau, proximidade e intermediabilidade) indicaram os genes PPARG, PTGS2, GSK-3B, ESR1 e PARP1 como nós principais da rede, devido à sua alta conectividade e influência topológica (Tabela 1).

Esses genes foram associados a funções regulatórias críticas, sugerindo sua relevância na promoção de processos osteogênicos mediados por sinalização intracelular e regulação transcricional.

Figura 3. Interseção e conectividade funcional entre os genes-alvo da crisina e os genes relacionados à osteogênese. (A) Diagrama de Venn demonstrando a sobreposição entre os genes preditos como alvos da crisina e os genes associados à osteogênese. (B) Rede de interação proteína–proteína (PPI) construída com os 23 genes.

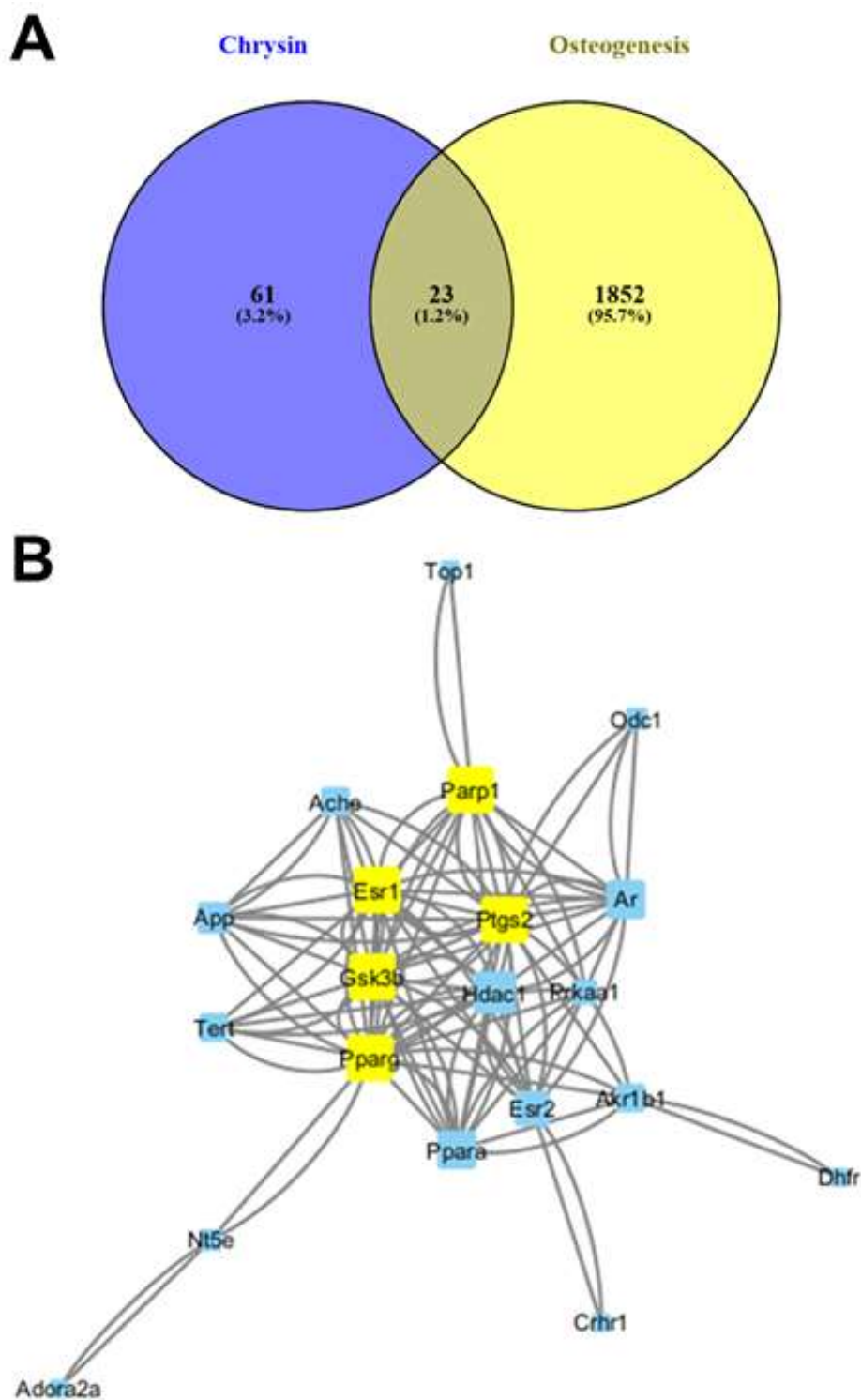


Tabela 1. Métricas de centralidade calculadas para os genes compartilhados entre a crisina e a osteogênese na rede PPI. As métricas incluem grau, proximidade e intermediabilidade.

| Gene | Grau | Proximidade | Intermeabilidade |
|-------------|-------------|--------------------|-------------------------|
| PPARG | 24 | 0,70 | 0,32 |
| PTGS2 | 22 | 0,68 | 0,19 |
| GSK-3B | 22 | 0,66 | 0,08 |
| ESR1 | 20 | 0,63 | 0,06 |
| PARP1 | 16 | 0,58 | 0,13 |
| HDAC1 | 16 | 0,59 | 0,04 |
| PPARA | 14 | 0,56 | 0,03 |
| AR | 14 | 0,54 | 0,03 |
| ESR2 | 12 | 0,50 | 0,11 |
| APP | 10 | 0,51 | 0,00 |
| TERT | 8 | 0,49 | 0,00 |
| AKR1B1 | 8 | 0,51 | 0,11 |
| ACHE | 8 | 0,50 | 0,00 |
| PRKAA1 | 6 | 0,46 | 0,00 |
| ODC1 | 4 | 0,43 | 0,00 |
| NT5E | 4 | 0,44 | 0,11 |
| TOP1 | 2 | 0,37 | 0,00 |
| DHFR | 2 | 0,35 | 0,00 |
| CRHR1 | 2 | 0,34 | 0,00 |
| ADORA2A | 2 | 0,31 | 0,00 |

A análise de cluster realizada no STRING identificou quatro agrupamentos principais, que ajudam a contextualizar os papéis funcionais dos genes compartilhados (Figura 4). O Cluster 1 destacou-se como o mais relevante, composto por 14 genes envolvidos em vias regulatórias importantes para a osteogênese, como a "Hormone-mediated signaling pathway". Em contraste, os Clusters 2, 3 e 4, cada um com apenas dois genes, apresentaram menor conectividade na rede. O Cluster 2 incluiu os genes *ACHE* e *NT5E*, o Cluster 3 agrupou os genes *TOP1* e *CRHR1*, enquanto o Cluster 4 foi composto por *DHFR* e *ADORA2A*, associados a processos metabólicos específicos, como a "Folate biosynthesis".

A análise de ontologia gênica (GO) realizada para os genes do Cluster 1 revelou categorias funcionais relacionadas à osteogênese, incluindo a "Hormone-mediated signaling pathway" e a "Regulation of transcription by RNA polymerase II" (Figura 5). A "Hormone-mediated signaling pathway" envolve genes como *ESR1*, *ESR2*, *PPARG* e *PTGS2*, que participam da modulação de fatores osteogênicos por meio da ativação de receptores hormonais e sinalização celular, fundamentais para a diferenciação de osteoblastos. Já a "Regulation of transcription by RNA polymerase II" destaca genes como *HDAC1*, *PPARA* e *GSK-3B*, que regulam a expressão de genes envolvidos na síntese de matriz óssea e no controle do ciclo celular osteoblástico.

Outras categorias incluem "Cellular response to hormone stimulus", que reflete a ativação de vias hormonais em resposta a estímulos externos, e "Positive regulation of gene expression", que envolve genes como *PARP1*, *AR* e *ESR1*, conhecidos por promover a transcrição de genes osteogênicos e regular a homeostase óssea. Além disso, categorias como "Regulation of DNA-templated transcription" e "Response to steroid hormone" sugerem a participação de genes como *GSK-3B* e *PPARG* na resposta a esteroides e no controle transcricional.

Figura 4. Análise de clusters da rede PPI dos genes compartilhados entre a crisina e a osteogênese. (A) Distribuição dos genes por cluster. O Cluster 1, associado ao "Hormone-mediated signaling pathway," contém 14 genes. (B) Rede PPI com clusters destacados por cores, evidenciando o Cluster 1 (vermelho) como o mais conectado.

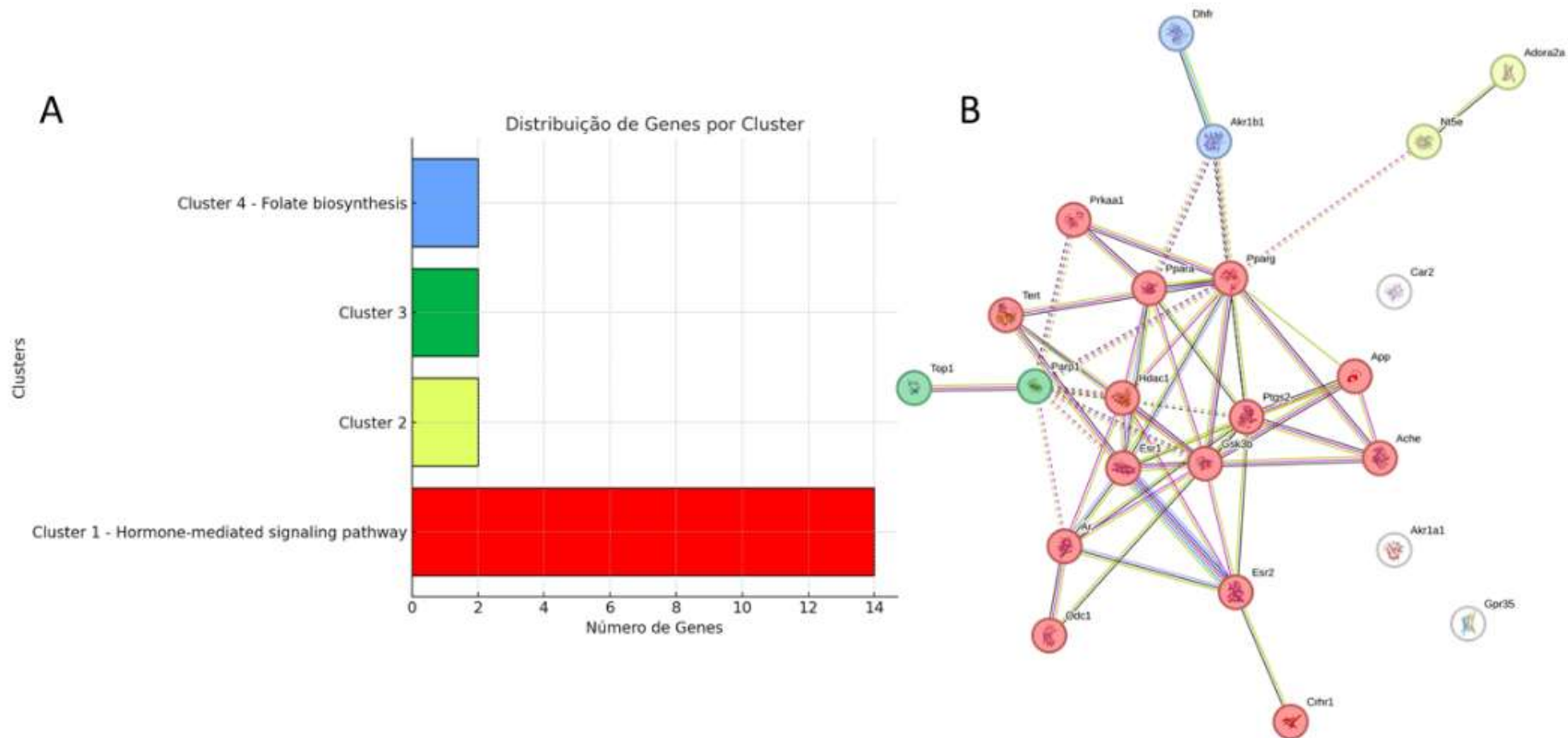
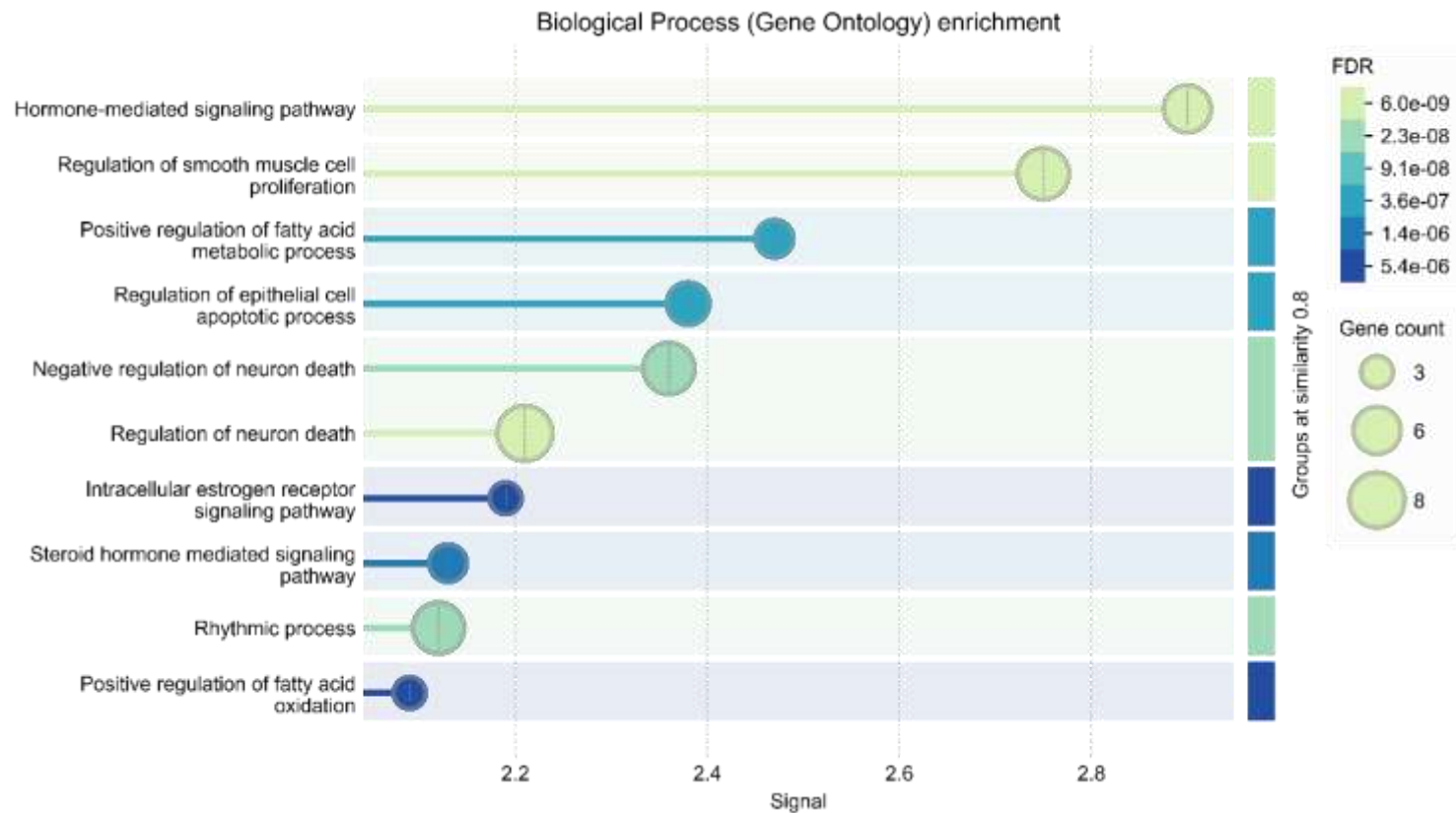


Figura 5. Análise de Gene Ontology (GO) do Cluster 1. Enriquecimento funcional dos genes do Cluster 1, com tamanho dos círculos representando a contagem de genes e cores indicando o FDR (False Discovery Rate). Categorias destacadas incluem "Hormone-mediated signaling pathway" e "Regulation of transcription by RNA polymerase II", associadas à osteogênese.



Análise de docking molecular entre a crisina e alvos de vias osteogênicas e inflamatórias

A simulação de acoplamento molecular entre a crisina e proteínas-alvo envolvidas na osteoimunomodulação revelou interações energeticamente favoráveis com moduladores críticos do microambiente ósseo. As menores energias de ligação foram observadas nos complexos com Noggin (-95,08 kcal/mol), IL-6/IL-6R (-90,41 kcal/mol), TNF- α /TNFR1 (-89,79 kcal/mol) e Sclerostin (-74,20 kcal/mol). Energias intermediárias foram registradas para GSK-3 β (-67,00 kcal/mol) e IL-1 β /IL-1RA (-66,59 kcal/mol).

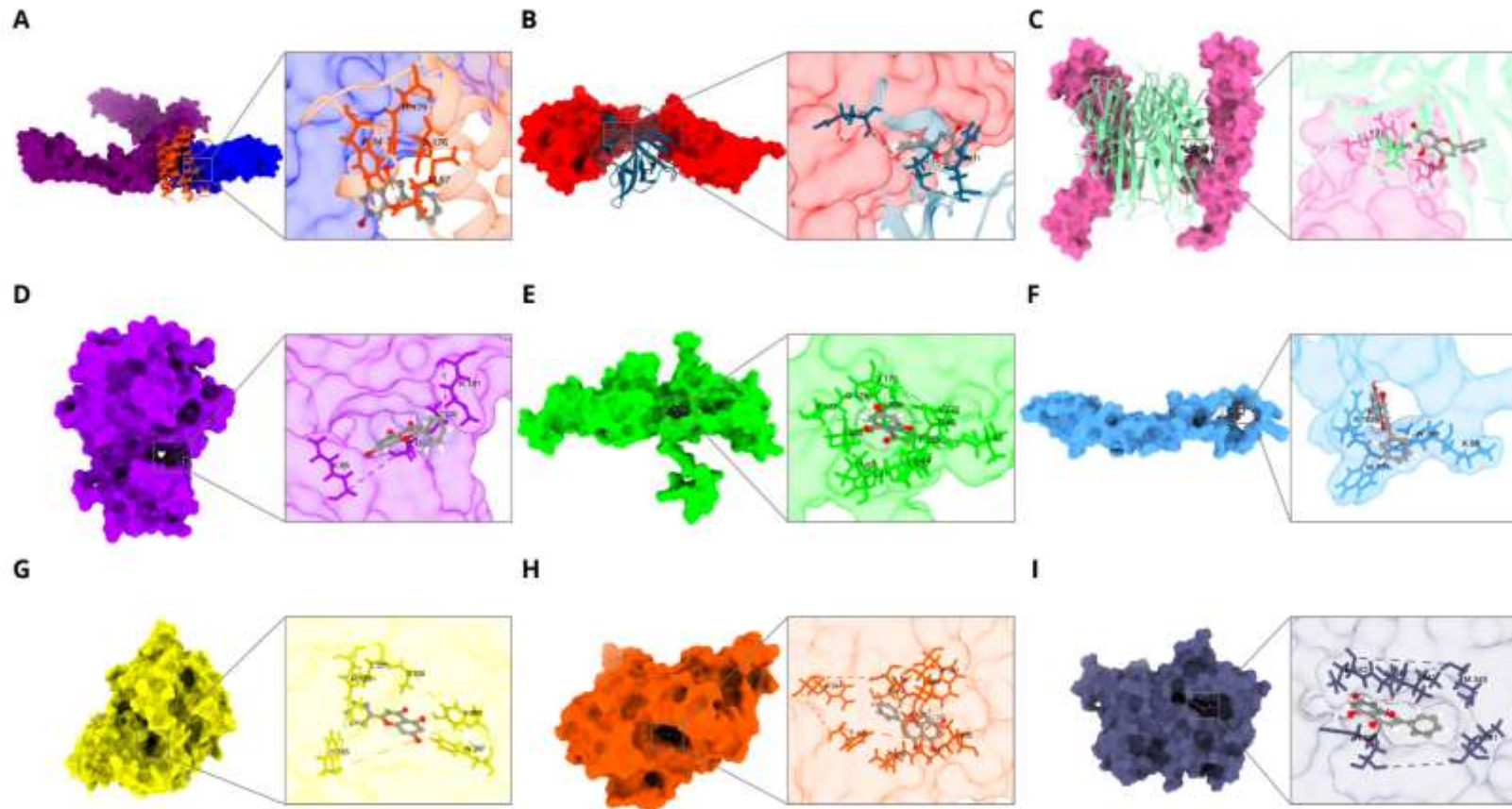
Na comparação com os ligantes padrão co-cristalizados ou descritos na literatura, a crisina apresentou afinidades inferiores. No entanto, os valores observados encontram-se dentro da faixa considerada compatível com ligações moleculares estáveis, reforçando seu potencial como agente funcionalizante com atividade osteoimunomoduladora (Tabela 2)^[23].

A análise tridimensional dos complexos (Figura 6) evidenciou o encaixe adequado da crisina nos sítios de ligação das proteínas-alvo, com formação de pontes de hidrogênio, interações π e hidrofóbicas com resíduos funcionalmente relevantes. Os principais resíduos envolvidos nas interações moleculares estão apresentados de forma resumida na Figura S1, que sintetiza os alvos, resíduos interagentes e os tipos predominantes de interação.

Tabela 2. Energia de interação (kcal/mol) entre a crisina e diferentes alvos osteogênicos, em comparação com inibidores padrão utilizados como referência.

| Alvo Proteico | Ligante Comparativo | Energia da Crisina (kcal/mol) | Energia do Ligante Padrão (kcal/mol) |
|----------------------|----------------------------|--------------------------------------|---|
| IL-6/IL-6R | Bazedoxifeno | -90,41 | -113,06 |
| IL-1 β /IL-1RA | ZINC32854294 | -66,59 | -40,98 |
| TNF- α /TNFR1 | ZINC2968981 | -89,79 | -165,41 |
| GSK-3 β | CHEMBL3410089 | -66,99 | -104,87 |
| Noggin | AKOS016943781 | -95,08 | -120,54 |
| Sclerostin | Baicalina | -74,20 | -96,58 |
| COX-2 | Ác. meclofenâmico | -100,16 | -101,48 |
| ER | GW5638 | -84,43 | -124,01 |
| PPAR- γ | Amorfrutin 1 | -87,98 | -129,90 |

Figura 6. Representações tridimensionais dos complexos formados entre a crisina e os alvos osteoimunológicos selecionados, obtidas por simulações de docking molecular. Os painéis (A–I) mostram o encaixe da crisina nos sítios ativos das proteínas IL-6/IL-6R, IL1 β /IL-1RA, TNF- α /TNFR1, GSK-3 β , Noggin, Sclerostin, COX-2, ER e PPAR- γ , respectivamente, com destaque para os principais resíduos interagentes.



Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas da crisina (ADMET)

A predição computacional do perfil ADMET da crisina indicou propriedades compatíveis com compostos bioativos de interesse terapêutico, com ênfase na segurança, estabilidade metabólica e ausência de toxicidade relevante^[24]. O coeficiente de ligação às proteínas plasmáticas (PPB) foi elevado (> 90%), indicando afinidade por ambientes lipofílicos, o que favorece sua ancoragem em matrizes poliméricas e sua liberação controlada em sistemas de aplicação local. Do ponto de vista metabólico, a crisina não demonstrou inibição significativa das principais isoformas do sistema enzimático do citocromo P450 (CYP), com exceção da CYP1A2, para a qual foi predita uma inibição moderada. Esse perfil indica baixo risco de interações metabólicas, o que favorece sua utilização em formulações combinadas com outras moléculas bioativas.

Em relação à toxicidade, os modelos preditivos não indicaram mutagenicidade nem carcinogenicidade. A toxicidade aguda oral predita, expressa como dose letal mediana (LD₅₀), foi de 2000 mg/kg, o que a classifica na Classe IV segundo o sistema ProTox-II^[25], sendo considerada de baixa toxicidade aguda. Esse dado é especialmente relevante para o uso local, pois sugere segurança em caso de eventual absorção sistêmica residual. Os parâmetros físico-químicos da crisina, como peso molecular, lipofilicidade e estabilidade estrutural, também se mostraram compatíveis com sua incorporação em hidrogéis naturais, favorecendo sua funcionalização em sistemas de liberação controlada aplicados à regeneração óssea (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil farmacocinético e toxicogenômico predito para a crisina com base em ferramentas *in silico*.

| Parâmetro | Resultado predito | Interpretação |
|---|--------------------------|--------------------------------|
| Ligação a proteínas plasmáticas | > 90% | Alta lipoflicidade |
| Substrato de P-glicoproteína | Não | Baixo risco de efluxo celular |
| Inibição de CYP1A2 | Sim (moderada) | Potencial metabolismo hepático |
| Inibição de outras CYPs | Não | Baixa interação farmacológica |
| Mutagenicidade (Ames test) | Não | Não mutagênico |
| Carcinogenicidade | Não | Não carcinogênico |
| Toxicidade aguda oral (LD ₅₀) | 2000 mg/kg | Classe IV (baixa toxicidade) |
| Classe de toxicidade (ProTox-II) | IV | Seguro em modelo roedor |
| Perfil físico-químico | Compatível | Estável e funcionalizável |

Simulações por DFT

Análise termodinâmica da interação HGM-Crisina

Os resultados da análise termodinâmica, detalhados na Tabela 4, confirmam a viabilidade da encapsulação da crisina na matriz HGM. O principal indicador deste processo, a Variação da Energia Livre de Gibbs de Interação (ΔG_{int}), apresentou um valor expressivo de -321,2 kcal/mol. Este resultado demonstra a alta espontaneidade na formação do complexo HGM-Cr.

Analisando os componentes dessa energia, observa-se que a interação é fortemente impulsionada pela entalpia, indicando a formação de interações favoráveis que liberam energia. Essa contribuição entálpica supera a pequena penalidade entrópica ($T^*S = -16,1$ kcal/mol), que geralmente reflete uma maior organização do sistema ao formar o complexo.

Tabela 4. Valores de Energia Livre de Gibbs (G) e Entalpia (H) para a Crisina, o HGM e o complexo HGM-Cr, calculados pela Teoria do Funcional da Densidade (DFT) a 298,15 K. A linha "Interação (Δ)" representa a variação termodinâmica. Todos os valores são expressos em kcal/mol.

| Sistema | G (kcal/mol) | H (kcal/mol) |
|------------------------|--------------|--------------|
| Crisina | -550482,7 | -550447,3 |
| HGM | -1149479,0 | -1149356,3 |
| HGM-Cr | -1700282,9 | -1700141,6 |
| Interação (Δ) | -321,2 | -337,3 |

Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

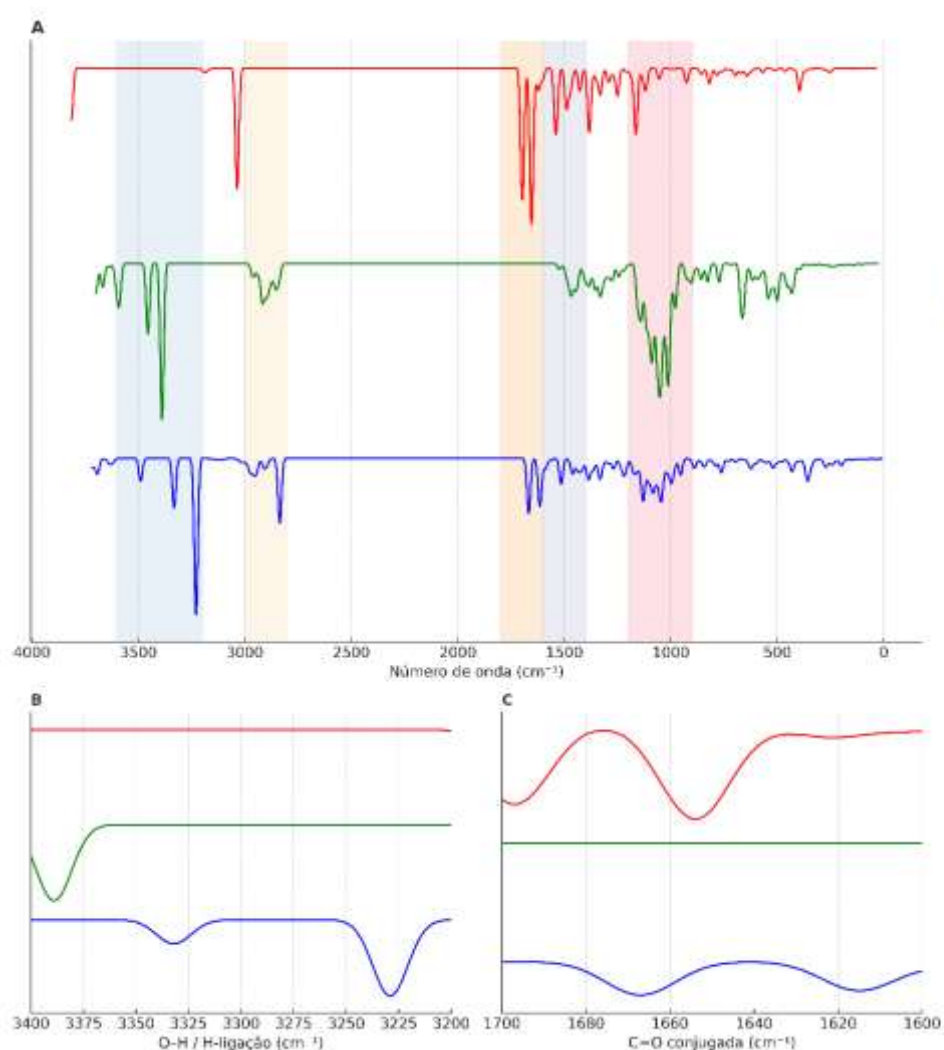
Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos para Cr, HGM e HGM-Cr, representados na figura 7. A crisina (linha vermelha), apresentou as bandas de absorção esperadas para sua estrutura. Um pico acentuado foi observado em aproximadamente 1650 cm^{-1} , referente ao grupo C=O conjugado. Na região de 1600 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} , foram identificadas bandas correspondentes aos anéis aromáticos (C=C). Adicionalmente, sinais relacionados a grupos O-H foram vistos na região de $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ e entre $1350\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$.

Para HGM (linha verde), o espectro foi dominado por uma banda larga e intensa centrada em $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$ (O-H/Ligações de H). Observaram-se também picos em $\sim 2930\text{ cm}^{-1}$ (C-H) e um conjunto de bandas fortes na região de 1150 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} , atribuídas a vibrações C-O-C e C-O.

No espectro de HGM-Cr (linha azul), observaram-se bandas provenientes de ambos os componentes, Cr e HGM. Em comparação com os espectros dos materiais de partida, foram identificadas modificações nos picos: a banda C=O em $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ mostrou-se presente, porém com ligeiro deslocamento e menor definição; a banda O-H

em $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$ apresentou alterações em sua forma e largura; e a região entre 1300 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} exibiu um padrão de absorção que difere da simples sobreposição dos espectros de Cr e HGM.

Figura 7. Espectros FTIR simulados por DFT para a crisina (vermelho), hidrogel de goma de mandioca (HGM, verde) e sistema funcionalizado HGMCR (azul). (A) Espectro completo. (B) Ampliação da região O–H ($3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$). (C) Ampliação da região C=O ($1600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$).



Discussão

Este estudo visou empregar uma abordagem multifacetada, combinando avaliações computacionais e experimentais preliminares, a fim de investigar a interação entre a molécula de crisina e o HGM, bem como a funcionalização de suas propriedades físico-químicas para as características fisiopatológicas de interesse à reparação óssea, num modelo *in silico*, como etapa preditora para um futuro estudo *in vitro*. O HGM e a crisina destacam-se pelo elevado potencial para aplicações bioativas e obtenção biorrenovável [9, 26–28], cujo potencial reparador e imunomodulador *in vitro* vem sendo explorado em aplicações na medicina regenerativa [29, 30]. Nesse contexto, o estudo *in silico* desempenhou um papel preditivo do potencial bioativo do flavonóide e da capacidade da sua funcionalização ao HGM, servindo como base para direcionar futuras validações experimentais [31–33].

Os métodos computacionais empregados geraram hipóteses mecánísticas e estimaram comportamentos moleculares que, em situações experimentais, seriam difíceis, dispendiosos ou demorados de investigar, principalmente em estudos prospectivos, nos quais o comportamento bioativo dos compostos em estudo ainda não são devidamente elucidados [34–36].

Ao se utilizar o método de ‘network pharmacology’, foi possível identificar 23 alvos compartilhados entre os alvos putativos da crisina e genes relacionados ao processo de osteogênese [21, 37, 38]. Tal sobreposição, embora modesta (1,24% do total de genes osteogênicos), é funcionalmente relevante concentrando-se em hubs na rede PPI. Genes descritos com alta conectividade, como PPAR γ , PTGS2, GSK3B, ESR1 e PARP1 mostraram relação direta com vias metabólicas de importância no processo de reparo ósseo. Como ressaltado por Wang et al.^[39], a ativação da via Wnt/ β -catenina é indispensável para o recrutamento e diferenciação de osteoblastos durante a formação óssea. De forma complementar, outro estudo destacou que a atividade de PARP1 regula positivamente a

expressão de genes osteogênicos como RUNX2, reforçando seu papel no controle transcricional do processo regenerativo^[40].

PPARG é um regulador clássico da adipogênese e atua como antagonista funcional da diferenciação osteoblástica^[41]. Sua ativação promove a linhagem adipocítica em detrimento da osteogênica, principalmente por meio da supressão da via Wnt/ β -catenina^[42]. Em estudo com cultivo de MSCs em meio livre de soro, Ho et al.^[43] observaram que a adipogênese foi aumentada no grupo sem soro, com maior expressão de PPARG e acúmulo lipídico, sugerindo que a regulação desse fator de transcrição é sensível ao microambiente extracelular. Além disso, Baroi et al.^[44] reforçam que PPARG é essencial para a produção de Sclerotin em osteócitos e regula diretamente a remodelação óssea por meio da modulação da expressão de SOST. A identificação de PPARG como um dos principais hubs na rede funcional analisada sugere que a crisina, reconhecida como agonista parcial desse receptor, possa modular sua atividade de forma seletiva, atenuando processos inflamatórios e promovendo um ambiente mais favorável à diferenciação osteoblástica, sobretudo em condições de desbalanço metabólico ou inflamação crônica^[45].

A presença de GSK-3 β na rede é particularmente relevante, uma vez que essa quinase é um inibidor direto da β -catenina, componente central da via Wnt, essencial para a maturação osteoblástica e formação de matriz mineralizada^[46]. A via Wnt/ β -catenina é ativada fisiologicamente durante a regeneração óssea e está entre os principais alvos terapêuticos para biomateriais funcionalizados^[47, 48]. Ao inibir GSK-3 β , a crisina pode potencialmente amplificar essa sinalização, hipótese reforçada pelos resultados do docking molecular, que mostraram interação estável entre o composto e a proteína.

A ativação de ESR1 exerce influência direta sobre a homeostase óssea, especialmente em contextos de inflamação e desequilíbrio hormonal. No presente estudo, a sua identificação como alvo funcional da crisina é relevante, considerando que esse receptor atua como

modulador da diferenciação osteoblástica e da manutenção da massa mineral ^[37]. De acordo com Pelusi et al.^[49], a ativação de ESR1 promove a atividade osteoblástica em células de pacientes osteoporóticos, mediando sua ação por meio da ativação subsequente da via Wnt/ β -catenina.

PTGS2, que codifica a enzima COX-2, exerce papel essencial na mediação da inflamação aguda e no início da ossificação endocondral, por meio da síntese de prostaglandinas osteoativas^[50]. Segundo Salhotra et al.^[2], a indução de COX-2 é necessária para a formação do calo ósseo primário, atuando como elo funcional entre os estímulos inflamatórios iniciais e a diferenciação osteocondrogênica. Sendo recentemente identificado como um fator também angiogênico^[51].

A identificação desses genes centrais individualmente, contudo, ganha maior robustez quando analisada sob a perspectiva topológica da rede de interação. Observa-se que os genes com maior conectividade funcional estão concentrados em um mesmo agrupamento (Cluster 1), configurando um núcleo de sinalização com implicações diretas para a osteogênese, a modulação hormonal e o controle transcricional (evidenciadas nas análises de enriquecimento funcional). Estudos prévios já demonstraram que genes altamente conectados em redes de coexpressão ou interação física tendem a ocupar papéis centrais na diferenciação osteoblástica de MSCs, como demonstrado por Wu et al.^[52] em modelo induzido por BMP-9 e por Zhao e Tu^[53], em modelo de osteoporose. Permitindo criar hipóteses mais claras da viabilidade da utilização da crisina como um agente funcionalizador com potencial osteomodulador.

De maneira complementar, as simulações de docking molecular predizeram interações favoráveis entre a crisina e proteínas-alvo relevantes para a osteoimunomodulação. As energias de ligação calculadas, mesmo sendo inferiores aos ligantes padrão em alguns casos, foram consideradas compatíveis com interações moleculares estáveis. Esses resultados preditivos reforçaram a hipótese de que a crisina pode atuar como um modulador dual, potencialmente

atenuando a resposta inflamatória inicial (via interações com citocinas e COX-2) e ativando vias pró-osteogênicas (via interações com GSK-3 β , Sclerostin, Noggin e receptores hormonais) que é altamente desejável no contexto da regeneração óssea [11, 29]. A atuação simultânea sobre mediadores inflamatórios e alvos osteogênicos indica que o composto pode contribuir para uma transição molecular mais coordenada entre a resposta inflamatória inicial e os eventos subsequentes de diferenciação celular, o que é particularmente relevante no contexto da regeneração óssea^[54].

Adicionalmente, a predição ADMET da crisina indicou um perfil de segurança e farmacocinética preditiva compatível com a aplicação local em biomateriais. a ausência de mutagenicidade/carcinogenicidade preditas e, notavelmente, a alta ligação a proteínas plasmáticas (>90%) sugerem que a crisina seria adequada para integração em matrizes poliméricas como o HGM, o que pode contribuir para a retenção local, estabilidade e prolongamento do tempo de liberação^[55].

Por fim, as simulações de DFT complementaram a caracterização experimental, indicando que a formação do complexo HGM-Cr é termodinamicamente favorável ($\Delta G_{int} = -321,2$ kcal/mol) e espontânea [56, 57]. Adicionalmente, os espectros simulados de FTIR obtidos por DFT complementam e reforçam os achados teóricos, confirmando que a funcionalização promove modificações vibracionais condizentes com a estrutura química do derivado formado e a manutenção da estabilidade estrutural do polímero base, métodos estes descritos por Montenegro et al.^[58] como ferramentas computacionais poderosas e confiáveis essenciais para guiar assertivamente o design e a otimização de sistemas para aplicações biomédicas através da modelagem matemática.

Apesar do valor inegável na geração de hipóteses e racionalização, é fundamental reconhecer as limitações inerentes aos estudos *in silico*. Os resultados obtidos são simulações e predições baseadas em modelos computacionais, e não representam a prova experimental

direta da interação e do efeito biológico em um sistema vivo ou celular real, como reforçam diversos trabalhos [32, 36, 59, 60]. A afinidade predita no docking molecular, por exemplo, sugere um potencial de ligação, mas não confirma que essa interação ocorrerá na complexa matriz celular e extracelular nem que resultará no efeito funcional esperado *in vitro* ou *in vivo*[61].

A segurança e a confiabilidade dos resultados de testes *in vitro* e *in silico* diferem fundamentalmente em sua natureza. Testes *in vitro* fornecem evidências experimentais diretas da interação de um material ou composto com células ou tecidos em um ambiente controlado, refletindo seu comportamento biológico real[62, 63].

No presente trabalho, os ensaios *in vitro* de biocompatibilidade, embora realizados com o HGM puro, demonstraram experimentalmente que a matriz é não-hemolítica (<5% de hemólise)[64–66], não citotóxica para MSCs[67, 68] e não induz resposta inflamatória exacerbada em macrófagos[69, 70]. Estes são dados experimentais que atestam a segurança e aplicabilidade da matriz base em contato com sistemas biológicos, baseados em ensaios atestados por comitês internacionais de validação de materiais biológicos[71].

Por outro lado, os resultados *in silico*, são predições que permitem inferências racionais para justificar, ou não, testes *in vitro* posteriores. Dessa forma, subsidia e fortalece as hipóteses assumidas antes de serem testadas em sistemas *in vitro*, reduzindo custos, uso de animais cobaias e alocação de técnicos e equipamentos laboratoriais. Os resultados *in silico* são ferramentas poderosas para a triagem inicial, para focar a investigação em alvos ou mecanismos promissores e para otimizar o desenho experimental, mas não devem substituir a validação experimental direta em sistemas biológicos relevantes.

Apesar disso, a escolha do biomaterial HGM e a incorporação à crisina, demonstrou-se uma estratégia de bioengenharia racionalmente delineada, conforme já indicado anteriormente[72]. A combinação do perfil de biocompatibilidade experimental do HGM com as predições *in silico* favoráveis da crisina (potencial bioativo em múltiplos alvos, perfil ADMET

promissor, viabilidade termodinâmica da interação) compõem evidências empíricas racionais que justificam a ampliação subsequente do estudo com ensaios *in vitro*.

Este estudo demonstrou *in silico* o promissor potencial osteoimunomodulador da crisina, evidenciado por interações favoráveis com alvos moleculares chave para a osteogênese e inflamação, perfil ADMET e a formação termodinamicamente estável do complexo com o hidrogel de goma de mandioca (HGM-Cr). Tais estimativas, somadas aos resultados *in vitro* que atestaram a biocompatibilidade do HGM puro (não-hemolítico, não-citotóxico e com baixa indução inflamatória), fornecem embasamento para a subsequente validação experimental *in vitro* do complexo HGM-Cr como um biomaterial funcional destinado à engenharia de tecido ósseo. Pretende-se ampliar este estudo com ensaios *in vitro* da diferenciação osteoblástica e modulação imunológica de MSCs e MO em contato com o HGM-Cr, bem como a caracterização da cinética de liberação da crisina.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Núcleo de Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) e ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), assim como ao Grupo de Pesquisa em Química Quântica Computacional e Planejamento de Fármacos da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), pelo valioso apoio técnico e científico.

Contribuição dos autores

Wanderson Gabriel Gomes de Melo foi responsável pela conceituação, delineamento metodológico, investigação, curadoria dos dados, análise formal e redação do manuscrito original. Napoleão Martins Argôlo Neto contribuiu com a supervisão, revisão crítica e edição do manuscrito. Ambos os autores leram e aprovaram a versão final do manuscrito.

Declaração de Interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Brasil), por meio da bolsa nº 88887.878371/2023-00, no âmbito do “Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação – Parcerias Estratégicas nos Estados III (PDPG – Parcerias Estratégicas nos Estados III)”

Disponibilidade dos dados

Os dados que sustentam os achados deste estudo estão disponíveis no material suplementar que acompanha este artigo. Informações adicionais podem ser obtidas com o autor correspondente mediante solicitação razoável.

Referências

- [1] ElHawary, H.; Baradaran, A.; Abi-Rafeh, J.; Vorstenbosch, J.; Xu, L.; Efanov, J. I. Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair. *Seminars in Plastic Surgery*, **2021**, *35*, 198–203. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1732334>.
- [2] Salhotra, A.; Shah, H. N.; Levi, B.; Longaker, M. T. Mechanisms of Bone Development and Repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2020**, *21* (11), 696–711. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>.
- [3] Govoni, M.; Vivarelli, L.; Mazzotta, A.; Stagni, C.; Maso, A.; Dallari, D. Commercial Bone Grafts Claimed as an Alternative to Autografts: Current Trends for Clinical Applications in Orthopaedics. *Materials*, **2021**, *14* (12), 3290. <https://doi.org/10.3390/ma14123290>.
- [4] Amiryaghoubi, N.; Fathi, M.; Pesyan, N. N.; Samiei, M.; Barar, J.; Omid, Y. Bioactive Polymeric Scaffolds for Osteogenic Repair and Bone Regenerative Medicine. *Med Res Rev*, **2020**, *40* (5), 1833–1870. <https://doi.org/10.1002/med.21672>.
- [5] Dec, P.; Modrzejewski, A.; Pawlik, A. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*, **2022**, *24* (1), 529. <https://doi.org/10.3390/ijms24010529>.
- [6] Caplan, A. I.; Correa, D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell*, **2011**, *9* (1), 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.06.008>.
- [7] Fang, K.; Zhang, Y.; Yin, J.; Yang, T.; Li, K.; Wei, L.; Li, J.; He, W. Hydrogel Beads Based on Carboxymethyl Cassava Starch/Alginate Enriched with MgFe₂O₄ Nanoparticles for Controlling Drug Release. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2022**, *220*, 573–588. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.081>.

- [8] Lima, I. S. de; Silva, A. S.; Nascimento, A. M. S. S.; de Oliveira, L. H.; Morais, A. Í. S.; Barreto, H. M.; Peña-Garcia, R.; Cuevas, M. D. M. O.; Argôlo Neto, N. M.; Osajima, J. A.; et al. Synthesis and Characterization of Cassava Gum Hydrogel Associated with Chlorhexidine and Evaluation of Release and Antimicrobial Activity. *Macromol Biosci*, **2024**, *24* (6), e2300507. <https://doi.org/10.1002/mabi.202300507>.
- [9] Chen, Y. *Hydrogels Based on Natural Polymers*; Elsevier, 2019.
- [10] Mani, R.; Natesan, V. Chrysin: Sources, Beneficial Pharmacological Activities, and Molecular Mechanism of Action. *Phytochemistry*, **2018**, *145*, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>.
- [11] Cao, L.; Wang, J.; Zhang, Y.; Tian, F.; Wang, C. Osteoprotective Effects of Flavonoids: Evidence from *in Vivo* and *in Vitro* Studies (Review). *Molecular Medicine Reports*, **2022**, *25* (6), 1–9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12716>.
- [12] Li, Y.; Wang, X. Chrysin Attenuates High Glucose-Induced BMSC Dysfunction via the Activation of the PI3K/AKT/Nrf2 Signaling Pathway. *Drug Des Devel Ther*, **2022**, *16*, 165–182. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S335024>.
- [13] Zhang, S.; Sadhasivam, D. R.; Soundarajan, S.; Shanmugavel, P.; Raji, A.; Xu, M. In Vitro and in Vivo Investigation of Chrysin Chelated Copper Complex as Biocompatible Materials for Bone Tissue Engineering Applications. *3 Biotech*, **2023**, *13* (2), 45. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03449-z>.
- [14] de Experimentação Animal, C. C. Resolução Normativa N° 37, de 15 de Fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz Da Prática de Eutanásia Do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. *Diário Oficial da União*, **2018**, *1*, 5.
- [15] Argôlo Neto, N. M.; Feitosa, M. L. T.; Sousa, S. S.; Fernandes, P. B.; Pessoa, G. T.; Bezerra, D. de O.; Almeida, H. M. de; Carvalho, Y. K. P. de; Rocha, A. R. da; Silva, L. M. C.; et al. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Scientiae Veterinariae*, **2016**, *44*, 01–11.
- [16] Ray, A.; Dittel, B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J Vis Exp*, **2010**, No. 35, 1488. <https://doi.org/10.3791/1488>.
- [17] Standardization, I. O. for. *ISO 10993-1:2018, Fifth Edition: Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*; Multiple. Distributed through American National Standards Institute, 2018.
- [18] Sæbø, I. P.; Bjørås, M.; Franzyk, H.; Helgesen, E.; Booth, J. A. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *Int J Mol Sci*, **2023**, *24* (3), 2914. <https://doi.org/10.3390/ijms24032914>.
- [19] Ng, W.-C.; Lokanathan, Y.; Fauzi, M. B.; Baki, M. M.; Zainuddin, A. A.; Phang, S. J.; Azman, M. In Vitro Evaluation of Genipin-Crosslinked Gelatin Hydrogels for Vocal Fold Injection. *Sci Rep*, **2023**, *13* (1), 5128. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32080-y>.
- [20] Carvalho, C. E. S. de; Reis, F. da S.; Silva, E. R. D. de F. S.; Bezerra, D. de O.; Pacheco, I. K. C.; Fialho, A. C. V.; Matos, J. M. E. de; Melo, W. G. G. de; Leite, Y. K. P. de C.; Argôlo

Neto, N. M.; et al. Characterization of Brazilian Buriti Oil Biomaterial: The Influence on the Physical, Chemical Properties and Behaviour of Goat Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Anim. Reprod.*, **2023**, *20*, e20230071. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0071>.

[21] Luo, S.; Xiao, X.; Luo, W.; Zhang, X.; Zhang, J.; Tang, S. Investigating the Molecular Mechanism of Qianghuo Shengshi Decoction in the Treatment of Ankylosing Spondylitis Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Analysis. *Processes*, **2022**, *10* (8), 1487. <https://doi.org/10.3390/pr10081487>.

[22] Fan, J.; Zhou, J.; Qu, Z.; Peng, H.; Meng, S.; Peng, Y.; Liu, T.; Luo, Q.; Dai, L. Network Pharmacology and Molecular Docking Elucidate the Pharmacological Mechanism of the OSTEOWONDER Capsule for Treating Osteoporosis. *Front Genet*, **2022**, *13*, 833027. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.833027>.

[23] Paggi, J. M.; Pandit, A.; Dror, R. O. The Art and Science of Molecular Docking. *Annual Review of Biochemistry*, **2024**, *93* (Volume 93, 2024), 389–410. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030222-120000>.

[24] Fu, L.; Shi, S.; Yi, J.; Wang, N.; He, Y.; Wu, Z.; Peng, J.; Deng, Y.; Wang, W.; Wu, C. ADMETlab 3.0: An Updated Comprehensive Online ADMET Prediction Platform Enhanced with Broader Coverage, Improved Performance, API Functionality and Decision Support. *Nucleic acids research*, **2024**, *52* (W1), W422–W431.

[25] Banerjee, P.; Eckert, A. O.; Schrey, A. K.; Preissner, R. ProTox-II: A Webserver for the Prediction of Toxicity of Chemicals. *Nucleic acids research*, **2018**, *46* (W1), W257–W263.

[26] Alvarez Echazú, M. I.; Perna, O.; Olivetti, C. E.; Antezana, P. E.; Municoy, S.; Tuttolomondo, M. V.; Galdopórpora, J. M.; Alvarez, G. S.; Olmedo, D. G.; Desimone, M. F. Recent Advances in Synthetic and Natural Biomaterials-Based Therapy for Bone Defects. *Macromolecular Bioscience*, **2022**, *22* (4), 2100383. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100383>.

[27] Bačáková, L.; Novotná, K.; Pařízek, M. Polysaccharides as Cell Carriers for Tissue Engineering: The Use of Cellulose in Vascular Wall Reconstruction. *Physiol Res*, **2014**, *63* (Suppl 1), S29-47. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932644>.

[28] Berradi, A.; Aziz, F.; El Achaby, M.; Ouazzani, N.; Mandi, L. A Comprehensive Review of Polysaccharide-Based Hydrogels as Promising Biomaterials. *Polymers*, **2023**, *15*. <https://doi.org/10.3390/polym15132908>.

[29] Ibrahim, S. O.; Mada, S. B.; Abarshi, M. M.; Tanko, M. S.; Babangida, S. Chrysin Alleviates Alteration of Bone-Remodeling Markers in Ovariectomized Rats and Exhibits Estrogen-like Activity in Silico. *Hum Exp Toxicol*, **2021**, *40* (12_suppl), S125–S136. <https://doi.org/10.1177/09603271211033777>.

[30] Kaparekar, P. S.; Poddar, N.; Anandasadagopan, S. K. Fabrication and Characterization of Chrysin - A Plant Polyphenol Loaded Alginate -Chitosan Composite for Wound Healing Application. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2021**, *206*, 111922. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111922>.

[31] Popov, V. L.; Poliakov, A. M.; Pakhaliuk, V. I. In Silico Evaluation of the Mechanical Stimulation Effect on the Regenerative Rehabilitation for the Articular Cartilage Local Defects. *Front Med (Lausanne)*, **2023**, *10*, 1134786. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1134786>.

- [32] Lafuente-Gracia, L.; Borgiani, E.; Nasello, G.; Geris, L. Towards in Silico Models of the Inflammatory Response in Bone Fracture Healing. *Front Bioeng Biotechnol*, **2021**, *9*, 703725. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.703725>.
- [33] Kamimoto, K.; Stringa, B.; Hoffmann, C. M.; Jindal, K.; Solnica-Krezel, L.; Morris, S. A. Dissecting Cell Identity via Network Inference and in Silico Gene Perturbation. *Nature*, **2023**, *614* (7949), 742–751. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05688-9>.
- [34] Trejo, I.; Kojouharov, H.; Chen-Charpentier, B. Modeling the Macrophage-Mediated Inflammation Involved in the Bone Fracture Healing Process. *Mathematical and Computational Applications*, **2019**, *24* (1), 12. <https://doi.org/10.3390/mca24010012>.
- [35] Borgiani, E.; Duda, G. N.; Checa, S. Multiscale Modeling of Bone Healing: Toward a Systems Biology Approach. *Front. Physiol.*, **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00287>.
- [36] Ghiasi, M. S.; Chen, J.; Vaziri, A.; Rodriguez, E. K.; Nazarian, A. Bone Fracture Healing in Mechanobiological Modeling: A Review of Principles and Methods. *Bone Reports*, **2017**, *6*, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.03.002>.
- [37] Lotfi, M.-S.; Jamali, H.; B Rassouli, F. Network Pharmacology and in Silico Study of Quercetin and Structurally Similar Flavonoids as Osteogenesis Inducers That Interact with Oestrogen Receptors. *Arch Physiol Biochem*, **2025**, 1–12. <https://doi.org/10.1080/13813455.2025.2483910>.
- [38] Zhang, Y.; Wang, L.; Shi, Y.; Cheng, D.; Zhu, D.; Mi, Z.; Dang, J.; Zhang, Z.; Liu, X.; Fan, H. Using Network Pharmacology to Fabricate Crosslinked Hyaluronan-Chondroitin Sulphate-Resveratrol Composite Hydrogels for Cartilage Regeneration. *Biomed. Mater.*, **2023**, *18* (5). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aceac7>.
- [39] Wang, H.; He, X.-Q.; Jin, T.; Li, Y.; Fan, X.-Y.; Wang, Y.; Xu, Y.-Q. Wnt11 Plays an Important Role in the Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in a PHA/FN/ALG Composite Scaffold: Possible Treatment for Infected Bone Defect. *Stem Cell Res Ther*, **2016**, *7*, 18. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0277-4>.
- [40] Wang, C.; Xu, W.; An, J.; Liang, M.; Li, Y.; Zhang, F.; Tong, Q.; Huang, K. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Vascular Calcification by Upregulating Runx2. *Nat Commun*, **2019**, *10* (1), 1203. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09174-1>.
- [41] Stechschulte, L. A.; Czernik, P. J.; Rotter, Z. C.; Tausif, F. N.; Corzo, C. A.; Marciano, D. P.; Asteian, A.; Zheng, J.; Bruning, J. B.; Kamenecka, T. M.; et al. PPAR γ Post-Translational Modifications Regulate Bone Formation and Bone Resorption. *eBioMedicine*, **2016**, *10*, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.040>.
- [42] Burkhardt, L.-M.; Bucher, C. H.; Löffler, J.; Rinne, C.; Duda, G. N.; Geissler, S.; Schulz, T. J.; Schmidt-Bleek, K. The Benefits of Adipocyte Metabolism in Bone Health and Regeneration. *Front Cell Dev Biol*, **2023**, *11*, 1104709. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1104709>.
- [43] Ho, S. T. B.; Tanavde, V. M.; Hui, J. H.; Lee, E. H. Upregulation of Adipogenesis and Chondrogenesis in MSC Serum-Free Culture. *Cell Med*, **2011**, *2* (1), 27–41. <https://doi.org/10.3727/215517911X575984>.

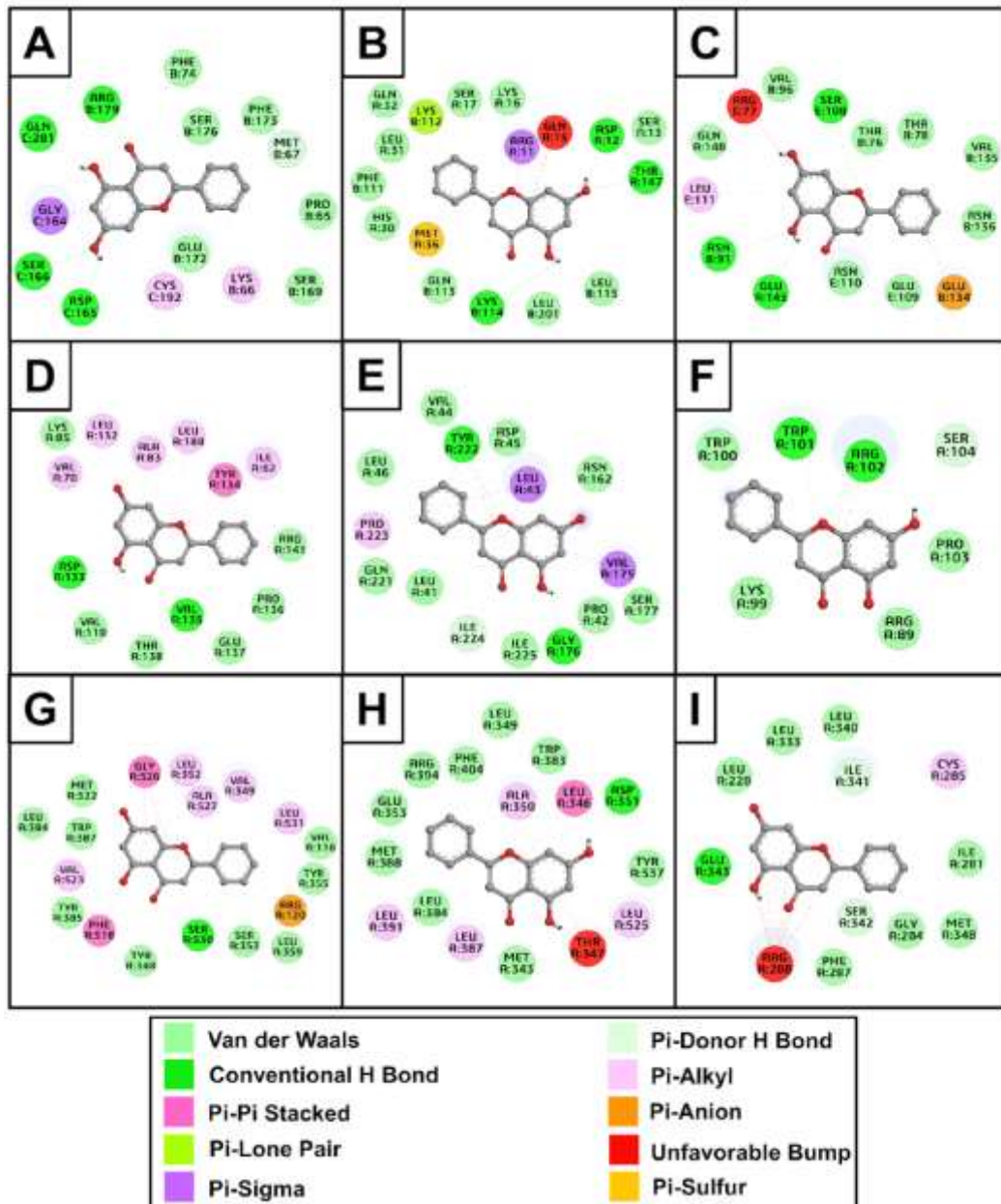
- [44] Baroi, S.; Czernik, P. J.; Chougule, A.; Griffin, P. R.; Lecka-Czernik, B. PPARG in Osteocytes Controls Sclerostin Expression, Bone Mass, Marrow Adiposity and Mediates TZD-Induced Bone Loss. *Bone*, **2021**, *147*, 115913. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115913>.
- [45] Zeinali, M.; Rezaee, S. A.; Hosseinzadeh, H. An Overview on Immunoregulatory and Anti-Inflammatory Properties of Chrysin and Flavonoids Substances. *Biomed Pharmacother*, **2017**, *92*, 998–1009. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.003>.
- [46] Marini, F.; Giusti, F.; Palmi, G.; Brandi, M. L. Role of Wnt Signaling and Sclerostin in Bone and as Therapeutic Targets in Skeletal Disorders. *Osteoporos Int*, **2023**, *34* (2), 213–238. <https://doi.org/10.1007/s00198-022-06523-7>.
- [47] Ma, C.; Kim, Y.-K.; Lee, M.-H.; Jang, Y.-S. Development of Gelatin Methacryloyl/Sodium Alginate Interpenetrating Polymer Network Hydrogels for Bone Regeneration by Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway via Lithium Release. *Int J Mol Sci*, **2023**, *24* (17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713613>.
- [48] Saghati, S.; Avci, Ç. B.; Hassani, A.; Nazifkerdar, S.; Amini, H.; Saghebasl, S.; Mahdipour, M.; Banimohamad-Shotorbani, B.; Namjoo, A. R.; Abrbekoh, F. N.; et al. Phenolated Alginate Hydrogel Induced Osteogenic Properties of Mesenchymal Stem Cells via Wnt Signaling Pathway. *Int J Biol Macromol*, **2023**, *253* (Pt 5), 127209. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127209>.
- [49] Pelusi, L.; Mandatori, D.; Di Pietrantonio, N.; Del Pizzo, F.; Di Tomo, P.; Di Pietro, N.; Buda, R.; Genovese, S.; Epifano, F.; Pandolfi, A.; et al. Estrogen Receptor 1 (ESR1) and the Wnt/ β -Catenin Pathway Mediate the Effect of the Coumarin Derivative Umbelliferon on Bone Mineralization. *Nutrients*, **2022**, *14* (15), 3209. <https://doi.org/10.3390/nu14153209>.
- [50] Jamshidi, P.; Chouhan, G.; Williams, R. L.; Cox, S. C.; Grover, L. M. Modification of Gellan Gum with Nanocrystalline Hydroxyapatite Facilitates Cell Expansion and Spontaneous Osteogenesis. *Biotechnol Bioeng*, **2016**, *113* (7), 1568–1576. <https://doi.org/10.1002/bit.25915>.
- [51] Beheshtizadeh, N.; Asgari, Y.; Nasiri, N.; Farzin, A.; Ghorbani, M.; Lotfibakhshaiesh, N.; Azami, M. A Network Analysis of Angiogenesis/Osteogenesis-Related Growth Factors in Bone Tissue Engineering Based on in-Vitro and in-Vivo Data: A Systems Biology Approach. *Tissue Cell*, **2021**, *72*, 101553. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101553>.
- [52] Wu, J.-Q.; Mao, L.-B.; Liu, L.-F.; Li, Y.-M.; Wu, J.; Yao, J.; Zhang, F.-H.; Liu, T.-Y.; Yuan, L. Identification of Key Genes and Pathways of BMP-9-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells by Integrated Bioinformatics Analysis. *J Orthop Surg Res*, **2021**, *16* (1), 273. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02390-w>.
- [53] Zhao, H.; Tu, X. The Potential Key Genes within Focal Adhesion That Regulate Mesenchymal Stem Cells Osteogenesis or Adipogenesis in Microgravity Related Disuse Osteoporosis: An Integrated Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **2025**, *16*, 1469400. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1469400>.
- [54] Duda, G. N.; Geissler, S.; Checa, S.; Tsitsilonis, S.; Petersen, A.; Schmidt-Bleek, K. The Decisive Early Phase of Bone Regeneration. *Nat Rev Rheumatol*, **2023**, *19* (2), 78–95. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00887-0>.

- [55] Parveen, R.; Wadhwa, S.; Babu, M.; Vishwas, S.; Corrie, L.; Awasthi, A.; Khan, F.; Al-Bazi, M.; Alharthi, N.; Al-Otaibi, F.; et al. Formulation of Chrysin Loaded Nanostructured Lipid Carriers Using Box Behnken Design, Its Characterization and Antibacterial Evaluation Alone and in Presence of Probiotics Co-Loaded in Gel. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **2023**, *84*, 104411. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104411>.
- [56] Tohamy, H.-A. S. Cellulosic Schiff Base Hydrogel Biosensor for Bacterial Detection with pH/Thermo-Responsivity: DFT Calculations and Molecular Docking. *Int J Biol Macromol*, **2024**, *283* (Pt 1), 137389. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137389>.
- [57] Carrascal-Hernandez, D. C.; Mendez-Lopez, M.; Insuasty, D.; García-Freites, S.; Sanjuan, M.; Márquez, E. Molecular Recognition between Carbon Dioxide and Biodegradable Hydrogel Models: A Density Functional Theory (DFT) Investigation. *Gels*, **2024**, *10* (6), 386. <https://doi.org/10.3390/gels10060386>.
- [58] Montenegro, E. D.; Nunes, J. M.; Ramos, I. F. S.; Almeida, R. G.; da Silva Júnior, E. N.; Rizzo, M. S.; da Silva-Filho, E. C.; Ribeiro, A. B.; Silva, H. S.; Costa, M. P. Characterization of the Interaction of a Novel Anticancer Molecule with PMMA, PCL, and PLGA Polymers via Computational Chemistry. *Applied Sciences*, **2025**, *15* (1), 468. <https://doi.org/10.3390/app15010468>.
- [59] Wagar, L. E.; DiFazio, R. M.; Davis, M. M. Advanced Model Systems and Tools for Basic and Translational Human Immunology. *Genome Med*, **2018**, *10* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0584-8>.
- [60] Papantoniou, I.; Nilsson Hall, G.; Loverdou, N.; Lesage, R.; Herpelinck, T.; Mendes, L.; Geris, L. Turning Nature's Own Processes into Design Strategies for Living Bone Implant Biomanufacturing: A Decade of Developmental Engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, **2021**, *169*, 22–39. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.11.012>.
- [61] Blanes-Mira, C.; Fernández-Aguado, P.; de Andrés-López, J.; Fernández-Carvajal, A.; Ferrer-Montiel, A.; Fernández-Ballester, G. Comprehensive Survey of Consensus Docking for High-Throughput Virtual Screening. *Molecules*, **2022**, *28* (1), 175. <https://doi.org/10.3390/molecules28010175>.
- [62] Owen, R.; Reilly, G. C. In Vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders. *Front Bioeng Biotechnol*, **2018**, *6*, 134. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00134>.
- [63] Ramos-Infante, S. J.; Pérez, M. A. In Vitro and in Silico Characterization of Open-Cell Structures of Trabecular Bone. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, **2017**, *20* (14), 1562–1570. <https://doi.org/10.1080/10255842.2017.1390086>.
- [64] Atef, A. K.; Mostafa, T. B.; El-Sherif, H. M. Hemocompatible Gelatin-Glycidyl Methacrylate/Graphene Oxide Composite Hydrogels for Vascular Catheter Applications. *Sci Rep*, **2025**, *15* (1), 10224. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93040-2>.
- [65] Sun, J.; Wu, X.; Zhang, X.; Sun, A.; Ye, W.; Liu, J.; Liu, S.; Zhang, C.; Wang, L.; Li, H.; et al. Fabrication of Functionalized Chitosan Hydrogels Triggered by Charge Interactions and pH Response for Bacterial Capture and Killing. *Colloid and Interface Science Communications*, **2022**, *50*, 100666. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2022.100666>.

- [66] Wu, H.; Zhang, X.; Wang, Z.; Chen, X.; Li, Y.; Fang, J.; Zheng, S.; Zhang, L.; Li, C.; Hao, L. Preparation, Properties and in Vitro Osteogenesis of Self-Reinforcing Injectable Hydrogel. *Eur J Pharm Sci*, **2024**, *192*, 106617. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106617>.
- [67] Canciani, B.; Semeraro, F.; Herrera Millar, V. R.; Gervaso, F.; Polini, A.; Stanzione, A.; Peretti, G. M.; Di Giancamillo, A.; Mangiavini, L. In Vitro and In Vivo Biocompatibility Assessment of a Thermosensitive Injectable Chitosan-Based Hydrogel for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*, **2023**, *24* (13). <https://doi.org/10.3390/ijms241310446>.
- [68] Durairaj, K.; Balasubramanian, B.; Arumugam, V. A.; Easwaran, M.; Park, S.; Issara, U.; Pushparaj, K.; Al-Dhabi, N. A.; Arasu, M. V.; Liu, W.-C.; et al. Biocompatibility of Veratric Acid-Encapsulated Chitosan/Methylcellulose Hydrogel: Biological Characterization, Osteogenic Efficiency with In Silico Molecular Modeling. *Appl Biochem Biotechnol*, **2023**, *195* (7), 4429–4446. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04311-5>.
- [69] Salthouse, D.; Novakovic, K.; Hilkens, C. M. U.; Ferreira, A. M. Interplay between Biomaterials and the Immune System: Challenges and Opportunities in Regenerative Medicine. *Acta Biomaterialia*, **2023**, *155*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.11.003>.
- [70] Tripathi, A. S.; Zaki, M. E. A.; Al-Hussain, S. A.; Dubey, B. K.; Singh, P.; Rind, L.; Yadav, R. K. Material Matters: Exploring the Interplay between Natural Biomaterials and Host Immune System. *Front. Immunol.*, **2023**, *14*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1269960>.
- [71] Kim, H.-K.; Kim, Y.-T.; Cho, Y.-H.; Roh, H.-W.; Kim, M.-A.; Kim, S.-Y.; Huh, K.-M.; Park, J.-S. Cytotoxicity Evaluation on Hydrogels for Medical Devices Based on the International Organization for Standardization. *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences*, **2009**, *39*, 127–131. <https://doi.org/10.4333/KPS.2009.39.2.127>.
- [72] Broda, M.; Yelle, D. J.; Serwańska-Leja, K. Biodegradable Polymers in Veterinary Medicine—A Review. *Molecules*, **2024**, *29* (4), 883. <https://doi.org/10.3390/molecules29040883>.

Material suplementar

Figura S1. Resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações entre a crisina e os alvos osteoimunológicos, conforme identificado pelas simulações de acoplamento molecular (docking). A – Complexo IL-6/IL-6R e Crisina; B - Complexo IL-1 β /IL-1RA e Crisina; C - Complexo TNF- α /TNFR1 e Crisina; D - Complexo GSK-3 β e Crisina; E - Complexo Nogguin e Crisina; F - Complexo Sclerotina e Crisina, G: Complexo ácido meclufenâmico e COX-2, H: Complexo GW5638 e receptor de estrogênio, I: Complexo Amorfrutin 1 e PPAR- γ .



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A presente pesquisa, ao investigar a funcionalização do hidrogel de goma de mandioca, um recurso natural de vasta ocorrência e relevância socioeconômica para o Piauí, com o flavonoide crisina, transcende seus objetivos técnicos imediatos, projetando significativos impactos científicos e econômicos para a região. Cientificamente, este trabalho contribui para a consolidação de linhas de pesquisa em biotecnologia e engenharia de tecidos no estado, capacitando recursos humanos em metodologias avançadas *in silico* e fomentando o uso de matérias-primas locais em aplicações biomédicas de alto valor agregado. Economicamente, a valorização da cadeia produtiva da mandioca através de sua aplicação em biomateriais inovadores para reparo ósseo tem o potencial de diversificar a economia local, estimular o surgimento de novas indústrias de base tecnológica e, a longo prazo, oferecer alternativas terapêuticas mais acessíveis, fortalecendo a autonomia regional no setor de saúde e promovendo o desenvolvimento sustentável do Piauí.

Fundamentando este potencial de impacto, os resultados técnicos do presente estudo foram notáveis: experimentalmente, demonstrou-se a biocompatibilidade da matriz de HGM pura, atestando sua segurança para aplicações biológicas. Concomitantemente, as investigações *in silico* predisseram um robusto potencial osteoimunomodulador para a crisina, sua favorável interação e estabilidade termodinâmica ao ser incorporada ao HGM, e um perfil ADMET promissor. Em conjunto, estes achados fornecem uma caracterização fundamental do HGM como plataforma viável e da crisina como agente bioativo com múltiplas frentes de atuação, contribuindo para o avanço no desenho racional de novos biomateriais para o reparo ósseo ao estabelecer as bases científicas e preditivas para a formulação HGM-Cr.

Não obstante o estabelecimento dessas bases científicas e preditivas, a validação experimental direta da formulação incorporada (HGM-Cr) representa uma limitação do escopo atual do estudo, direcionando os próximos passos da investigação. Os achados de biocompatibilidade da matriz base e as predições robustas *in silico* para a crisina e sua interação com o HGM estabelecem, contudo, uma base sólida para a continuidade da pesquisa. Este trabalho, portanto, cumpriu seu objetivo de fornecer a justificativa e o direcionamento para estudos futuros, que deverão validar experimentalmente o potencial osteoindutor e imunomodulador da crisina incorporada ao HGM e caracterizar o sistema de liberação. A dissertação avança, assim, na construção de um modelo conceitual para o desenvolvimento de biomateriais biointerativos de baixo custo e alto impacto potencial na medicina regenerativa.

5. REFERÊNCIAS:

- ABBASALIZADEH, Farhad *et al.* Anticancer Effect of Alginate-chitosan Hydrogel Loaded with Curcumin and Chrysin on Lung and Breast Cancer Cell Lines. **Current Drug Delivery**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 600–613, 2022.
- ABREU, Francisco Carlos Eduardo Sá de; CARVALHO, Francisco Prancacio Araújo de; FILHO, João Soares da Silva. Estrutura da Economia Apícola no Piauí a Partir da Análise Espacial da Produção de Mel / Structure of the Apicultural Economy in Piauí Based on Spatial Analysis of Honey Production. **Revista FSA (Centro Universitário Santo Agostinho)**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 109–135, 2024.
- ALIPOUR, Mahdieh *et al.* The Antimicrobial, Antioxidative, and Anti-Inflammatory Effects of Polycaprolactone/Gelatin Scaffolds Containing Chrysin for Regenerative Endodontic Purposes. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2021, p. 3828777, 2021.
- ALVAREZ ECHAZÚ, María I. *et al.* Recent Advances in Synthetic and Natural Biomaterials-Based Therapy for Bone Defects. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 2100383, 2022.
- AMELEWORK, Assefa B.; BAIRU, Michael W. Advances in Genetic Analysis and Breeding of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): A Review. **Plants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1617, 2022.
- AMIRYAGHOUBI, Nazanin *et al.* Bioactive polymeric scaffolds for osteogenic repair and bone regenerative medicine. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1833–1870, 2020.
- ARGÔLO NETO, Napoleão Martins *et al.* Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 44, p. 01–11, 2016.
- BAHNEY, Chelsea S. *et al.* Cellular biology of fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 35–50, 2019.
- BEEDERMAN, Maureen *et al.* BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. **Journal of biomedical science and engineering**, [s. l.], v. 6, n. 8A, p. 32–52, 2013.
- BLAIR, Harry C. *et al.* Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 268–280, 2017.
- CABRERA-PÉREZ, Raquel *et al.* Osteogenic commitment of Wharton’s jelly mesenchymal stromal cells: mechanisms and implications for bioprocess development and clinical application. **Stem Cell Research & Therapy**, [s. l.], v. 10, p. 356, 2019.
- CAI, Hantao *et al.* BMP2 induces hMSC osteogenesis and matrix remodeling. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 125, 2021.

- CAO, Lili *et al.* Osteoprotective effects of flavonoids: Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies (Review). **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1–9, 2022.
- CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 2017.
- CARDOSO, Francisca L. A. *et al.* Cytotoxicity and genotoxic impacts of LAPONITE® on murine adipose stem cells. **Applied Clay Science**, [s. l.], v. 261, p. 107572, 2024.
- CHEN, Q *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1128–1139, 2016.
- CHEN, Yu. **Hydrogels Based on Natural Polymers**. [S. l.]: Elsevier, 2019.
- CHEN, Zhijie *et al.* Vascularized polypeptide hydrogel modulates macrophage polarization for wound healing. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 155, p. 218–234, 2023.
- CHYZY, Adam; PLONSKA-BRZEZINSKA, Marta E. Hydrogel Properties and Their Impact on Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 5795, 2020.
- COMPART, Julia *et al.* Customizing Starch Properties: A Review of Starch Modifications and Their Applications. **Polymers**, [s. l.], v. 15, n. 16, p. 3491, 2023.
- DAS, Sanjoy *et al.* Advances of cassava starch-based composites in novel and conventional drug delivery systems: a state-of-the-art review. **RSC Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 182–203, 2024.
- DEC, Paweł; MODRZEJEWSKI, Andrzej; PAWLIK, Andrzej. Existing and Novel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 529, 2022.
- DELGADO-CALLE, Jesus; SATO, Amy Y.; BELLIDO, Teresita. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. **Bone**, [s. l.], v. 96, p. 29–37, 2017.
- DING, Zhenjiang *et al.* FOXO1 expression in chondrocytes modulates cartilage production and removal in fracture healing. **Bone**, [s. l.], v. 148, p. 115905, 2021.
- DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DUDA, Georg N. *et al.* The decisive early phase of bone regeneration. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 78–95, 2023.
- EL HALAL, Shanise L. M. *et al.* The properties of potato and cassava starch films combined with cellulose fibers and/or nanoclay. **Starch - Stärke**, [s. l.], v. 70, n. 1–2, p. 1700115, 2018.
- ELHAWARY, Hassan *et al.* Bone Healing and Inflammation: Principles of Fracture and Repair. **Seminars in Plastic Surgery**, [s. l.], v. 35, p. 198–203, 2021.

FANG, Kun *et al.* Hydrogel beads based on carboxymethyl cassava starch/alginate enriched with MgFe₂O₄ nanoparticles for controlling drug release. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 220, p. 573–588, 2022.

FESTAS, AJ; RAMOS, A; DAVIM, JP. Medical devices biomaterials – A review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications**, [s. l.], v. 234, n. 1, p. 218–228, 2020.

GHODADRA, Neil; SINGH, Kern. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures. **Biologics : targets & therapy**, [s. l.], v. 2, p. 345–54, 2008.

HALLING LINDER, Cecilia; ENANDER, Karin; MAGNUSSON, Per. Glycation Contributes to Interaction Between Human Bone Alkaline Phosphatase and Collagen Type I. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 284–293, 2016.

HARMAN, Rebecca M.; MARX, Charlotte; VAN DE WALLE, Gerlinde R. Translational Animal Models Provide Insight Into Mesenchymal Stromal Cell (MSC) Secretome Therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, p. 654885, 2021.

HART, Nicolas H. *et al.* Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 347–371, 2020.

HO, Tzu-Chuan *et al.* Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 2902, 2022.

HOUSCHYAR, Khosrow S. *et al.* Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 6, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2018.00170/full>. Acesso em: 5 out. 2024.

IBRAHIM, Sadiyat O *et al.* Chrysin alleviates alteration of bone-remodeling markers in ovariectomized rats and exhibits estrogen-like activity in silico. **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 40, n. 12_suppl, p. S125–S136, 2021.

Ji, Xiongfafa *et al.* Mesenchymal stem cell-loaded thermosensitive hydroxypropyl chitin hydrogel combined with a three-dimensional-printed poly(ϵ -caprolactone) /nano-hydroxyapatite scaffold to repair bone defects via osteogenesis, angiogenesis and immunomodulation. **Theranostics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 725–740, 2020.

JIA, Yongsheng *et al.* Co-cultivation of progenitor cells enhanced osteogenic gene expression and angiogenesis potential in vitro. **The Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 03000605211004024, 2021.

JIANG, Will *et al.* Unique Spatial Transcriptomic Profiling of the Murine Femoral Fracture Callus: A Preliminary Report. **Cells**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 522, 2024.

JUNIOR, Ferreira; HENRIQUE, Luiz. Efeito de Diferentes Terapias no Reparo e na Microestrutura do Tecido Ósseo. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/31247>. Acesso em: 7 out. 2024.

- KHATTAB, Hany Mohamed *et al.* The BMP-2 mutant L51P: a BMP receptor IA binding-deficient inhibitor of noggin. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 199–205, 2019.
- LEE, Yu-Chieh *et al.* Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 20, p. 5015, 2019.
- LEE, Jinkyu *et al.* Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e1801106, 2019a.
- LEE, Jinkyu *et al.* Current Advances in Immunomodulatory Biomaterials for Bone Regeneration. **Advanced Healthcare Materials**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. e1801106, 2019b.
- LI, Qi *et al.* 3D Printing of Microenvironment-Specific Bioinspired and Exosome-Reinforced Hydrogel Scaffolds for Efficient Cartilage and Subchondral Bone Regeneration. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)**, [s. l.], v. 10, n. 26, p. e2303650, 2023.
- LI, Xiaorong *et al.* Enhancing bone regeneration and immunomodulation via gelatin methacryloyl hydrogel-encapsulated exosomes from osteogenic pre-differentiated mesenchymal stem cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 672, p. 179–199, 2024.
- LI, Yu; WANG, Ximei. Chrysin Attenuates High Glucose-Induced BMSC Dysfunction via the Activation of the PI3K/AKT/Nrf2 Signaling Pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. 16, p. 165–182, 2022.
- LIMA, Fabianne *et al.* Chitosan-based hydrogel for treatment of temporomandibular joint arthritis. **Polímeros**, [s. l.], v. 31, p. e2021019, 2021.
- LIMA, Idglan Sá de *et al.* Synthesis and Characterization of Cassava Gum Hydrogel Associated with Chlorhexidine and Evaluation of Release and Antimicrobial Activity. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. e2300507, 2024a.
- LIMA, Idglan Sá de *et al.* Synthesis and Characterization of Cassava Gum Hydrogel Associated with Chlorhexidine and Evaluation of Release and Antimicrobial Activity. **Macromolecular Bioscience**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. e2300507, 2024b.
- LIU, Kang *et al.* Research progress on polysaccharide/protein hydrogels: Preparation method, functional property and application as delivery systems for bioactive ingredients. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, [s. l.], v. 147, p. 110542, 2021.
- LU, Haiping *et al.* Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 334, 2016.
- MANI, Renuka; NATESAN, Vijayakumar. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 145, p. 187–196, 2018.
- MARINI, Francesca *et al.* Role of Wnt signaling and sclerostin in bone and as therapeutic targets in skeletal disorders. **Osteoporosis International**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 213–238, 2023.

MARTINIAKOVA, Monika *et al.* Current knowledge of bone-derived factor osteocalcin: its role in the management and treatment of diabetes mellitus, osteoporosis, osteopetrosis and inflammatory joint diseases. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 435–452, 2024.

MARTINS, Inês L. *et al.* Selenium-Containing Chrysin and Quercetin Derivatives: Attractive Scaffolds for Cancer Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 4250–4265, 2015.

MARUYAMA, Masahiro *et al.* Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2020.00386/full>. Acesso em: 7 out. 2024.

MELO, Wanderson Gabriel Gomes de *et al.* Behavioral dynamics of medicinal signaling cells from porcine bone marrow in long-term culture. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/full/10.1139/cjpp-2023-0458>. Acesso em: 5 out. 2024.

MENON, A. Haritha *et al.* Sustained release of chrysin from chitosan-based scaffolds promotes mesenchymal stem cell proliferation and osteoblast differentiation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 195, p. 356–367, 2018.

MOHANTY, Shambo *et al.* Exploring the potential of polysaccharide-based hybrid hydrogel systems for their biomedical and therapeutic applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 256, p. 128348, 2024.

MURSHED, Monzur. Mechanism of Bone Mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. a031229, 2018.

NEUPATIMAGEM-UNICAMP. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/biossifmembranosa.html>. Acesso em: 10 nov. 2024.

OFITERU, Augustin M. *et al.* Qualifying Osteogenic Potency Assay Metrics for Human Multipotent Stromal Cells: TGF- β 2 a Telling Eligible Biomarker. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2559, 2020.

ORŠOLIĆ, Nada *et al.* Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Chrysin and Naringenin in a Drug-Induced Bone Loss Model in Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 2872, 2022.

PEPPAS, Nicholas A.; HOFFMAN, Allan S. 1.3.2E - Hydrogels. *In*: WAGNER, William R. *et al.* (org.). **Biomaterials Science (Fourth Edition)**. [S. l.]: Academic Press, 2020. p. 153–166. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128161371000143>. Acesso em: 5 out. 2024.

PERIĆ KAČAREVIĆ, Željka *et al.* An introduction to bone tissue engineering. **The International Journal of Artificial Organs**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 69–86, 2020.

PUBCHEM. **Chrysin**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281607>. Acesso em: 5 out. 2024.

RENESME, Laurent *et al.* Definition and Characteristics of Mesenchymal Stromal Cells in Preclinical and Clinical Studies: A Scoping Review. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 44–54, 2022.

SAHARAN, Renu *et al.* Hydrogel-based Drug Delivery System in Diabetes Management. **Pharmaceutical Nanotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 289–299, 2024.

SALATINO, Antonio; SALATINO, Maria Luiza Faria; NEGRI, Giuseppina. How diverse is the chemistry and plant origin of Brazilian propolis?. **Apidologie**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1075–1097, 2021.

SALHOTRA, Ankit *et al.* Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 696–711, 2020.

SAVEKAR, Pranav L. *et al.* Citric acid cross-linked pomegranate peel extract-loaded pH-responsive β -cyclodextrin/carboxymethyl tapioca starch hydrogel film for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 274, n. Pt 1, p. 133366, 2024.

SCHELL, H. *et al.* The haematoma and its role in bone healing. **Journal of Experimental Orthopaedics**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 5, 2017.

SEYYED NASROLLAH, S. A.; KARIMI-SOFLOU, R.; KARKHANEH, A. Photo-click crosslinked hydrogel containing MgO₂-loaded PLGA microsphere with concurrent magnesium and oxygen release for bone tissue engineering. **Materials Today Chemistry**, [s. l.], v. 28, p. 101389, 2023.

SHAIK, Rizwan; V PHANI KUMAR, Kanaparthi; PALANISWAMY, Sandeep. On the Experimental Investigation of Bone Fracture Recovery Process Using an Ultra-Wideband Planar Monopole Antenna. **International Journal of Antennas and Propagation**, [s. l.], v. 2023, 2023.

SONG, Na; SCHOLTEMEIJER, Martijn; SHAH, Khalid. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 653–664, 2020.

SU, Lu *et al.* Carbohydrate-Based Macromolecular Biomaterials. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 121, n. 18, p. 10950–11029, 2021.

TAN, S.H.S. *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies—a systematic review of preclinical studies. **Materials Today Bio**, [s. l.], v. 7, p. 100067, 2020.

TAO, Zhou-Shan; MA, Tao; YANG, Min. Cyclosporine a inhibits bone regeneration and induces bone loss in a rat model. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 132, p. 111951, 2024.

THÖNES, Stephan *et al.* Hyaluronan/collagen hydrogels containing sulfated hyaluronan improve wound healing by sustained release of heparin-binding EGF-like growth factor. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 86, p. 135–147, 2019.

VIZOSO, Francisco J. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

VYAS, Krishna S *et al.* Exosomes: The Latest in Regenerative Aesthetics. **Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 181–194, 2023.

WANG, Jiaming *et al.* Biomaterials for bone defect repair: Types, mechanisms and effects. **The International Journal of Artificial Organs**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 75–84, 2024.

WANG, Zhongqing *et al.* Global scientific trends on the immunomodulation of mesenchymal stem cells in the 21st century: A bibliometric and visualized analysis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. 984984, 2022.

WU, Zuoxing *et al.* Chrysin Protects Against Titanium Particle-Induced Osteolysis by Attenuating Osteoclast Formation and Function by Inhibiting NF- κ B and MAPK Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 13, p. 793087, 2022.

WUBNEH, Abiy *et al.* Current state of fabrication technologies and materials for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 80, p. 1–30, 2018.

ZHANG, Shikai *et al.* In vitro and in vivo investigation of chrysin chelated copper complex as biocompatible materials for bone tissue engineering applications. **3 Biotech**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 45, 2023.

ZHANG, Yuntong *et al.* Umbilical Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Encapsulated Hydrogels Accelerate Bone Repair by Enhancing Angiogenesis. **ACS applied materials & interfaces**, [s. l.], v. 13, n. 16, p. 18472–18487, 2021.

6. ANEXOS:

PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO

I. Artigos científicos publicados:

| TÍTULO | PERIÓDICO | ANO | JCR |
|---|---|------|-----|
| Heterojunction of titanate nanotubes enhanced by curcumin: Synthesis, characterization, and evaluation of hemolytic activity and cytotoxicity | Colloids and Surfaces A | 2025 | 4,9 |
| Aroeira (<i>Myracrodruon urundeuva</i>) and Malva (<i>Herissantia crispa</i>) have forage potential for ruminant nutrition in arid regions | Tropical Animal Health and Production | 2025 | 1,7 |
| In Situ Preparation of Composite Scaffolds Based on Polyurethane and Hydroxyapatite Particles for Bone Tissue Engineering | ACS Omega | 2025 | 3,7 |
| Butorphanol or a Combination of Ketamine and Xylazine Do Not Interfere with Arrhythmogenic Parameters in Agoutis (<i>Dasyprocta prymnolopha</i>) Obtained Through High-Resolution Electrocardiogram | Journal of Experimental Zoology Part A | 2025 | 1,9 |
| Impact of feeding native Caatinga pasture on the rumen histomorphometry of sheep raised in semi-extensive management | Anatomia Histologia Embryologia | 2024 | 0,8 |
| Kidney/Aorta Ratio for Renal Morphometric Determination in Swine Subjected to Acute Kidney Injury Using an Optimized Surgical Model | Comparative Medicine | 2024 | 1,3 |
| Behavioral dynamics of medicinal signaling cells from porcine bone marrow in long-term culture | Canadian Journal of Physiology and Pharmacology | 2024 | 1,7 |
| Cytotoxicity and Genotoxic Impacts of Laponite® on Murine Adipose Stem Cells | Applied Clay Science | 2024 | 5,3 |

| TÍTULO | PERIÓDICO | ANO | JCR |
|---|--|------------|------------|
| Stem cells derived from different tissues have similar morphology, proliferation, viability, plasticity, and mitotic potential | Brazilian Journal Veterinary Res. and Animal Science | 2024 | - |
| Effect of β -caryophyllene on Sperm Cryopreservation | Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida | 2024 | 1,8 |
| Cryogenic 3D Printing of GelMA/Graphene Bioinks: Improved Mechanical Strength and Structural Properties for Tissue Engineering | International Journal of Nanomedicine | 2024 | 6,6 |
| Characterization of Brazilian Buriti oil biomaterial: the influence on the physical, chemical properties and behaviour of Goat Wharton's jelly mesenchymal stem cells | Animal Reproduction | 2023 | 1,6 |

II. Outras produções acadêmicas:

| ATIVIDADE | EVENTO/LOCAL | ANO |
|--|---|------------|
| Workshop ministrado “COLETA, ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA” | 4º Congresso Internacional de Estudantes e Profissionais da Saúde – DELTA SAÚDE | 2024 |
| Palestra ministrada “Células-tronco mesenquimais: aplicações inovadoras na medicina veterinária” | II Jornada de Seminários Integrados de Morfofisiologia – UFPI/CPCE | 2024 |
| Apresentação de resumo “Biocompatibilidade do hidrogel de goma de mandioca com células sinalizadoras medicinais” | 7ª Escola Ricardo Rodrigues de Luz Síncrotron - CNPEM | 2024 |

III. Formação complementar:

| CURSO | ANO |
|---|------------|
| Iniciação em Ciência em Animais de Laboratório - FIOCRUZ | 2025 |
| Intermediate Python – DataCamp | 2025 |
| Python Programming – ANACONDA LEARNING | 2025 |
| Escola Ricardo Rodrigues de Luz Síncrotron – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais | 2024 |

IV. Demais produções técnicas:

| TIPO/TÍTULO | ANO |
|---|------------|
| Atuação como revisor de periódico – Nano Select | 2025 |
| Organizador geral do evento “1º Simpósio de Toxicologia Veterinária da Região Norte do Piauí” | 2025 |
| Organização do evento “IV Jornada Científica Profa. Maria Acelina Martins de Carvalho” | 2024 |
| Orientação de 2 discentes em monitoria da disciplina de Histologia e Embriologia Veterinária no Centro Universitário Uninassau - Parnaíba | 2024 |
| Participação em banca de defesa de 2 Trabalhos de Conclusão de Curso na Universidade Federal do Piauí | 2024 |
| Representante discente e Membro da Comissão de Bolsas do PPGTAIR | 2024-2025 |