

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA**  
**REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**Miguel Renato Reviriego Saciloto**

**O EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COM CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA SOBRE  
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

Araraquara, SP

2019

**Miguel Renato Reviriego Saciloto**

**O EFEITO DA ESTIMULAÇÃO COM CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA SOBRE  
DIFERENTES LINHAGENS CELULARES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Rosas da Costa lemma

Co-Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Araraquara, SP

2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

S126e Saciloto, Miguel Renato Reviriego

O efeito da estimulação com corrente elétrica contínua sobre diferentes linhagens celulares/Miguel Renato Reviriego Saciloto. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2019.

59f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma

Co-Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

1. Reparo tecidual. 2. Estimulação elétrica. 3. Corrente elétrica Contínua. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA  
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



**MIGUEL RENATO REVIRIEGO SACILOTO**

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

*Mônica R. da Costa Iemma*  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA (Orientadora)  
Universidade de Araraquara - UNIARA

*André Capaldo Amaral*  
Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL  
Universidade de Araraquara - UNIARA

*Kelli Cristina Micocci*  
Dr<sup>a</sup> KELLI CRISTINA MICOCCI  
Instituto de Biociências de Rio Claro/IB/UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais **José Valentim Saciloto e Helenita Aparecida Reviriego Saciloto**, por sempre me apoiarem na continuação dos estudos e concretização dos meus sonhos.

A minha amada esposa **Pâmela Matos de Souza Saciloto**, por acreditar, incentivar e fazer deste um projeto familiar, me ajudando em todas as fases e compreendendo os momentos ausentes para a realização deste estudo. Você foi a minha maior incentivadora.

A minha amada filha **Maria Luísa de Souza Saciloto**, você foi a minha maior fonte diária de inspiração para a conclusão deste estudo. “Papaiê”, te ama muito!

Aos **Mocotó e Margô**, os filhotes mais lindos do mundo, meus companheiros de escritório, que sempre me acolheram e me animaram com o amor mais puro e verdadeiro.

## AGRADECIMENTOS

Talvez esta é a pior parte da dissertação para ser escrita, porque a vida não é colocada em análise estatística e com certeza não é pelo valor p que se descobre a significância das pessoas em nossa caminhada.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me iluminar, guiar e me dar força e tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com os percalços encontrados.

Gostaria de agradecer a minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mônica Rosas da Costa lemma**, por toda a paciência com que me orientou neste trabalho e muito obrigado por me corrigir quando necessário.

Desejo igualmente agradecer meu co-orientador **Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto** pois foi a primeira pessoa a “abrir as portas” da UNIARA e com sua eterna paciência soube me auxiliar nos momentos em que mais necessitei.

Agradeço ainda o **Prof. Dr. Luís Henrique Montezor**, por me propiciar a suplementação necessária para o término do meu estudo. Grato!

Agradeço aos meus colegas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal, especialmente **Vilson e Osmar**, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Agradeço em especial a minha querida amiga **Glauce Pigatto**, por me ajudar em vários momentos do Mestrado e não medir esforços com as ajudas. Me faltam palavras para descrever o quão importante você foi em minha trajetória. Gratidão!

Agradeço em especial também a minha querida amiga **Gabriela**, que por muitas vezes foram meus olhos durante o Mestrado. Gratidão!

Agradeço em especial também meu querido amigo e agora já **Mestre Gabriel** por me auxiliar junto ao Departamento de Farmácia da Unesp de Araraquara através do **Doutorando Rone** com a leitura de minhas placas. Grato!

Agradeço em especial também a aluna de Iniciação Científica **Mariana Rios**, que foi os meus braços e mãos durante os meus estudos. Gratidão Eterna!

Gostaria de agradecer as meninas da secretaria do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal, **Sandra e Laura**, pela dedicação e brilhantismo que realizam as suas respectivas funções.

Aos funcionários da UNIARA de forma geral, pois cada um tem um papel importante na vida dos alunos.

A CAPES pelo auxílio com a taxa mensal para o reembolso. GRATO!

E finalmente a Universidade de Araraquara por me proporcionar a realização desse sonho. Gratidão Eterna!

*“ O homem pretende ser imortal e para isso defende princípios efêmeros. Um dia, inexoravelmente, descobrirá que para ser imortal deverá defender Princípios Absolutos. Nesse dia, morrerá para a carne, efêmera, e viverá para o Espírito, Eterno. Será Imortal”.*

*Dr. Celso Charuri*



## RESUMO

O músculo esquelético bem como os ossos são tecidos vitais para os movimentos articulares. Ambos possuem características próprias de reparação e regeneração, com vias de sinalização para os processos de proliferação, migração e diferenciação celular. A estimulação elétrica é uma ferramenta que pode ser utilizada para promover a proliferação e diferenciação celular. A Corrente Elétrica Contínua (CEC) possui uma alta eficácia na reparação tecidual. Nesse contexto surge uma alternativa promissora para o tratamento de lesões musculares e ósseas utilizando a aplicação da CEC. O objetivo deste trabalho foi a avaliação *in vitro* do efeito da aplicação da CEC na proliferação, viabilidade e diferenciação celular em linhagem celular mioblástica de camundongo (C2C12) e nas linhagens celulares osteoblásticas de rato (MC3T3 e OSTEO-1), todas submetidas a aplicação da CEC em diferentes densidades (0.1, 0.2 e 0.4 mA/cm<sup>2</sup>) nos tempos 2 e 5 minutos. Para analisar a viabilidade celular e migração das linhagens C2C12 e MC3T3, foram utilizados os ensaios de MTT e *wound healing* respectivamente. A diferenciação celular foi verificada pela detecção da atividade da fosfatase alcalina na linhagem OSTEO-1 e análise de alteração morfológica para linhagem C2C12. A análise de variância ANOVA seguida pelo do Teste *post-hoc* de Tukey com valores significantes para  $p < 0,05$  foi utilizada para os dados estatísticos. Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular das linhagens C2C12 e MC3T3 estimuladas em ambos os tempos, demonstraram diferenças significativas ( $p < 0,005$ ) quando comparados aos grupos controles (não estimulados). Na migração celular (*wound healing*) ambas as linhagens não apresentaram resultados de melhora. Os resultados para diferenciação celular da linhagem muscular C2C12 após 48h de estimulação, mostrou que em todos os grupos houve a formação de miotubos nos tempos avaliados. Para a linhagem óssea OSTEO-1, não houve diferença significativa na atividade da fosfatase alcalina após 7 e 14 dias depois do estímulo elétrico. De acordo com os resultados obtidos, foi observado que a aplicação da CEC com as intensidades baixas em ambas as linhagens utilizadas foi capaz de aumentar a viabilidade celular, sendo o seu maior efeito na linhagem muscular. Concluímos que a utilização da CEC em baixas intensidades pode ser uma forma promissora de eletroterapia para reparação do tecido muscular esquelético.

**Palavras chave:** Reparo Tecidual, Estimulação Elétrica, Corrente Elétrica Contínua

## ABSTRACT

The skeletal muscle as well as bones are vital tissues for joint movement. Both have their own repair and regeneration characteristics, with signaling procedures for cell proliferation, migration and differentiation processes. Electrical stimulation is a tool that can be used to promote cell proliferation and differentiation. Continuous Electric Current (CEC) is highly effective in tissue repair. In this context, there is a promising alternative for the treatment of muscle and bone injuries using CEC. The objective of this work was the in vitro evaluation of the effect of CEC application on cell proliferation, viability and differentiation in mouse myoblastic cell line (C2C12) and rat osteoblastic cell lines (MC3T3 and OSTE0-1). All of them submitted to the application of the CEC at different densities (0.1, 0.2 and 0.4 mA / cm<sup>2</sup>) at every 2 and 5 minutes. To analyze the cell viability and migration of C2C12 and MC3T3 lines, MTT and wound healing assays were used respectively. Cell differentiation was verified by detection of alkaline phosphatase activity in OSTE0-1 line and morphological alteration analysis for C2C12 line. ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test with significant values for  $p < 0.05$  was used for statistical data. The results obtained in the cell viability assays of the C2C12 and MC3T3 lines stimulated at both times showed significant differences ( $p < 0.005$ ) when compared to the control groups (unstimulated). In cell migration (wound healing) both strains showed no improvement results. The results for cell differentiation of the C2C12 muscle line after 48h of stimulation showed that in all groups there was formation of myotubes at the evaluated times. For OSTE0-1 bone lineage, there was no significant difference in alkaline phosphatase activity after 7 and 14 days after electrical stimulation. According to the results, it was observed that the application of CEC with low intensities in both lineage used was able to increase cell viability, being its major effect on muscle strain. We conclude that the use of CEC at low intensities may be a promising form of electrotherapy to repair the skeletal muscle tissue.

**Key Words:** Tissue Repair, Electrical Stimulation, Continuous Electrical Current

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> CORRENTE ELÉTRICA PULSADA .....	16
<b>FIGURA 2</b> CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA.....	16
<b>FIGURA 3</b> FORMAÇÃO DE CAMPO ELÉTRICO ENDÓGENO.....	18
<b>FIGURA 4</b> CÉLULAS SATÉLITE NA REPARAÇÃO TECIDUAL.....	19
<b>FIGURA 5</b> PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS SATÉLITE.....	20
<b>FIGURA 6</b> FASE INFLAMATÓRIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA.....	22
<b>FIGURA 7</b> FATORES COM INFLUÊNCIA NA REPARAÇÃO ÓSSEA .....	23
<b>FIGURA 8</b> APARELHO UTILIZADO NA PESQUISA.....	29
<b>FIGURA 9</b> PLACAS COM OS ELETRODOS.....	30
<b>FIGURA 10</b> ELETRODOS .....	31
<b>FIGURA 11</b> REPRESENTAÇÃO DA PLACA DE CULTIVO CELULAR.....	32
<b>FIGURA 12</b> ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA.....	35
<b>FIGURA 13</b> VIABILIDADE CELULAR C2C12 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) E PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE E TEMPOS .....	37
<b>FIGURA 14</b> VIABILIDADE CELULAR MC3T3 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) E PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE E TEMPOS .....	38
<b>FIGURA 15</b> WOUND HEALING NA LINHAGEM CELULAR C2C12 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 2 MINUTOS .....	39
<b>FIGURA 16</b> WOUND HEALING NA LINHAGEM CELULAR C2C12 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 5 MINUTOS .....	40
<b>FIGURA 17</b> WOUND HEALING NA LINHAGEM CELULAR MC3T3 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 2 MINUTOS.....	41

<b>FIGURA 18</b> WOUND HEALING NA LINHAGEM CELULAR MC3T3 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 5 MINUTOS .....	42
<b>FIGURA 19</b> AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA LINHAGEM CELULAR C2C12 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 2 MINUTOS.....	44
<b>FIGURA 20</b> AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA LINHAGEM CELULAR C2C12 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 5 MINUTOS.....	46
<b>FIGURA 21</b> ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA NA LINHAGEM CELULAR OSTEO-1 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 2 E 5 MINUTOS NO PERÍODO DE 7 DIAS .....	47
<b>FIGURA 22</b> ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA NA LINHAGEM CELULAR OSTEO-1 NA AUSÊNCIA (CONTROLE) OU PRESENÇA DE TRATAMENTO COM CEC UTILIZANDO DIFERENTES DENSIDADES DE CORRENTE NO TEMPO DE 2 E 5 MINUTOS NO PERÍODO DE 14 DIAS .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mA – mili Ampére

cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado

mA/cm<sup>2</sup> – mili Ampére por centímetro quadrado

Na<sup>+</sup> - Sódio

K<sup>+</sup> - Potássio

ATP-ase – enzima da Adenosina Tri Fosfato

CEC – Corrente Elétrica Contínua

MTT – técnica de viabilidade celular

C2C12 – células subclonadas de mioblastos de camundongo

MC3T3 – células pré-osteoblásticas de rato

OSTEO – 1 – células osteoblásticas de periósteo de osso parietal de ratos recém nascidos

Ca<sup>+2</sup> – Cálcio

°C – graus Celsius

ml – mililitros

U/ml – unidades por mililitros

SFB – Soro Fetal Bovino

DMSO – dimetilsulfóxido

% - porcentagem

CO<sub>2</sub> – gás carbônico

µl – microlitros

PBS – tampão fosfato salino

cm – centímetro

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
Objetivo Geral .....	26
Objetivo Específico .....	26
<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
Linhagem Celular .....	27
Cultivo Celular .....	27
Estimulação com a Corrente Elétrica Contínua (CEC) .....	29
Grupos Experimentais .....	31
Experimento .....	32
Viabilidade Celular .....	33
<i>Wound Healing</i> .....	33
Ensaio de Diferenciação da Linhagem C2C12 .....	34
Ensaio da Atividade da Fosfatase Alcalina .....	34
Análise Estatística .....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>

## INTRODUÇÃO

Na medicina regenerativa as abordagens mais amplas estão entre: compreender o mecanismo de reparo intrínseco nos tecidos promovendo uma melhora na reparação natural e reduzir as cicatrizações excessivas, como também desenvolver células capazes de reparar o tecido lesionado (FORBES, 2014).

A descontinuidade de tecidos através de lesões permite o desenvolvimento de terapias capazes de repará-los. A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar que permite a aplicação de princípios da ciência capazes de promover a regeneração e reparação tecidual como: utilização de terapias celulares, fatores de proliferação e diferenciação e biomateriais que permitem o organismo reparar tecidos danificados (MAO, MONEY, 2015).

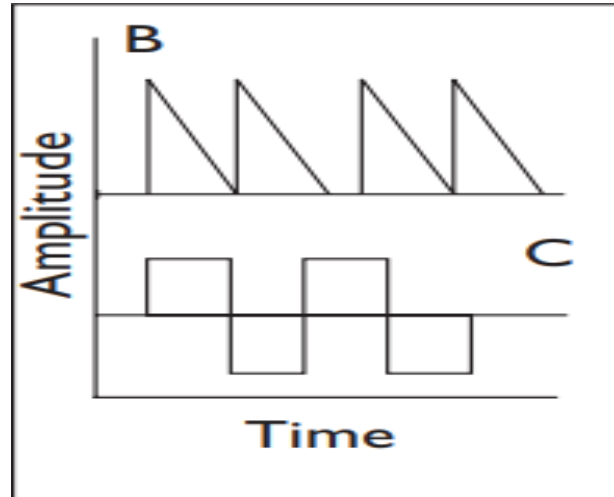
Um número cada vez maior de lesões nos tecidos, como as fraturas e as lesões musculares se beneficia com tratamentos combinando a terapia celular e tecnologias no campo da medicina regenerativa (MOBINI; LEPPIK; BARKER, 2016).

Modelos de reparo tecidual são essenciais na exploração da reparação e cicatrização de tecidos lesionados. Os estudos realizados *in vitro* permitem um exame quantitativo e qualitativo. O exame quantitativo mostra os efeitos produzidos nas células, fornecem também informações importantes sobre as estruturas dos tecidos, permitindo seu uso e estudo por muitos anos nas culturas celulares (UD DYN; BAYAT, 2017).

Segundo Poltawski e Watson (2009) existem como Estimulação Elétrica: a Corrente Pulsada, a Corrente Alternada e a Corrente Contínua. A Corrente Elétrica Pulsada ocorre quando a polaridade dos elétrons muda de forma constante com o tempo, mudando em consequência o sentido em que os elétrons circulam. É a corrente com pulsos bidirecionais simétricos e ininterruptos e sem uma polaridade definida (Figura 1).

### Figura 1 – Corrente Elétrica Pulsada

Ilustração do gráfico de Corrente Elétrica Pulsada onde a intensidade ( $i$ ) é medida em Ampéres (A) têm uma variação com o tempo ( $t$ ) expresso em segundos (s)

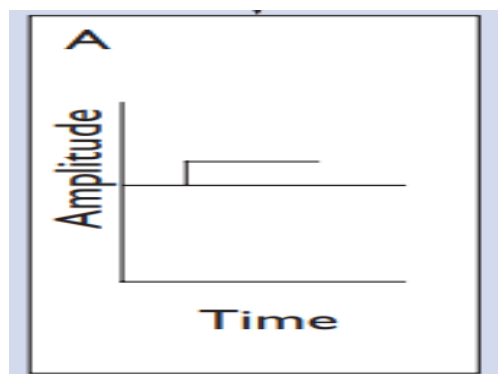


FONTE: extraído de RAMADAN, ELSAIDY, ZYADA (2008)

A Corrente elétrica Contínua é uma corrente com fluxo constante dos elétrons numa única direção. Esse fluxo não sofre com as interrupções, podendo ocorrer variação de intensidade durante um determinado intervalo de tempo. Ela é considerada polarizada, pois mantém fixa a polaridade da corrente durante todo o período, conforme ilustrado na Figura 2 (POLTAWSKI; WATSON, 2009).

### Figura 2 – Corrente Elétrica Contínua

Ilustração do gráfico de Corrente Elétrica Contínua onde a intensidade ( $i$ ) que é medida em Ampéres (A) não sofre variação em relação ao tempo (s)



FONTE: extraído de RAMADAN. ELSAIDY, ZYADA (2008)



A história da estimulação elétrica em células musculares pode ser rastreada desde meados dos anos 70. Os primeiros estudos mostraram a estimulação elétrica em células musculares de aves, posteriormente passaram a estudar as células musculares de ratos (NIKOLIC et al, 2017).

Sua evolução histórica permite tratar a Corrente Contínua como a mais antiga empregada de forma terapêutica dentre os estímulos elétricos. Para sua aplicação deve-se analisar a composição das células e tecidos que contém elementos químicos na forma de íons em suspensão com carga elétrica, pois é nesta forma que a Corrente atua.

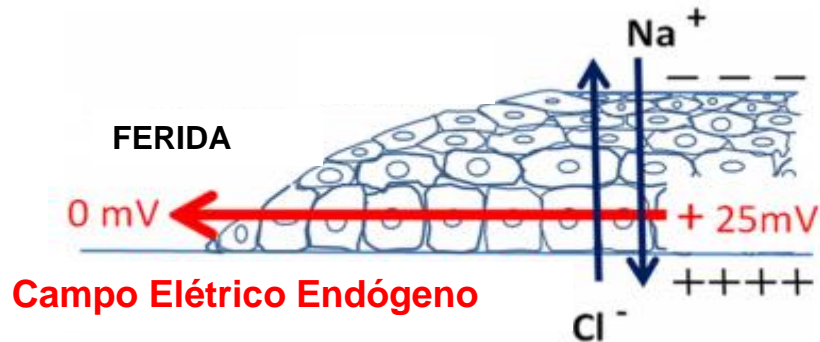
A dosagem é um elemento essencial nas correntes elétricas, pois a quantidade de energia que a área a ser tratada recebe é o que realmente importa, devendo ser considerada em mA. A área a ser tratada, por meio do eletrodo, deve ser considerada em cm<sup>2</sup>. Quando deseja-se obter sempre os mesmos efeitos, deve-se escolher valores de referência para a intensidade e superfície, conhecida como densidade de corrente (mA/cm<sup>2</sup>).

Os estudos *in vitro* mostram que a estimulação elétrica possui um papel importante na proliferação e diferenciação celular (LANGELAAN et al, 2011; MOBINI et al, 2016) e o efeito da estimulação elétrica tem sido amplamente testado em diferentes tipos celulares nos quais são mostrados o campo elétrico na migração celular conhecido como eletrotaxia (TAI; TAI; ZHAO, 2018).

O ferimento celular provoca um extravasamento de íons, gerando um campo elétrico endógeno onde a cicatrização se inicia lateralmente com apontamento para o centro da ferida, conforme ilustrado na Figura 3 (SONG et al, 2007; TAI; TAI; ZHAO, 2018) e esse campo elétrico endógeno possui um papel fundamental na divisão, migração e proliferação celular (SNYDER; DEJULIUS; WILLITS, 2017).

### Figura 3 – Formação de Campo Elétrico Endógeno

Ilustração da formação do campo elétrico endógeno produzido pela troca de íons de Sódio ( $\text{Na}^+$ ) e Cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Campo elétrico medido em miliVolts (mV)



FONTE: extraído de TAI; TAI; ZHAO (2018), modificado nas nomenclaturas que foram traduzidas para o Português

Após a estimulação elétrica através da corrente elétrica contínua ser aplicada, mudanças na forma da célula e na distribuição de sua atividade foram induzidas pelos campos elétricos constantes, gerando uma locomoção celular guiada eletricamente, onde as células são estimuladas a migrarem em uma direção. Essa mobilidade facilitada eletricamente faz com que as células inflamatórias se dirijam em direção aos eletrodos, contornando as bordas das feridas e alinhando-se ao campo elétrico da Corrente Contínua aplicada. Nelson, et al (2003) discutiram diferentes protocolos de estimulação, dos quais identificou que os campos elétricos endógenos após a CEC pode ser a responsável pela aceleração da reparação tecidual.

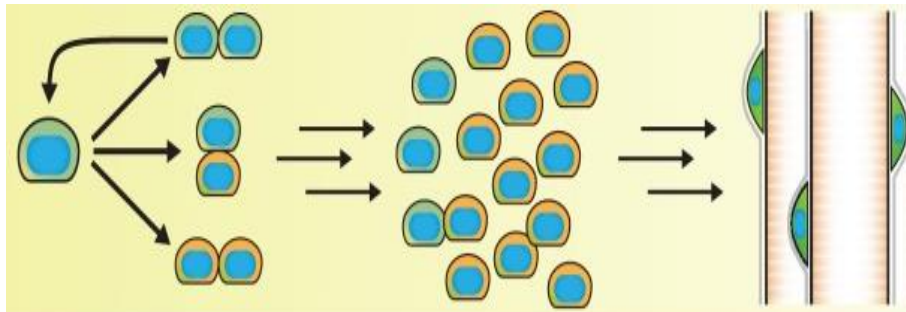
O músculo esquelético é um tecido surpreendente em vários aspectos, pois é especializado em gerar força para que sua função seja bem estabelecida (TIDBALL, 2011) como também possui uma capacidade para se reparar após repetidos traumas (BAGHDADI; TAJBAKSH, 2018).

O crescimento, a regeneração, a manutenção e a adaptação do músculo esquelético são provenientes de um grupo de células precursoras miogênicas, conhecidas como células satélite (ARTILHEIRO et al, 2012), sendo a principal fonte na reparação e crescimento do músculo esquelético (MCCULLAGH; PERLINGEIRO, 2015).

As células satélites se localizam em uma região especializada entre a matriz extracelular circundante, conhecida como lâmina basal e o sarcolema. Uma vez acionadas, essas células se proliferam e se diferenciam em células miogênicas essenciais no processo de reparação do tecido muscular lesionado, conforme ilustrado na Figura 4 (DUMONT; WANG; RUDNICKI, 2015).

#### Figura 4 - Células Satélite na Reparação Tecidual

Ilustração das Células-Satélite no processo de proliferação e diferenciação celular durante a reparação tecidual



FONTE: extraído de DUMONT; WANG; RUDNICKI (2015)

Após uma lesão, inicia-se imediatamente uma invasão de células inflamatórias que podem persistir por semanas, enquanto ocorre a reparação e o crescimento muscular (TIDBALL, 2005). As células inflamatórias penetram no local lesionado, atuando na remoção dos resíduos e aumentando a resposta imune com a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essa liberação promove a ativação das células satélites que visam a formação de novas células musculares (JUHAS; BURSAC, 2013).

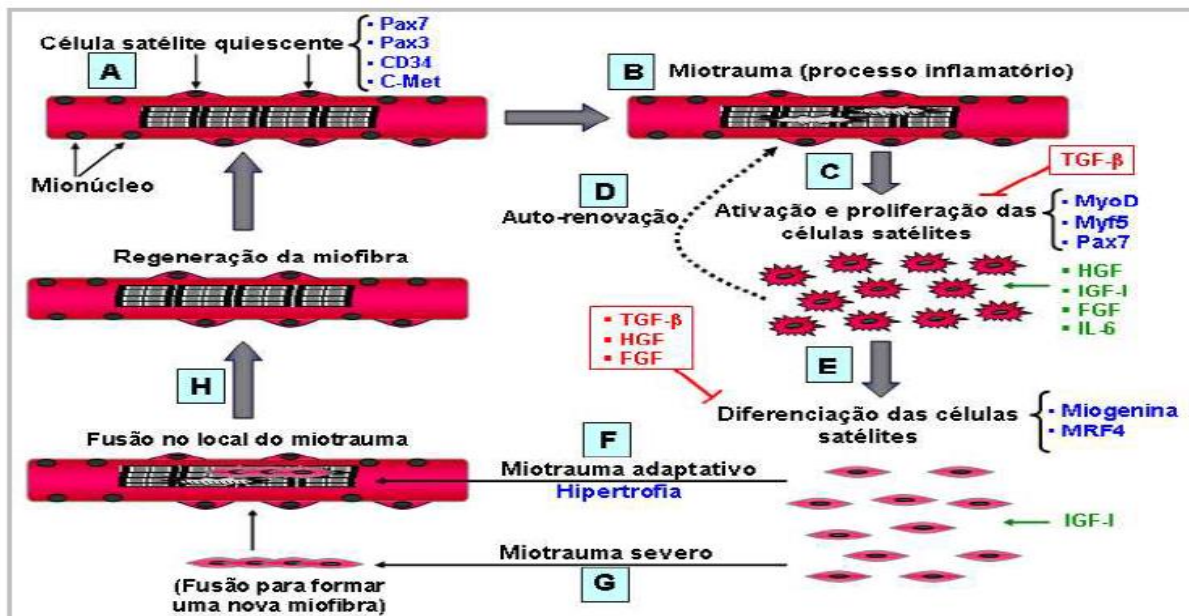
As células satélites ativadas aumentam de tamanho e começam a se proliferarem. Após alguns ciclos de proliferação, estas células passam a expressar a miogenina, se diferenciando e saindo do ciclo para formar novas ou reparar miofibras existentes. Uma outra parte das células satélite voltam ao seu estado original mantendo-se como reserva para uma futura reparação (DINULOVIC; FURRER; HANDSCHIN, 2017). A capacidade de reparação muscular das células satélites após

uma lesão, requer que estas sofram uma diferenciação no processo de reconstrução da fibra lesionada no ciclo lesão reparo (ALMADA; WAGERS, 2016).

As células satélites podem ser ativadas em resposta a miotraumas que requerem a regeneração muscular através de sua proliferação e diferenciação na formação de novas fibras. A ativação das células satélites podem ser influenciados por vários fatores de crescimento como: IGF-I, HGF, FGF e TGF. Além disso, as células satélites controlam as fases de ativação, proliferação e diferenciação no reparo muscular (AGUIAR; AGUIAR, 2009).

Figura 5 – Proliferação e Diferenciação das Células Satélite

Fibra muscular normal com célula satélite quiescente (A). Após um miotrauma (B), as células satélites quiescentes são ativadas, proliferam-se (C) e se diferenciam em mioblastos (E). No miotrauma adaptativo, os mioblastos migram para a região danificada e fundem-se com a fibra muscular pré-existente (F). Em miotraumas severos, os mioblastos se alinham e fundem-se entre si, formando uma nova miofibrila (G) e reparam o dano muscular (H). A fase de ativação das células satélites é expressada pelo MyoD e Myf5 e na diferenciação ocorre a expressão da Miogenina e MRF4.



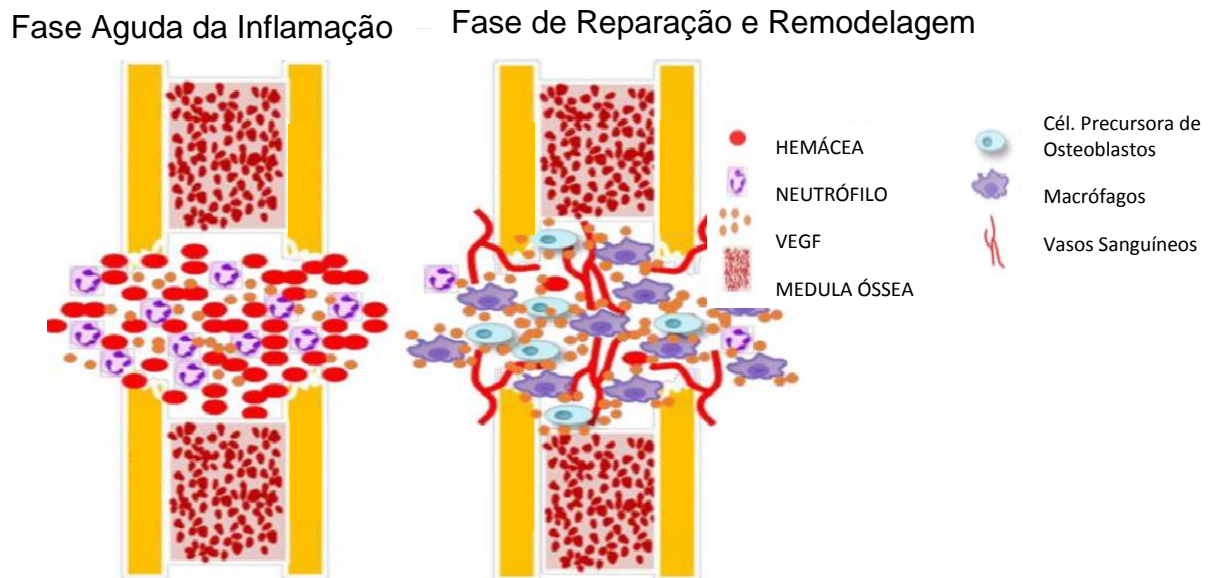
FONTE: extraído do site [www.google.com.br/imagens](http://www.google.com.br/imagens), acesso em 03/01/2019

O osso é um tecido com inúmeras funções vitais como: facilitação na locomoção, armazenamento de minerais e proteção a órgãos vitais. Altamente dinâmico, ele sofre um processo constante de reparação e remodelação (LOI et al, 2016). Os ossos são essenciais no trabalho do músculo, principalmente no sistema de alavancas das articulações. São constituídos de vários tipos celulares em diferentes estágios na diferenciação celular (HALCSIK, 2012).

Uma assimilação dos princípios da perda e reparação óssea é essencial no tratamento de lesões que afetam o tecido ósseo. Embora para essa perda e reparo eram considerados somente osteoclastos e osteoblastos, atualmente existe uma grande interação das linhagens osteoblástica mesenquimal – osteoblástica e do monócito macrófago – osteoclasto, pois as células inflamatórias são essenciais na reparação e remodelação óssea, conforme ilustrado na Figura 6 (LOI et al, 2016).

Figura 6 – Fase Inflamatória na Reparação Óssea

Expressão e funções da VEGF na fase inflamatória durante a reparação óssea. Durante a fase aguda da inflamação, forma-se um hematoma constituído por glóbulos vermelhos e neutrófilos no local da lesão. Os neutrófilos removem os restos ósseos e patógenos microbianos. O VEGF induz a quimiotaxia de neutrófilos e aumenta a permeabilidade da medula. Após a infiltração dos neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias chegam ao local da lesão liberando citocinas que irão promover a revascularização nos locais lesionados. Os macrófagos recrutados fagocitam os neutrófilos mortos, onde será liberado mediadores que irão suprir a resposta inflamatória e iniciar o reparo.



FONTE: extraído de HU; OLSEN (2016) - modificado nas nomenclaturas que foram traduzidas para o Português

O sistema vascular é crucial durante a reparação tecidual. Nos ossos, não serve somente como fonte de nutrientes e oxigênio, mas também fornecem cálcio e fosfato no processo de mineralização. Além disso, os vasos na medula óssea possuem um importante papel para as células tronco formadoras de ossos, conforme ilustrado na Figura 7 (STEGEN; GASTEL; CARMELIET, 2014).

Figura 7 – Fatores com Influência na Reparação Óssea

A importância das células progenitoras, fatores de crescimento, suprimento sanguíneo e ambiente mecânico na reparação óssea de fraturas se deve as evidências que as células inflamatórias e seus mediadores possuem no papel de regulação da consolidação da fratura.



FONTE: modificado e extraído de LOI et al (2016).

A demanda na reparação de lesões está aumentando, elevando a procura por dispositivos que facilitem a reparação, e um dispositivo disponível para esse tipo é a estimulação elétrica (TAI; TAI; ZHAO, 2018) sendo esta uma terapia utilizada no processo de reparação de lesões, pois gera campos elétricos fisiológicos e correntes que ajudam na sua reparação (SNYDER; DEJULIUS; WILLITS, 2017).

A estimulação elétrica tem sido usada como uma ferramenta na proliferação e diferenciação de células musculares e ósseas *in vitro*, simulando assim o processo fisiológico de reparação tecidual das células musculares e ósseas *in vivo* (LANGELAAN et al, 2011), pois mesmo por curtos períodos de tempo alteram as funções celulares na reparação dos tecidos (SNYDER et al, 2017).

A formação de tecido funcional tem um alto impacto na medicina regenerativa. A substituição de tecido muscular sem funcionalidade por um tecido recuperado funcionalmente através da estimulação elétrica é uma opção de tratamento com pouco ou nenhum efeito colateral (NIKOLIC et al, 2017).

A estimulação elétrica é uma ferramenta que pode ser utilizada na proliferação e diferenciação das células musculares e ósseas *in vitro*, pois aproxima-se do processo fisiológico (MAO, MONEY, 2015; MISHRA, et al, 2015; MOBINI, LEPIK, BARKER, 2016; DUMONT, FURRER, HANDSCHIN, 2017). A Corrente Elétrica Contínua possui uma alta eficácia na aceleração da reparação das lesões

teciduais e quando utilizada em curtos períodos de tempo, alteram as funções celulares na reparação dos tecidos (SONG, et al, 2007; FUNK, 2015; WANG, et al, 2016).



## JUSTIFICATIVA

Na prática fisioterápica as lesões mais encontradas acontecem nos tecidos muscular e ósseo. As lesões musculares e ósseas apresentam manifestações clínicas diferentes, dependendo do mecanismo do trauma (FERRARI, et al, 2005). As células C2C12 e MC3T3 estão relacionadas com os tecidos mais comumente lesionados na atuação fisioterápica e o interesse nessas linhagens acontece para o entendimento do como a estimulação elétrica com a Corrente Elétrica Contínua em baixa intensidade irá proporcionar os benefícios a esses tecidos (TAI; TAI; ZHAO, 2018).

Essas duas linhagens foram escolhidas para se ter uma visão o que acontece com as células em termos de regeneração ou possibilidade de alteração no tecido ósseo e no tecido muscular e como são os andamentos de resposta após a eletroestimulação em cada tipo de tecido.

Com a capacidade de reparar tecidos como muscular e ósseo, a CEC rotineiramente é utilizada em áreas da medicina, proporcionando resultados satisfatórios. A utilização dessa corrente com densidades de correntes mais baixas é pouco explorada, com poucos resultados publicados na comunidade acadêmica que demonstrem a eficiência da utilização da terapia com seus métodos e parâmetros de aplicações (FERNANDES, et al, 2010; MODARRESI, et al, 2012).

Novas técnicas para o tratamento de lesões musculares e para as fraturas ósseas são necessárias tendo em vista a representatividade das mesmas. Nesse âmbito a estimulação elétrica através da corrente elétrica contínua se apresenta como uma possibilidade promissora para o tratamento das lesões musculares e ósseas em suas diversas especificidades. Sendo agora necessários estudos que abordem a forma de utilização dessa terapêutica tendo em vista todas as possibilidades de sua utilização baseada em variáveis.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a proliferação, a viabilidade e diferenciação celular *in vitro* de diferentes linhagens celulares após a aplicação da Corrente Elétrica Contínua (CEC).

### Objetivos Específicos

- Avaliar as respostas das linhagens celulares após a aplicação da CEC nos tempos de 2 e 5 minutos;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens celulares através do método MTT após a aplicação da CEC;
- Avaliar a migração celular das linhagens celulares através da técnica de *Wound Healing* após a aplicação da CEC;
- Avaliar a diferenciação celular da linhagem C2C12 após a aplicação da CEC;
- Avaliar a diferenciação celular da linhagem Osteo-1 através do método de Fosfatase Alcalina após a aplicação da CEC;

## **METODOLOGIA**

O estudo foi realizado nas dependências da Universidade de Araraquara-SP (UNIARA), junto ao Laboratório de Ensaio Celular e Engenharia Regenerativa do Grupo Quimmera (LECER).

### **Linhagem Celular**

Foram utilizadas três linhagens celulares: C2C12 (células subclonadas de mioblastos de camundongo), MC3T3-E1 (células pré-osteoblásticas de rato) e a Osteo-1 (células osteoblásticas originadas de perióstio de osso parietal de ratos recém-nascidos). As células foram cedidas gentilmente pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo do LBBM/UFSCAR (Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos) e cultivadas no Laboratório LECER.

Os meios DMEM (Eagle modificado de Dulbecco) e  $\alpha$ -MEM empregados no cultivo celular foram adquiridos da empresa Nutricell Nutrientes Celulares – Campinas-SP – Brasil.

### **Cultivo Celular**

Um tubo criogênico armazenado em freezer -80°C de cada uma das linhagens utilizadas para o estudo, armazenadas em Soro Fetal Bovino (SFB) e protegidas em dimetilsulfóxido (DMSO) foi descongelado em banho Maria a 37°C por 1 minuto. Para remover o DMSO, as células em suspensão foram transferidas para um tubo falcon de 15 ml contendo 3 mL de DMEM ou  $\alpha$ -MEM, contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e acrescido de penicilina e estreptomicina (10U/mL). Em seguida, centrifugadas na centrífuga Combate<sup>®</sup> a 1200 rpm durante 4 minutos, à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células resultante da centrifugação, foi ressuscitado em 1 mL de DMEM ou  $\alpha$ -MEM. A suspensão das células foi transferida para uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> contendo 3 mL de DMEM ou  $\alpha$ -

MEM com 10% SFB e acrescido de antibiótico-antimicótico. A cultura foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar Veco, seguindo os protocolos para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meios de cultura.

A monitorização do crescimento celular foi realizada diariamente utilizando-se microscópio invertido Nikon Eclipse T5100 e o meio de cultura trocado a cada 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após atingirem 80-90% da subconfluência do frasco, as células foram subcultivadas. Para tal, o meio de cultura foi retirado e descartado, a monocamada celular lavada uma vez com a solução PBS (tampão fosfato salino). A seguir, o PBS foi retirado do frasco e descartado e as células foram desaderidas com 3 mL de solução de tripsina, durante 4 minutos, mantida em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a inativação da tripsina foi utilizado meio de cultura DMEM ou  $\alpha$ -MEM completos. As células em suspensão foram transferidas para um tubo Falcon e centrifugadas na centrífuga Combate® a 1200 rpm durante 4 minutos, à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi removido e o precipitado de células ressuspendido em 1 ml de meio de cultura DMEM ou  $\alpha$ -MEM. Da ressuspensão foram retirados 10 $\mu$ L e adicionados 10 $\mu$ L de azul de Trypan 0,4%, onde posteriormente as células foram transferidas para a câmara de Neubauer e, em seguida levada ao microscópio invertido Nikon Eclipse T5100 para a realização da contagem do número de células.

Após o subcultivo as linhagens celulares foram semeadas em placa de 24 poços com meio DMEM ou  $\alpha$ -MEM, com uma concentração de 1x10<sup>4</sup> células/poço para a realização e análise dos ensaios.

Para a perpetuação da linhagem celular, frações de suspensões de células foram subcultivadas em novas garrafas, dando origem a novas passagens da cultura. Para todo o experimento foram utilizadas células entre a quinta e vigésima passagens.

## Estimulação com a Corrente Elétrica Contínua (CEC)

Neste estudo foi utilizado a corrente elétrica contínua (CEC) através do equipamento Neurograph da empresa KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda. Foi utilizado juntamente um multímetro da empresa Rontek modelo TRUT30B congregando a amperagem utilizada conforme Figura 8.

Os eletrodos foram confeccionados de alumínio, devido a sua alta condutibilidade, onde cada eletrodo possuía uma área de contato com o meio de cultura de  $1 \text{ cm}^2$  (Figura 10). Foram trabalhadas 3 intensidades de correntes diferentes: 0.1mA, 0.2 mA e 0.4 mA. Portanto, ao final, obteve-se densidade de correntes escolhidas em:  $0.1 \text{ mA/cm}^2$ ,  $0.2 \text{ mA/cm}^2$  e  $0.4 \text{ mA/cm}^2$ .

Foram aplicadas as correntes em cada poço com uma distância de 1 cm entre os eletrodos, onde estes ficaram acoplados a borda lateral de cada poço (Figura 9). O estudo foi realizado em dois tempos distintos de aplicação da CEC: 2 e 5 minutos.

Figura 8: Aparelho utilizado na pesquisa

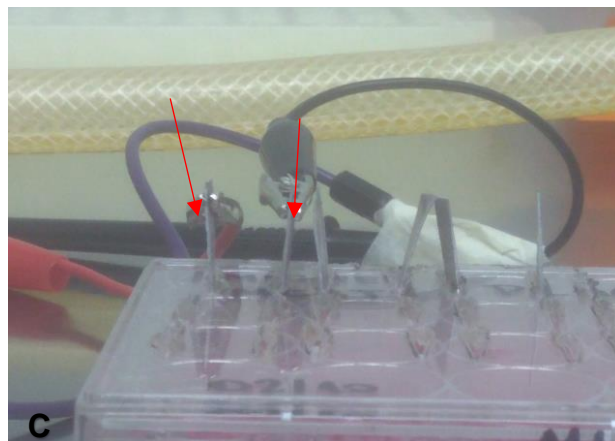
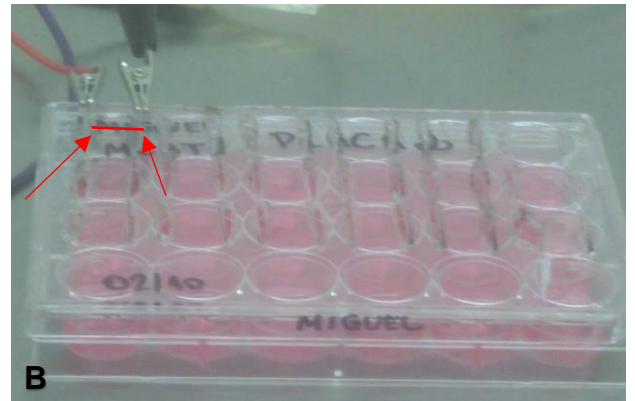
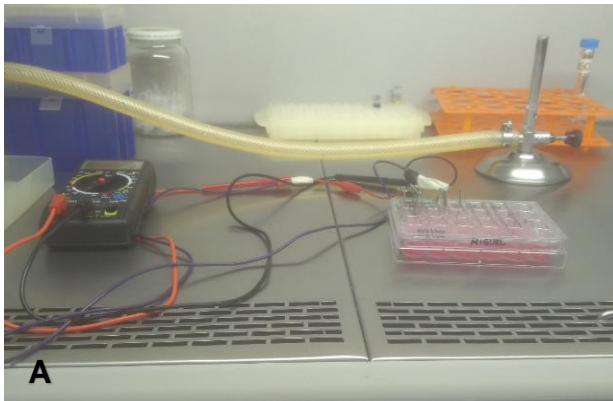
A: Ilustração com a Visão Superior do equipamento Neurograph – KLD – Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda



FONTE: Próprio Autor

Figura 9 - Placas com os eletrodos

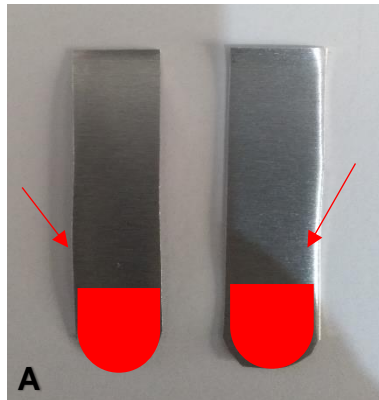
A: Ilustração com a Visão do Multímetro e Eletrodos acoplados a placa de 24 poços; B: Ilustração modificada com a Visão dos eletrodos ilustrando a distância de 1 cm entre os eletrodos; C: Ilustração modificada ilustrando a aplicação da CEC em cada poço



FONTE: Próprio Autor

## Figura 10 - Eletrodos

A: Ilustração modificada dos eletrodos de alumínio utilizados nos experimentos. A área ilustrada em vermelho representa a área em contato com o meio de cultura durante a estimulação elétrica – 1 cm<sup>2</sup>.



FONTE: Próprio Autor

## Grupos Experimentais

Os grupos experimentais foram:

**Controle (GC):** Células (C2C12, MC3T3 e Osteo-1) crescidas em meio nas condições ideais e sem estimulação elétrica.

**Densidade de Corrente (DC) 0.1 mA/cm<sup>2</sup> – 2 e 5 minutos (G0.1 – 2 e G0.1 - 5):** Células (C2C12, MC3T3 e Osteo-1) crescidas em meio nas condições ideais e estimuladas com uma densidade de corrente de 0.1 mA/cm<sup>2</sup> por 2 e 5 minutos.

**Densidade de Corrente (DC) 0.2 mA/cm<sup>2</sup> – 2 e 5 minutos (G0.2 – 2 e G0.2 -5):** Células (C2C12, MC3T3 e Osteo-1) crescidas em meio nas condições ideais e estimuladas com uma densidade de corrente de 0.2 mA/cm<sup>2</sup> por 2 e 5 minutos.

**Densidade de Corrente (DC) 0.4 mA/cm<sup>2</sup> – 2 e 5 minutos (G0.4 – 2 e G0.4 - 5):** Células (C2C12, MC3T3 e Osteo-1) crescidas em meio nas condições ideais e estimuladas com uma densidade de corrente de 0.4 mA/cm<sup>2</sup> por 2 e 5 minutos.

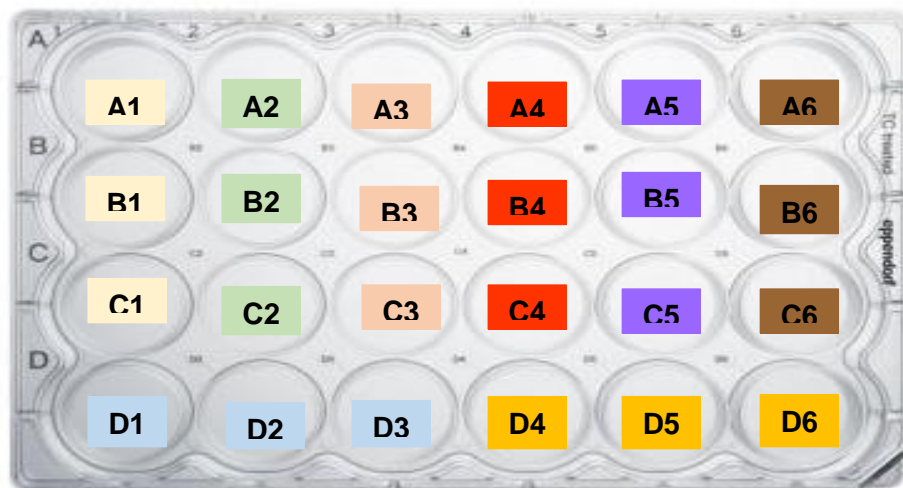
## Experimento

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em dois ensaios biológicos.

Após 24 horas que a suspensão celular foi semeada em placas de 24 poços na concentração celular de  $1 \times 10^4$  células/poço, sendo três poços para cada grupo experimental e o acréscimo de meio DMEM ou  $\alpha$ -MEM, cada poço recebeu o estímulo elétrico com a CEC conforme seu grupo experimental, ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Representação da placa de cultivo celular

Ilustração modificada com a representação da placa de cultivo celular. Cada cor representa um grupo experimental: Azul Claro: D1, D2 e D3 – **GC-02**; Amarelo Claro: A1, B1 e C1 – **G0.1 – 2**; Verde Claro: A2, B2 e C2 – **G0.2 – 2**; Laranja Claro: A3, B3 e C3 – **G0.4 – 2**; Amarelo escuro: D4, D5 e D6 – **GC – 5**; Vermelho: A4, B4 e C4 – **G0.1 – 5**; Roxo: A5, B5 e C5 – **G0.2 – 5** e Marrom: A6, B6 e C6 – **G0.4 – 5**



FONTE: [www.online-shop.eppendorf.com.br](http://www.online-shop.eppendorf.com.br), acesso em 26/12/2018

## Viabilidade Celular

Para análise da viabilidade celular foi observado os efeitos da proliferação celular após a estimulação elétrica com CEC, em 1 único período. Os



dados do teste do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) foram obtidos após 48 horas da aplicação da corrente elétrica.

Para a realização das análises foram semeadas 2 placas de 24 poços para a linhagem celular C2C12 e duas para a linhagem celular MC3T3-E1 em ensaios biológicos distintos. Em cada placa foram semeados 3 poços para cada grupo experimental (8 grupos).

As placas de 24 poços foram analisadas pelo teste do MTT 48 horas após as células terem recebidos a CEC. O teste de MTT foi realizado da seguinte forma: o meio de cultura presente em cada poço foi removido após a inversão rápida da placa, foi adicionado a cada poço 400  $\mu$ L de PBS 1x. Após a remoção do PBS 1x foi adicionado 200  $\mu$ L de MTT em cada poço e incubado em estufa a 37°C por 4 h.

Transcorrido o tempo foi removido o MTT e adicionado 400  $\mu$ L de DMSO (sulfóxido de dimetilo) em cada poço. Posterior a adição do DMSO, os cristais formados foram solubilizados repetidas vezes e transferidos 100  $\mu$ L para a placa de 96 poços, na qual foi realizado a leitura utilizando o leitor Polaris® densidade óptica (DO) de 570 nm. Os resultados foram calculados e apresentados pela porcentagem média de viabilidade dos poços.

### ***Wound Healing***

Ambas linhagens celulares (C2C12 e MC3T3), foram cultivadas em 2 placas de 24 poços (uma para cada linhagem) em dois ensaios biológicos independentes.

O monitoramento do crescimento celular ocorreu com 24, 48 e 72 h ou quando a monocamada celular atingiu uma confluência de 90%. Após a confluência atingir 90% foi realizada com uma ponteira de pipeta P1000, uma risca em local pré-estabelecido na linha mediana vertical de cada poço, gerando uma lesão mecânica na confluência celular. Imediatamente após a obtenção da lesão mecânica foi aplicado a CEC nos poços destinados aos grupos experimentais. As imagens do local da lesão foram adquiridas através de um microscópio invertido Nikon Eclipse T5100, em 0, 24 e 48 h após a CEC, respectivamente aos grupos presentes nas placas. As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ, este destinado ao processamento

das imagens obtidas. Os resultados foram calculados e apresentados pela média das áreas analisadas.

### **Ensaio de Diferenciação da Linhagem C2C12**

A linhagem celular C2C12 foi cultivada em 6 placas de 24 poços. Em cada placa foram semeados 3 poços por grupo experimental (8 grupos) totalizando 24 poços. Após 24 horas, os grupos experimentais foram submetidos a aplicação do estímulo elétrico através da CEC.

Decorrido o tempo de 24 h da estimulação com CEC o meio (DMEM) foi removido dos poços e em seguida foram lavados com PBS 1x e foi adicionado o meio de diferenciação contendo: DMEM suplementado com soro fetal de cavalo 2% acrescidos de antibiótico-antimicótico.

As placas foram mantidas incubadas em estufa a 37°C. O cultivo celular de C2C12 foi avaliado em 24, 48 e 96 h, após a suplementação com o meio de diferenciação, quanto a sua morfologia.

As imagens foram obtidas utilizando o microscópio invertido Nikon Eclipse T5100 para a análise da diferenciação nos tempos estudados.

### **Ensaio da Atividade da Fosfatase Alcalina**

As células OSTEO-1 foram cultivadas e semeadas em placas de 24 poços. Após 24 horas as células foram submetidas a aplicação do estímulo elétrico através da CEC.

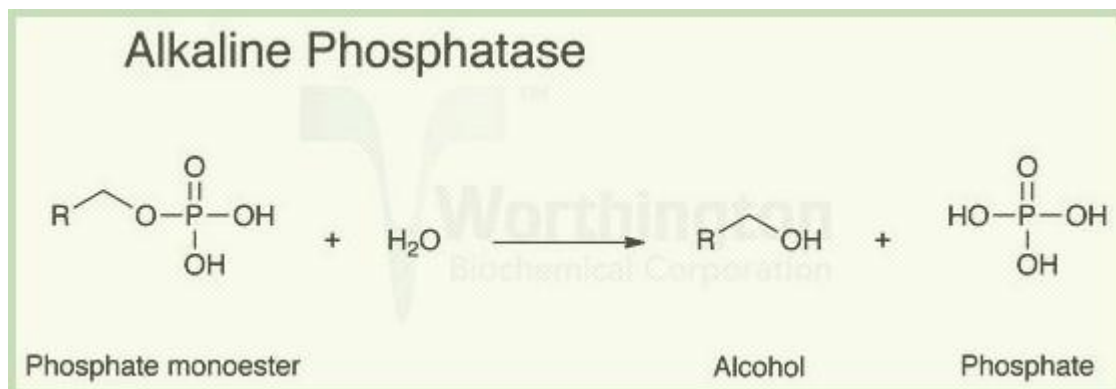
Decorrido o tempo de 24 horas da estimulação com CEC o meio (DMEM) foi removido dos poços e em seguida foram lavados com PBS 1x e adicionado o meio de diferenciação DMEM acrescido de dexametasona 0,1  $\mu$ M, ácido ascórbico 0.3 mM e  $\beta$ -glicerolfosfato 10mM.

O meio de diferenciação foi trocado a cada 3 dias e as placas foram mantidas incubadas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. A cultura celular foi avaliada em 7 e 14 dias após a aplicação da corrente elétrica contínua.

Foi utilizado para a análise da atividade da Fosfatase Alcalina o protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A. – Lagoa Santa – Minas Gerais – MG – Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. Com a utilização do substrato de timolftaleína monofosfato é possível a medida direta do produto de hidrólise (reação de decomposição ou alteração de uma substância pela água), alterando o pH, cuja modificação é medida fotometricamente através do espectrofotômetro em 540 nm. Um dos principais marcadores da diferenciação celular está no aumento das atividades das fosfatase, pois estas atuam removendo o grupo fosfato das moléculas conforme ilustrado na figura 12.

Figura 12 – Atividade da Fosfatase Alcalina

A hidrólise de um fosfomonoéster leva a um fosfato inorgânico e um álcool correspondente.



FONTE: [www.google.com.br/imagens](http://www.google.com.br/imagens), acessado em 30/01/2019

A linearidade dos cálculos da fosfatase alcalina foi calculada multiplicando-se a absorbância do teste pelo fator de calibração cuja unidade foi medida em U/L, conforme as fórmulas abaixo:

- Fator de Calibração = 45/Absorbância do Padrão

- Fosfatase Alcalina (U/L) = Absorbância do Teste x Fator de Calibração

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média + E.P.M. As diferenças entre os grupos experimentais foram obtidas pela análise de variância (ANOVA), de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como indicativo de significância. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o software Graphpad Prisma versão 7.1.

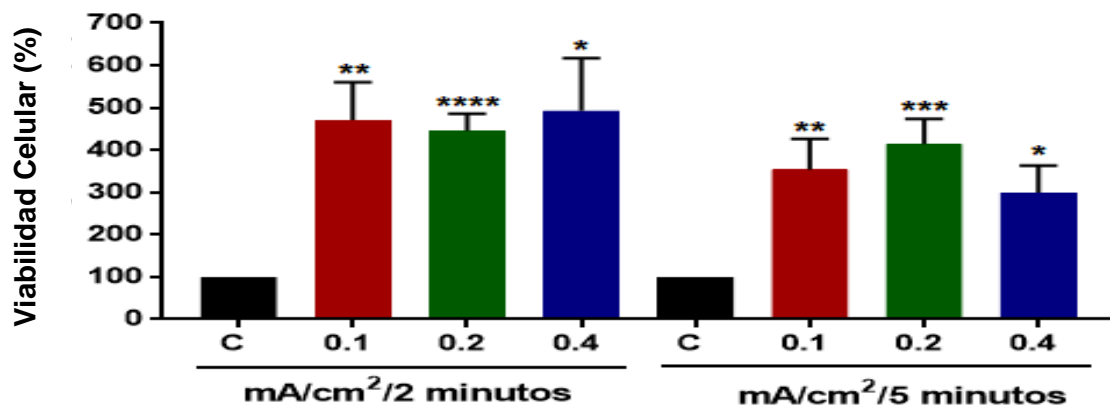
## RESULTADOS

Os resultados da viabilidade celular da linhagem celular C2C12 após a estimulação com CEC, mostraram que houve uma diferença significativa comparando os grupos testados com CEC em relação ao controle, respectivamente ( $p < 0,05$ ), ilustrado na Figura 13.

Não foi possível verificar diferença significativa na viabilidade celular desta mesma linhagem celular, quando comparados os grupos com mesma densidade de corrente e tempos distintos (**G0.1 – 2** com **G0.1 – 5**, **G0.2 – 2** com **G0.2 – 5** e **G0.4 – 2** com **G0.4 – 5**) como também não houve diferença significativa entre os grupos estimulados com o mesmo tempo (**G0.1 -2** com **G0.2 – 2** e com **G0.4 – 2** e **G0.2 – 2** com **G0.4 – 2**), conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Viabilidade celular C2C12 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente e tempos

C: Grupo Controle; \*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,4 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle nos dois tempos avaliados; \*\*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,1 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle nos dois tempos avaliados; \*\*\*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle no tempo de 5 minutos; \*\*\*\*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle no tempo de 2 minutos



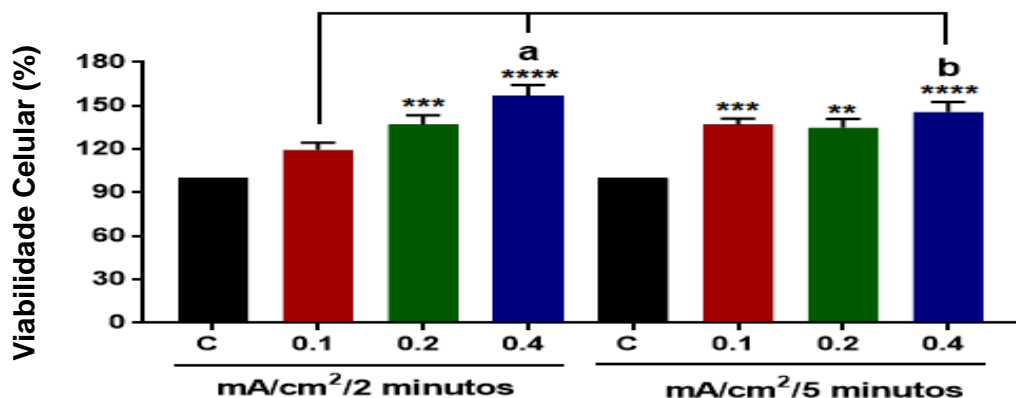
FONTE: Próprio Autor

Os resultados da viabilidade celular da linhagem celular MC3T3-E1 após a estimulação com a CEC, mostraram que houve diferença somente nos grupos tratados **G0.2 - 2** e **G0.4 - 2** em relação ao grupo **GC - 2** ( $p < 0,005$ ) e houve diferença significativa na comparação entre os grupos tratados com CEC (**G0.1 - 5**, **G0.2 - 5** e **G0.4 - 5**) e o grupo **GC - 5** ( $p < 0,05$ ), conforme ilustrado na Figura 14.

Foi possível verificar significância estatística na viabilidade celular desta mesma linhagem celular quando comparados os grupos: **G0.4 - 2** em relação ao **G0.1 - 2** ( $p < 0,001$ ) como também do grupo **G0.4 - 5** em relação ao **G0.1 - 2** ( $p < 0,05$ ), ilustrados na Figura 14.

Figura 14 – Viabilidade celular MC3T3 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente e tempos

C: Grupo Controle; \*\*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle no tempo de 5 minutos; \*\*\*: Comparação dos Grupos com - Densidade de Corrente 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle no tempo de 2 minutos e Densidade de Corrente 0,1 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle no tempo de 5 minutos; \*\*\*\*: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,4 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo Controle em ambos os tempos; a: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,4 mA/cm<sup>2</sup> e o Grupo com Densidade de Corrente 0,1 mA/cm<sup>2</sup> ambos no tempo de 2 minutos; b: Comparação do Grupo com Densidade de Corrente 0,4 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 5 minutos com o Grupo com Densidade de Corrente de 0,1 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 2 minutos



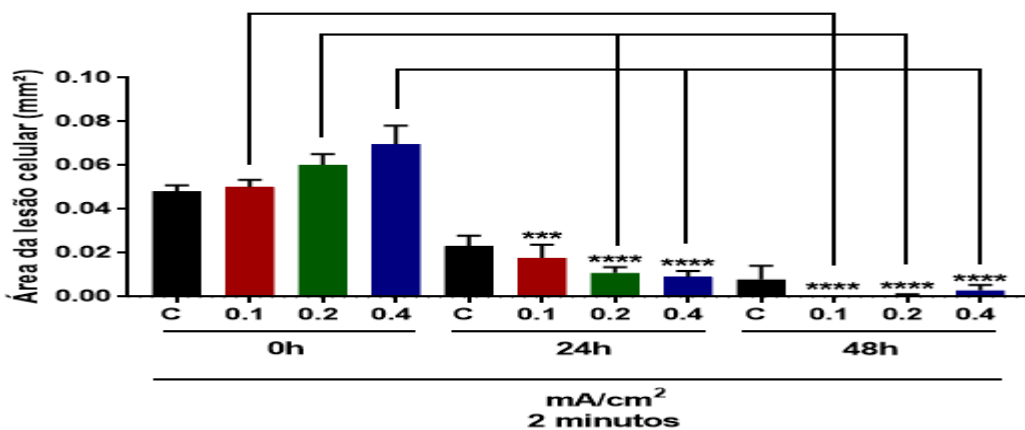
FONTE: Próprio Autor

Quanto ao efeito da estimulação elétrica com corrente contínua sobre o *wound healing* na linhagem celular C2C12 os resultados mostram que houve uma diferença significativa na proliferação celular no tempo de 2 min, nos grupos tratados com a CEC em 24 e 48 h comparados com o período inicial de 0h ( $p < 0,0001$ ), ilustrado na Figura 15.

Porém não foi possível verificar significância estatística na proliferação celular desta mesma linhagem quando comparados os grupos controle nos períodos de 24 e 48 h em relação ao grupo controle do período inicial de 0h no tempo de 2 minutos ( $p > 0,05$ ) e também Não foi possível verificar significância estatística na proliferação celular da linhagem C2C12 quando comparados os grupos estimulados com CEC no período de 24 e 48h em relação aos grupos controle do mesmo período ( $p > 0,05$ ), conforme ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – *Wound Healing* na linhagem celular C2C12 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de **2 min**

C: Grupo Controle; \*\*\*\*: Comparação das DC 0,1 mA/cm<sup>2</sup>, 0,2mA/cm<sup>2</sup> e 0,4mA/cm<sup>2</sup> nos períodos de 24 e 48h em relação as mesmas DC do período inicial de 0h, respectivamente



FONTE: próprio autor

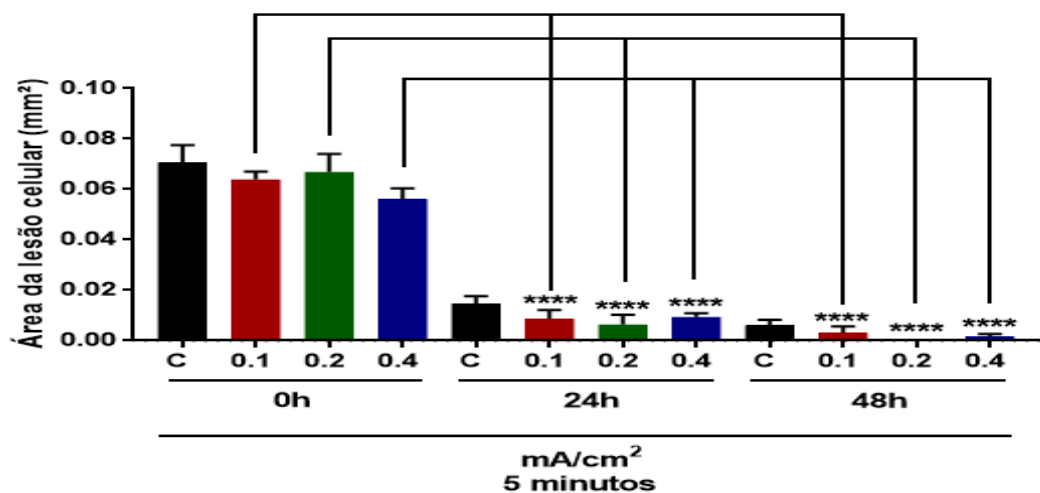
No tempo de 5 min o efeito da estimulação elétrica com corrente contínua sobre o *wound healing* da linhagem celular C2C12, teve como resultado uma diferença significativa na proliferação celular, na comparação entre as culturas

celulares tratadas com CEC nos períodos de 24 e 48 h em relação as mesmas culturas tratadas no período inicial de 0h ( $p < 0,0001$ ), ilustrado na Figura 16.

Entretanto não foi possível verificar significância estatística na proliferação celular desta mesma linhagem quando comparados os grupos controle nos períodos de 24 e 48 h em relação ao grupo controle do período inicial de 0h no tempo de 5 minutos ( $p > 0,05$ ) e também não foi possível verificar significância estatística na proliferação celular desta linhagem quando comparados os grupos estimulados com CEC no período de 24 e 48h em relação aos grupos controle no mesmo período ( $p > 0,05$ ), conforme ilustrado na Figura 16.

Figura 16 – *Wound Healing* na linhagem celular C2C12 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de **5 min**

C: Grupo Controle; \*\*\*\*: Comparação das DC 0,1 mA/cm<sup>2</sup>, 0,2mA/cm<sup>2</sup> e 0,4mA/cm<sup>2</sup> nos períodos de 24 e 48h em relação as mesmas DCs do período inicial de 0h, respectivamente



FONTE: Próprio Autor

Quanto ao efeito da estimulação elétrica com corrente contínua sobre o *wound healing* da linhagem celular MC3T3, os resultados mostram que houve uma diferença significativa na proliferação celular, na comparação entre as culturas celulares tratadas com CEC no tempo de 2 minutos no período de 48 h em relação as mesmas culturas tratadas com CEC com o mesmo tempo no período inicial de 0h e



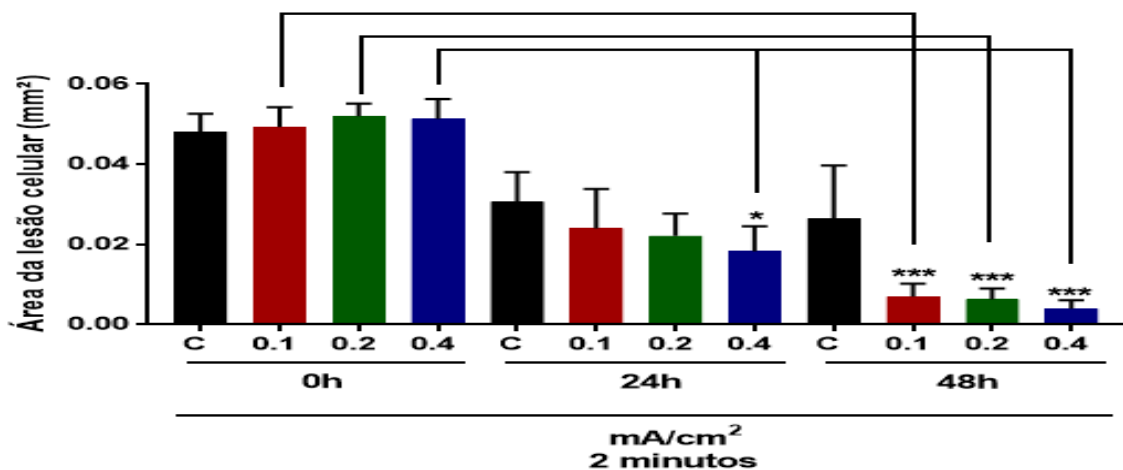
no período de 24h (**G0.1 – 2, G0.2 – 2 E G0.4 – 2** -  $p < 0,0005$ ), conforme ilustrado na Figura 17.

Foi possível verificar significância estatística na proliferação celular da linhagem MC3T3 quando comparado o grupo estimulado com CEC no tempo de 2 minutos no período de 24h, o grupo **G0.4 - 2** em relação ao mesmo grupo no período de 0h ( $p < 0,05$ ). Não foi possível verificar significância estatística na proliferação celular desta mesma linhagem quando comparados os grupos controle nos períodos de 24 e 48 h em relação ao grupo controle do período inicial de 0h no tempo de 2 minutos ( $p > 0,05$ ), conforme ilustrado na Figura 17.

Essa estimulação com a CEC de baixa intensidade nos remete a entender que a síntese de DNA celular aumenta e a orientação e migração de fibroblastos através de um campo elétrico aumenta favorecendo a reparação do tecido conhecida como galvanotaxia.

Figura 17 – *Wound Healing* na linhagem celular MC3T3 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de **2 min**

C: Grupo Controle; \*: Comparação da DC 0,4 mA/cm<sup>2</sup> no período de 24h em relação a mesma DC no período de 0h; \*\*\*: Comparação das DC 0,1 mA/cm<sup>2</sup>, 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e 0,4 mA/cm<sup>2</sup> no período de 48h em relação as mesmas DCs nos períodos de 0 e 24h, respectivamente



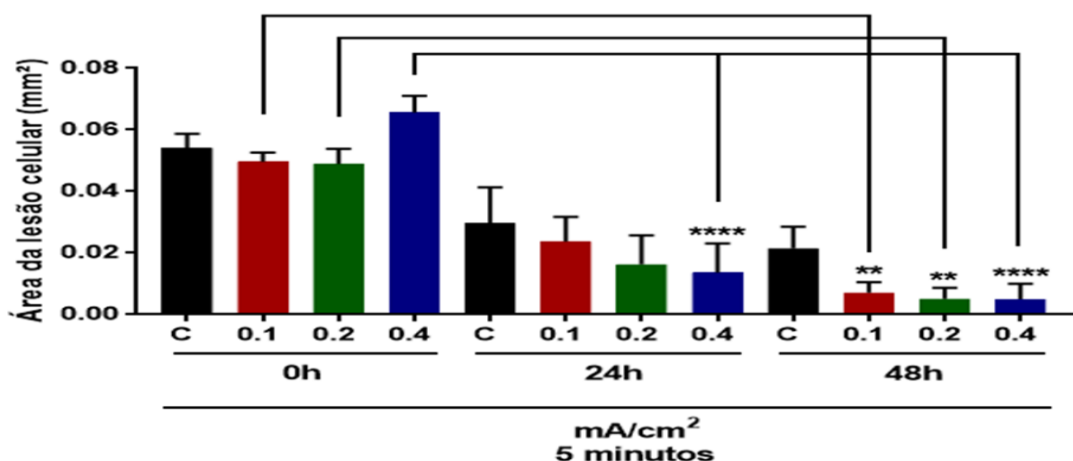
FONTE: Próprio Autor

Quanto ao efeito da estimulação elétrica com corrente contínua sobre o *wound healing* na linhagem celular MC3T3, os resultados mostram que houve uma diferença significativa na proliferação celular, na comparação entre as culturas celulares tratadas com CEC no tempo de 5 minutos nos períodos de 48 h em relação as mesmas culturas tratadas com CEC com o mesmo tempo no período inicial de 0h (**G0.1 – 5** e **G0.2 - 5** -  $p < 0,0005$  e **G0.4 – 5** –  $p < 0,05$ ) e no período de 24h (**G0.1 – 5** e **G0.2 - 5** -  $p < 0,0005$  e **G0.4 – 5** –  $p < 0,05$ ) , conforme ilustrado na Figura 18.

Não houve significância estatística na proliferação celular desta mesma linhagem quando comparados os grupos controle nos períodos de 24 e 48 h em relação ao grupo controle do período inicial de 0h no mesmo tempo ( $p > 0,05$ ), conforme ilustrado na Figura 18.

Figura 18 – *Wound Healing* na linhagem celular MC3T3 na ausência (controle) e presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de **5 min**

C: Grupo Controle; \*\*: Comparação das DCs 0,1 mA/cm<sup>2</sup> e 0,2mA/cm<sup>2</sup> no período de 48h em relação as mesmas DCs nos períodos de 0 e 24h, respectivamente; \*\*\*\*: Comparação da DC 0,4 mA/cm<sup>2</sup> nos períodos de 24 e 48h, respectivamente, em relação a mesma DC no período de 0h



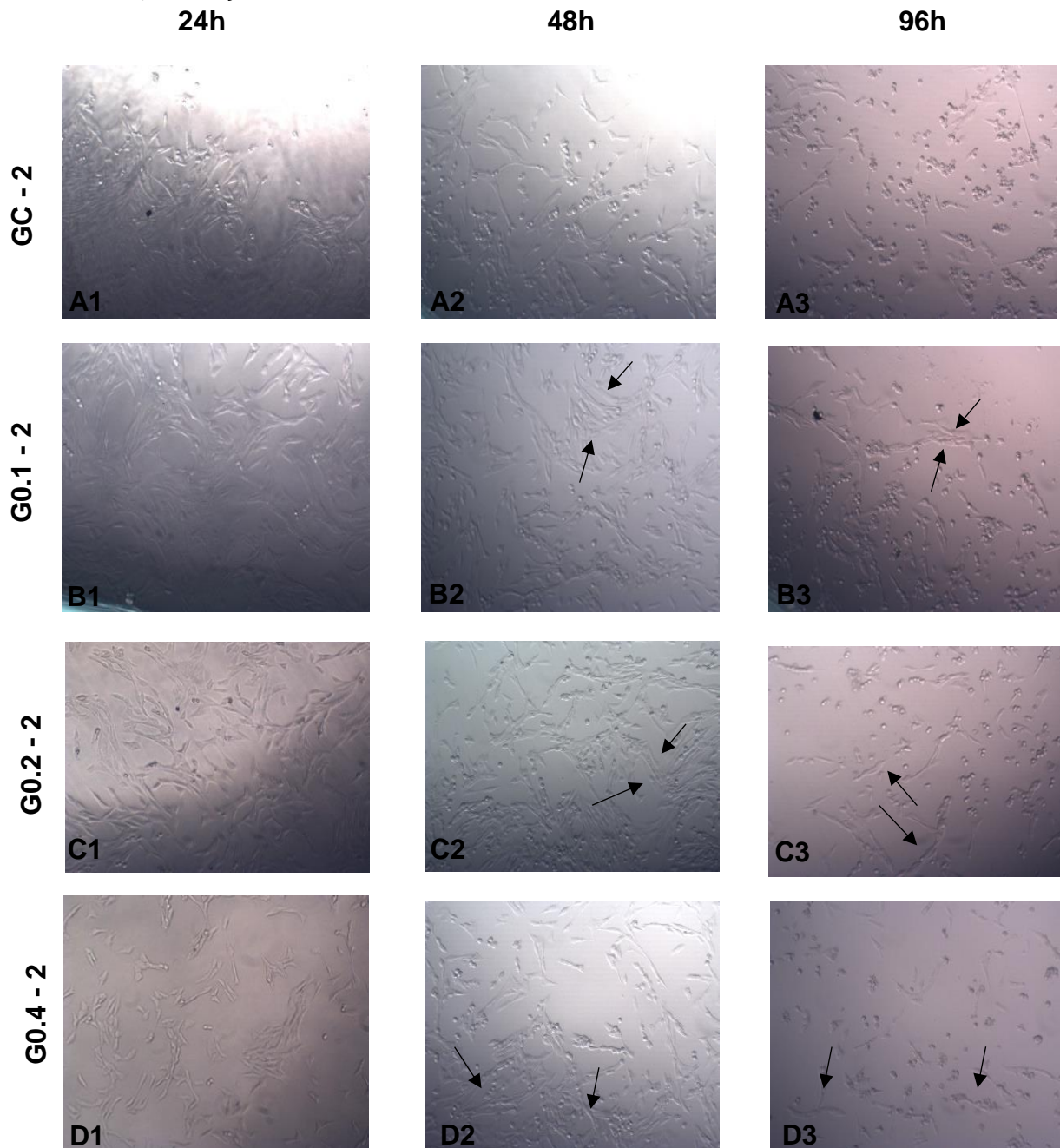
FONTE: Próprio autor

Essa migração ocorre pois as lesões do tecido carregam cargas elétricas que se movem quando uma corrente elétrica é aplicada, principalmente a CEC de baixa intensidade.

Os registros fotográficos obtidos após 24h de incubação com o meio de diferenciação e a aplicação da CEC permitiram verificar que não houve alteração na morfologia entre as células que foram submetidas a aplicação da CEC e o grupo controle. Após 48h e 96h pôde ser notado formação de células maiores e mais alongadas nos grupos tratados com CEC em comparação as células cultivadas no grupo Controle no tempo de 2 minutos, conveniente com a formação de miotubos. Não pôde ser notado uma grande quantidade de miotubos formados após a estimulação com CEC (Figura 19).

Figura 19 – Avaliação da morfologia da linhagem celular C2C12 na ausência (controle) ou presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de 2 min

GC - 2: Grupo Controle de 2 minutos representados pelas ilustrações A1, A2 e A3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.1 - 2: Grupo com DC de 0,1 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 2 minutos representados pelas ilustrações B1, B2 e B3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.2 - 2: Grupo com DC de 0,2 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 2 minutos representados pelas ilustrações C1, C2 e C3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.4 - 2: Grupo com DC de 0,4 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 2 minutos representados pelas ilustrações D1, D2 e D3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente. As setas são as indicações dos locais onde existem miotubos formados {B2, B3, C2, C3, D2 e D3}; Ilustrações modificadas

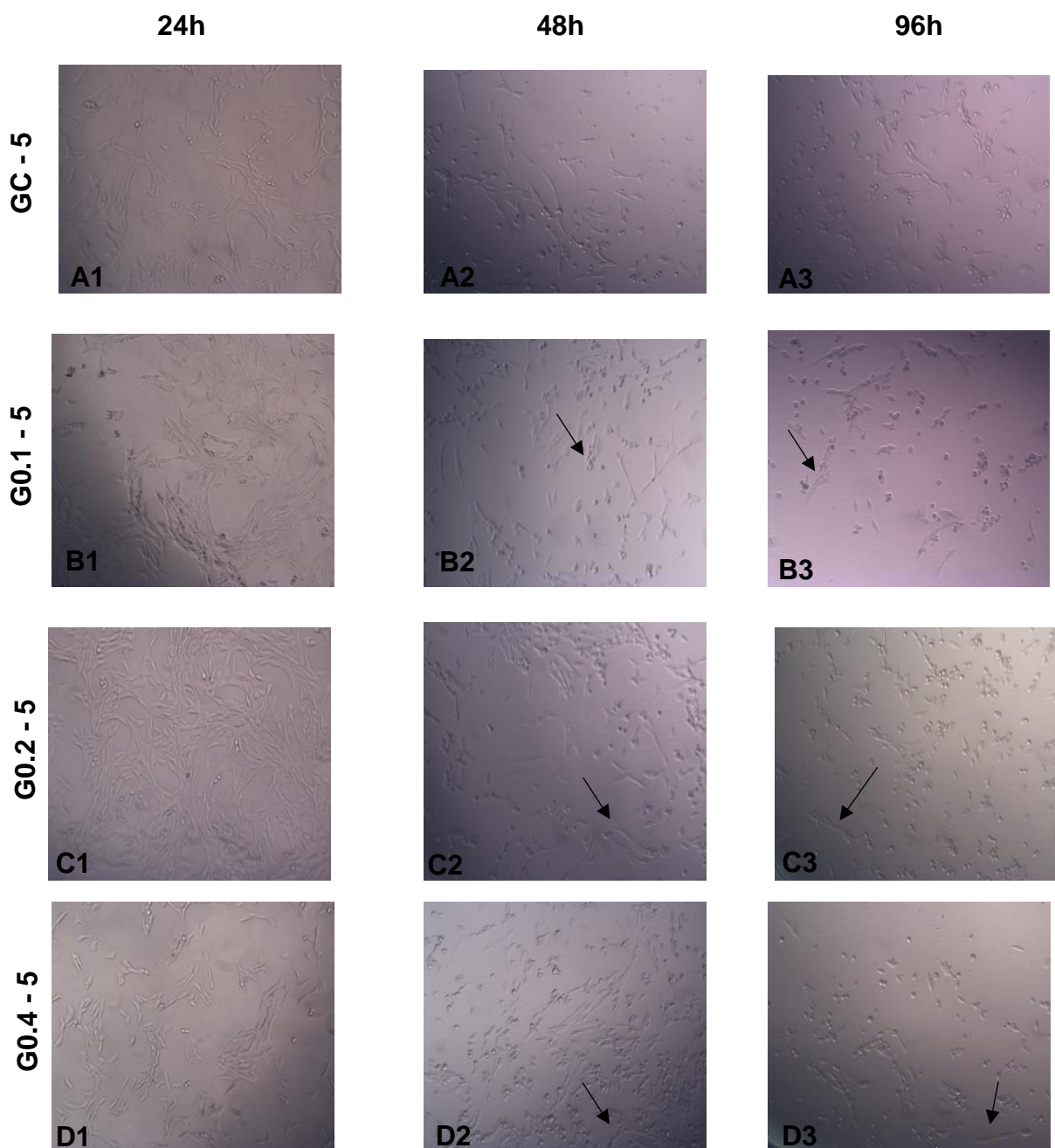


FONTE: Próprio Autor

Os registros fotográficos obtidos após 24h de incubação com o meio de diferenciação e a aplicação da CEC permitiram verificar que não houve alteração na morfologia entre as células que foram submetidas a aplicação da CEC e o grupo controle. Após 48h e 96h pôde ser notado formação de células maiores e mais alongadas nos grupos tratados com CEC em comparação as células cultivadas no grupo Controle no tempo de 5 minutos, conveniente com a formação de miotubos. Não pôde ser notado uma grande quantidade de miotubos formados após a estimulação com CEC (Figura 20).

Figura 20 – Avaliação da morfologia da linhagem celular C2C12 na ausência (controle) ou presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente no tempo de 5 min

GC - 5: Grupo Controle de 5 minutos representados pelas ilustrações A1, A2 e A3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.1 - 5: Grupo com DC de 0,1 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 5 minutos representados pelas ilustrações B1, B2 e B3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.2 - 5: Grupo com DC de 0,2 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 5 minutos representados pelas ilustrações C1, C2 e C3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente; G0.4 - 5: Grupo com DC de 0,4 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 5 minutos representados pelas ilustrações D1, D2 e D3 correspondentes a 24h, 48h e 96h respectivamente. As setas são as indicações dos locais onde existem miotubos formados {B2, B3, C2, C3, D2 e D3}; Ilustrações modificadas

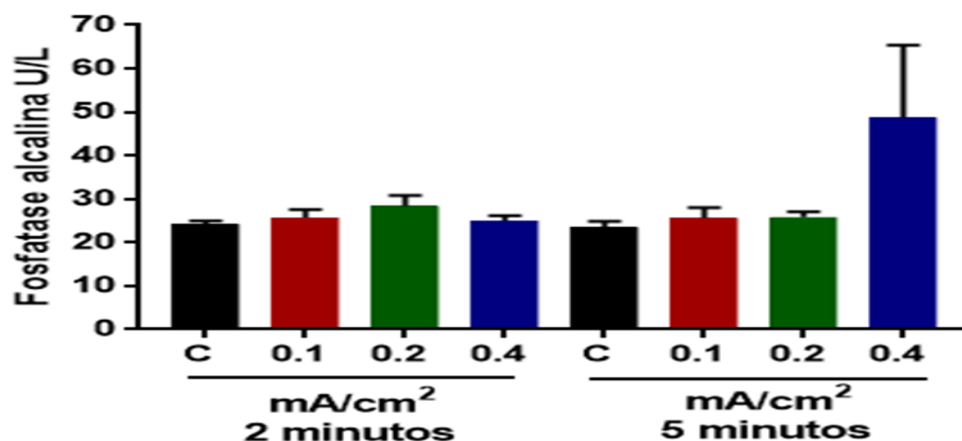


FONTE: Próprio Autor

Quanto a diferenciação por Fosfatase Alcalina da linhagem celular OSTEO-1, os resultados obtidos mostram que embora no grupo **G0.4 – 5** há um aumento significativo na quantidade de Fosfatase Alcalina em relação aos outros grupos testados e em relação ao Grupo Controle, no período de 7 dias, não houve significância estatística nesse período testado ( $p>0,999$ ), conforme ilustrado na Figura 21.

Figura 21 – Atividade da Fosfatase Alcalina na linhagem celular OSTEO-1 na ausência (controle) ou presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente nos tempos de 2 e 5 minutos no período de **7 dias**

C: Grupo Controle; DC: 0,1 mA/cm<sup>2</sup>; DC: 0,2 mA/cm<sup>2</sup>; DC: 0,4 mA/cm<sup>2</sup> nos tempos de 2 e 5 minutos

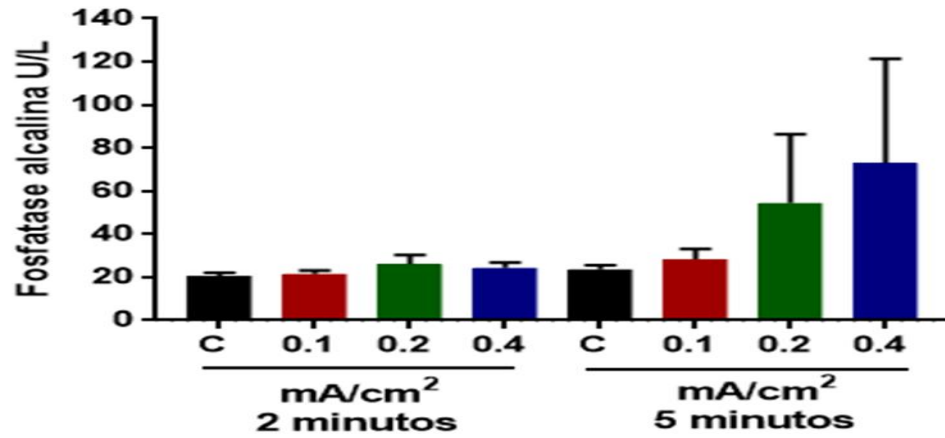


FONTE: Próprio Autor

Quanto a diferenciação por Fosfatase Alcalina da linhagem celular OSTEO-1, os resultados obtidos mostram que embora nos grupos **G0.2 – 5** e **G0.4 – 5** há um aumento significativo na quantidade de Fosfatase Alcalina em relação aos outros grupos testados e em relação ao Grupo Controle, no período de 14 dias, não houve significância estatística nesse período testado ( $p>0,999$ ), conforme ilustrado na Figura 22.

Figura 22 – Atividade da Fosfatase Alcalina na linhagem celular OSTE0-1 na ausência (controle) ou presença de tratamento com CEC utilizando diferentes densidades de corrente nos tempos de 2 e 5 minutos no período de **14 dias**

C: Grupo Controle; DC: 0,1 mA/cm<sup>2</sup>; DC: 0,2 mA/cm<sup>2</sup>; DC: 0,4 mA/cm<sup>2</sup> nos tempos de 2 e 5 minutos



FONTE: Próprio Autor



## DISCUSSÃO

O grande desafio da medicina regenerativa, destina-se a desenvolver estratégias para estimular o processo de reparo tecidual dos tecidos muscular e ósseo, buscando melhores perspectivas em relação ao restabelecimento funcional dos tecidos (FORBES, 2014). Frequentemente é proposto a utilização de recursos terapêuticos, como recursos eletrofísicos, que potencializam a interação e a estimulação de células responsáveis pelo processo de reparo, potencializando a função celular e contribuindo para uma reparação acelerada e uma melhor qualidade do novo tecido formado (HAO CHIU et al, 2017).

A corrente elétrica contínua é utilizada para o aumento da indução no processo de reparação dos tecidos muscular e ósseo. A corrente elétrica vem sendo muito utilizada nas aplicações biomédicas, e possui um destaque na reparação tecidual muscular e óssea dentro da medicina regenerativa (FERNANDES et al, 2010; JUHAS; BURSAC, 2013).

Em relação *wound healing* obtido no presente estudo, os resultados mostraram que o comportamento celular da linhagem C2C12 frente a estimulação elétrica contínua teve uma aceleração no que se refere a variável de proliferação celular, de maneira geral nos grupos tratados com corrente contínua ou não. A proliferação celular após 48h foi de quase a totalidade nos grupos estimulados com CEC com densidades de correntes baixas como também no grupo controle. Kloth e McCulloch (1996) e Thakral e colaboradores (2017) verificaram que densidades de correntes baixas influenciam a aceleração da proliferação celular. Densidades de Correntes baixas são capazes de gerar campo elétrico endógeno e favorecem a migração celular (SONG, et al, 2007). Snyder, Dejulus e Willits (2017) relataram que o tratamento de lesão muscular através da estimulação elétrica contínua por curtos períodos de tempo é capaz de alterar as funções celulares no seu reparo. Porém no presente estudo, a CEC não teve ação sobre a linhagem celular estudada.

O ensaio de viabilidade celular é frequentemente utilizado e discutido na literatura e, de acordo com Mobini e colaboradores (2017), as células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente em um produto, enquanto as células mortas não são capazes de realizar essa conversão.

No estudo realizado por Snyder, DeJulius e Willits (2017) relatou que após a estimulação elétrica com densidades de corrente variando entre 2,78 mA/cm<sup>2</sup> a 18,24 mA/cm<sup>2</sup> no tempo de 10 minutos, teve uma viabilidade celular muscular maior em comparação com o grupo não estimulado. No presente estudo os resultados mostraram que de forma geral a viabilidade celular variou com os estímulos realizados, pois houve um aumento da viabilidade celular na linhagem C2C12 frente a estimulação elétrica contínua utilizada com densidades de correntes inferiores ao estudo anterior citado, sendo 0,1 mA/cm<sup>2</sup> 0,2 mA/cm<sup>2</sup> e 0,4 mA/cm<sup>2</sup>, com uma única estimulação nos tempos de 2 e 5 minutos, indicando que o tratamento com corrente contínua foi efetivo.

A diferenciação celular consiste em processos que transformam e especializam as células e após essas transformações, sua morfologia e fisiologia são definidas, tornando-as capazes de realizar determinadas funções. No estudo realizado por Langelaan e colaboradores (2011) os miotubos foram observados em todas as culturas estimuladas eletricamente após o terceiro dia do processo de diferenciação, porém no estudo realizado por Ostrovidov e colaboradores (2017) os miotubos começaram a aparecer após o segundo dia de estimulação elétrica, porém com uma pequena diferença significativa na organização e alinhamento dos miotubos.

Os resultados do presente estudo obtidos na linhagem celular C2C12 permitiram verificar que após 24h não houve diferenciação a ponto de diminuir o número de células nos grupos estimulados com CEC em relação ao grupo Controle. Após 48h até 96h a diferença passou a ser significativa evidenciando que as células estimuladas com CEC reduziram sua proliferação, condizente com o estágio de final da diferenciação e demonstrando que a estimulação elétrica contínua pode ser favorável a formação destes miotubos, principalmente no tempo de estimulação de 5 minutos e com densidades variando entre 0,2 e 0,4 mA/cm<sup>2</sup>. Porém em 96h ainda era possível encontrar células musculares com aspecto fusiforme ou estrelado característico de células satélite indiferenciadas (ARTILHEIRO e colaboradores, 2012) mostrando a necessidade de uma nova avaliação após 96 h com os tempos e densidades de corrente estudados.

Estas características da indução realizada no tecido mostram no estudo realizado por Arruda (2010) que o campo elétrico é útil na aceleração da reparação no processo de ossificação endocondral. Segundo Fernandes e

colaboradores (2010) a estimulação elétrica proporciona uma proliferação celular, pois aumenta a concentração citoplasmática de cálcio (tanto pela abertura dos canais de cálcio como pela mobilização do cálcio contido em compartimentos intracelulares). Esse cálcio se acopla à ATP-ase, estimulando o crescimento e a reparação óssea. No presente estudo os resultados obtidos mostraram que houve um aumento na proliferação celular na linhagem MC3T3 frente a estimulação elétrica contínua teve uma aceleração no que se refere a variável de proliferação celular, de maneira geral nos grupos tratados com corrente contínua ou não. A proliferação celular após 48h foi de quase a totalidade nos grupos estimulados com CEC com densidades de correntes baixas como também no grupo controle. No estudo realizado por Mishra e colaboradores (2015) as células osteogênicas proliferaram após a estimulação elétrica. Porém no presente estudo, a CEC não teve ação sobre a linhagem celular estudada.

Quanto a viabilidade celular o presente estudo observou-se que os resultados de forma geral mostraram que a viabilidade celular variou com os estímulos realizados, houve um aumento da viabilidade celular na linhagem MC3T3 frente a estimulação elétrica contínua utilizada com densidades de correntes variando entre  $0,1 \text{ mA/cm}^2$  e  $0,4 \text{ mA/cm}^2$ , com uma única estimulação nos tempos de 2 e 5 minutos, indicando que o tratamento com a corrente contínua foi efetivo.

A atividade da enzima fosfatase alcalina também foi fator de investigação e um importante indicador, uma vez que as células pré osteoblásticas e osteoblásticas são desfosforiladas por essa enzima (MISHRA e colaboradores, 2015). O atual estudo mostrou que a atividade enzimática proposta embora na densidade de corrente de  $0,4 \text{ mA/cm}^2$  no tempo de 5 minutos teve um aumento, não houve uma importância significativa em comparação aos grupos não estimulados e frente aos outros grupos estimulados com CEC.

O presente estudo mostrou uma viabilidade maior da CEC na linhagem muscular em relação a linhagem óssea, mostrando uma maior eficácia da corrente elétrica em tecidos musculares.

Considerando uma comparação entre tempos testados neste atual estudo, foi observado que densidades de corrente não são necessárias serem altas e que independente do tempo houve uma resposta positiva aos objetivos propostos.

Novas pesquisas precisam ser realizadas para complementar os resultados alcançados, contribuindo com um desenvolvimento técnico e científico favorável a utilização da corrente elétrica contínua na medicina regenerativa muscular e óssea.

## **CONCLUSÃO**

A aplicação da CEC com as intensidades baixas a em ambas as linhagens utilizadas aumentou a viabilidade celular sendo o seu maior efeito na linhagem muscular, que também apresentou alterações na sua morfologia, sugerindo a utilização da CEC como uma forma promissora na terapia para reparação dos tecidos muscular. Sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas complementando os resultados obtidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.F., AGUIAR, D.H. Plasticity in muscular exercise. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. n.17. p.104-113. 2009.

ALMADA, A.E., WAGERS, A.J. Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.17. n.5. 2016.

ARTILHEIRO, P.P., BARBOSA, J.L.P., SOUZA, N.H.C., DA SILVA, M.T., BUSSADORI, S.K., FERANDES, K.P.S., MESQUITA FERRARI, R.A. Analysis of proliferation and morphology of C2C12 during cell differentiation. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.11. n.3. p.275-278. 2012.

ARRUDA, M.F. **Resposta imuno-bioquímica e avaliação histológica da cartilagem articular de ratos artrose induzidos, frente ao tratamento com iontoforese isolada e de ácido L-ascórbico**. Tese apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. 2010.

BAGHDADI, M.B., TAJBAKSHI, S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration. **Developmental Biology**. v.433. n.2. p.200-209. 2018.

DINULOVIC, I. FURRER, R., HANDSCHIN, C. Plasticity of the muscle stem cell microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.1041. p.141-169. 2017.

DUMONT, N.A., WANG, Y.X., RUDNICKI, M.A. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. **Development**. v.142. n.9. 2015.

EMING, S.A., MARTIN, P., TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling and translation. **Science Translational Medicine**. v.6. n.265. 2014.

FERRARI, R.J., PICCHI, L.D., BOTELHO, A.P., MINAMOTO, V. Regeneration process in the muscle injury: a review. **Fisioterapia em Movimento**. n.2. v.18. p.63-71. 2005.

FERNANDES, K.R., OLIVEIRA, P., BERTOLO, D., ANDRADE, G.N., MATSUDA, N.Y., RENNO, A.C.M. Efeitos dos recursos eletrofísicos na osteoporose: uma revisão da literatura. **Fisioterapia Movimento**. v.23. n.2. p.271-281. 2010.

FORBES, S.J. Recent advances in stem cells and regenerative medicine. **QJM: na international jornal of Medicine**. v.107. 2014.

FUNK, R.H.W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. **Frontiers in Physiology**. v.6. 2015.

GROUNDS, M.D. Therapies for sarcopenia and regeneration of old skeletal muscles – more a case of old tissue architecture than old stem cells. **BioArchitecture**. v.4. n.3. p.81-87. 2014.

HALCSIK, E. **Fosfoproteômica e proteômica quantitativa de células mesenquimais durante a diferenciação osteoblástica mediada por BMP2, expressão e purificação de diferentes tipos de proteínas morfogenéticas ósseas**. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2012.

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

JUHAS, M., BURSAC, N. Engineering skeletal muscle repair. **Current Opinion in Biotechnology**. v.24. n.5. 2013.

KERCHER, D.L., DA COSTA, D., SONEGO, M.S., CANEDO, A.D. A influência das fosfatases alcalinas na diferenciação óssea de células tronco mesenquimais tratadas com dexametasona. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. v.4. n.2. 2012.

KOHLI, N., HO, S., BROWN, S.J., SAWADKAR, P., SHARMA, V., SNOW, M., GARETA, E.G. Bone remodelling in vitro: where are we headed? – a review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. **Bone**. v.110. p.38-46. 2018.

KONERDING, W.S., JANSSEN, H., HUBKA, P., TORNOE, J., MISTRİK, P., WAHLBERG, L., LENARZ, T., KRAL, A., SCHEPER, V. Encapsulated cell device approach for combined electrical stimulation and neurotrophic treatment of the deaf cochlea. **Hearing Research**. v.350. p.110-121. 2017.

LANGELAAN, M.L.P., BOONEN, K.J.M., CHAK, K.Y.R., SCHAFT, D.W.J.V.D., POST, M.J., BAAIJENS, F.P.T. Advanced maturation by electrical stimulation: Differences in response between C2C12 and primary muscle progenitor cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. v.5. p.529-539. 2011.

LI, J., TAN, J., MARTINO, M.M., LUI, K.O. Regulatory t-cells: potential regulator of tissue repair and regeneration. **Frontiers in immunology**. v.9. p.1-11. 2018.



LOI, F., CÓRDOVA, L.A., PAJARINEN, J., LIN, T.H., YAO, Z., GOODMAN, S.B. Inflammation, fracture and bone repair. **Bone**. v.86. p.119-130. 2016.

MAO, A.S., MONEY, D.J. Regenerative medicine: current therapies and future directions. **PNAS**. v.112. n.47. 2015.

MCCULLAGH, K.J.A., PERLINGEIRO, R.C.R. Coaxing stem cells for skeletal muscle repair. **Adv. Drug. Deliv. Rev.** v.84. p.198-207. 2015.

MISHRA, R., RAINA, D.B., PELKONEN, M., LIDGREN, L., TAGIL, M., KUMAR, A. Study of in vitro and in vivo bone formation in composite cryogels and the influence of electrical stimulation. **International Journal of Biological Sciences**. v.11. n.11. p.1325-1336. 2015.

MOBINI, S. LEPPIK, L., PARAMESWARAN, V.T., BARKER, J.H. In vitro effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells. **PeerJ**. v.5. p.1-15. 2017.

MOBINI, S., LEPPIK, L., BARKER, J.H. Direct current electrical stimulation chamber for treating cells in vitro. **BioTechniques**. 2016.

MODARRESI, J., AGHILI, H., KARANDISH, M., JALALI, B., ZAHIR, S.T. Effect of direct electric current on parietal bone osteogenesis. **The Journal of Craniofacial Surgery**. v.23. n.6. 2012.

NGUYEN, N.U.N., LIANG, V.R., WANG, H.V. Actin-associated protein palladin is required for migration behavior and differentiation potential of C2C12 myoblast cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. n.452. p.728-733. 2014.

NIKOLIC, N., GORGENS, S.W., THORESEN, G.H., AAS, V., ECKEL, J., ECKKARDT, K. Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for in vitro exercise – possibilities and limitations. **Acta Physiologica**. n.220. p.310-331. 2017.

OSTROVIDOV, S., AHADIAN, S., RAMON-AZCON, J., HOSSEINI, V., FUJIE, T., PARTHIBAN, S.P., SHIKU, H., MATSUE, T., KAJI, H., RAMALINGAM, M., BAE, H., KHADEMHOSEIRI, A. Three dimensional co-culture of C2C12/PC12 cells improves skeletal muscle tissue formation and function. **Journal of Tissue and Regenerative Medicine**. n.11. p.582-595. 2017.

POLTAWSKI, L., WATSON, T. Bioelectricity and microcurrent therapy for tissue healing – a narrative review. **Physical Therapy Reviews**. n.14. p.104-114. 2009.

RAMADAN, A., ELSAIDY, M., ZYADA, R. Effect of low-intensity direct current on the healing of chronic wounds: a literature review. **J. Wound Care**. n.17. p.292-296. 2008.

SNYDER, S., DEJULIUS, C., WILLITS, R.K. Electrical stimulation random migration of human dermal fibroblasts. **Annals of Biomedical Engineering**. v.45. n.9. p. 2049-2060. 2017.

SONG, B., GU, Y., PU, J., REID, B., ZHAO, Z., ZHAO, M. Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo. **Nature Protocols**. v.2. n.6. 2007.

STEGEN, S., GASTEL, N.V., CARMELIET, G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. **Bone**. 2014.

TAI, G., TAI, M., ZHAO, M. Electrically stimulated cell migration and its contribution to wound healing. **Burns & Trauma**. v.6. n.20. 2018.

THAKRAL, G., LAFONTAINE, J., NAJAFI, B., TALAL, T.K., KIM, P., LAVERY, L.A. Electrical stimulation to accelerate wound healing. **Diabetic Foot & Ankle**. v.4. 2013.

TIDBALL, J.G. Inflammatory process in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v.288. n.2. p.345-353. 2005.

UD DIN, S., BAYAT, A. Non animal models of wound healing in cutaneous repair: in silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair and Regeneration**. v.25. p.164-176. 2017.

WANG, Y., CUI, H., WU, Z., WU, N., WANG, Z., CHEN, X., WEI, Y., ZHANG, P. Modulation of osteogenesis in MC3T3-E1 cells by different frequency electrical stimulation. **Plos One**. p. 1-14. 2016.