



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA APARECIDA DE LIMA BERGAMI

**INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
CARDIOMIÓCITOS**

VITÓRIA, ES

2022

AMANDA APARECIDA DE LIMA BERGAMI

**INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
CARDIOMIÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

B493i Bergami, Amanda Aparecida de Lima, 1997-
Influência da fibronectina sobre a proliferação de
cardiomiócitos / Amanda Aparecida de Lima Bergami. - 2022.
70 f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Bioengenharia. 2. Cultura de células. 3. Coração. 4.
Proliferação. 5. Estudos de viabilidade. 6. Doação de órgãos,
tecidos, etc. I. Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III.
Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 206ª sessão de Defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **AMANDA APARECIDA DE LIMA BERGAMI**, realizada às 14:00h do dia vinte e seis de agosto do ano dois mil e vinte e dois, por meio de videoconferência, conforme inciso 7º do Art. 50 Regulamento Geral da Pós-Graduação da UFES, aprovado na Resolução N° 3-CEPE, de 28 de janeiro de 2022. O presidente da Banca, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Profª. Drª. Regina Coeli dos Santos Goldenberg, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como titular externo; Profª. Drª. Flávia Imbroisi Valle Errera, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular interno. Em seguida, cedeu a palavra à candidata que em 40 (quarenta) minutos apresentou sua Dissertação intitulada **“INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CARDIOMIÓCITOS”**. Terminada a apresentação, o presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Após a arguição, o presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e o presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido aprovada e que a aluna deve providenciar dentro do período de 60 dias, a versão final da Dissertação. O Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e eu, Adriana Madeira Álvares da Silva, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFES, lavrei a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 26 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profª. Drª. Flavia Imbroisi Valle Errera
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular interno

Profª. Drª. Regina Coeli dos Santos Goldenberg
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Titular Externo





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 26/08/2022 às 22:53

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/550091?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
FLAVIA IMBROISI VALLE - SIAPE 2305782
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 30/08/2022 às 11:37

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/551591?tipoArquivo=O>

AMANDA APARECIDA DE LIMA BERGAMI

**INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE
CARDIOMIÓCITOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

Instituição UFES

Orientador

Prof. Dr. Flávia Imbroisi Valle Errera

Instituição UFES

Membro interno

Prof. Dr. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Instituição UFRJ

Membro externo

VITÓRIA, ES

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, que sempre me oferecem o melhor apoio, eles são meu porto seguro que posso contar sempre e que tem sido a base de todas as minhas conquistas. Dedico ao meu noivo que sempre esteve presente, me auxiliando, dando conselhos, me dando forças para enfrentar os desafios, fazendo os meus dias mais felizes. Dedico também aos meus amigos, que escutaram todos os desabafos e torceram para que tudo desse certo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todos os momentos me sustentou e fortaleceu para chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Eduardo e Lília, que não mediram esforços para me ajudar e apoiar. Sempre dispostos, presentes e amorosos. Sou eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim, não sei se serei capaz de retribuir todo esse amor e cuidado.

Agradeço às minhas avós, Ladir e Lourdes, minha tia, Liziene, e meu irmão, Lucas. Exemplos de força e determinação, que sempre me motivam e impulsionam. Agradeço ao meu avô José Nestor, já falecido, que tenho a certeza que sempre cuida de mim, e sempre foi exemplo de bondade e honestidade.

Agradeço ao meu noivo, Gustavo, que permaneceu ao meu lado, incentivando e cuidando para que eu chegasse até o final, pegando no meu pé para não procrastinar e por me fazer especial. Agradeço aos meus amigos por serem presentes e serem sinal de esperança.

Agradeço ao prof. Breno por todo conhecimento e auxílio nessa etapa, por ter me orientado na construção desse trabalho.

Agradeço aos professores Dr. Jairo Pinto de Oliveira, Dr. Thiago de Melo Costa Pereira, Dr. Patrícia Machado Bueno Fernandes, Dr. Marcus Vinícius Vaughan Jennings Licínio, Dr. Adilson Ribeiro Prado e aos laboratórios LABIOM, LHMI, Biotério Central que disponibilizaram reagentes e equipamentos para realização dos experimentos.

Agradeço aos colegas de laboratório que foram peças-chaves, que incentivaram discussões e melhorias nos experimentos, compartilharam experiências e ajudaram nas dificuldades. Em especial agradeço ao Affonso que foi um amigo que me ajudou não só no laboratório, mas na estadia em Vitória. À Luizinha, que foi minha anja da guarda. Ao Tadeu que com várias conversas clareou muitos experimentos. À Mileni

que ajudou no treinamento de cultura celular. Às IC's Melinda e Júlia Faria que me proporcionaram a oportunidade de participar dos seus projetos e aprender ainda mais. Ao Marcos sempre salvando quando não podia cuidar dos animais. E vários outros que com certeza tem contribuição nesse trabalho: Raquel, Gabriel, Flávio, Brunão, Wanderson, Laryssa, Thaís, Rayssa, Fernanda, Caio, Marcos IC.

Agradeço a UFES e ao PPG em Biotecnologia pela oportunidade de realizar essa pós-graduação de forma gratuita, pela estrutura e possibilidade de crescimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio na compra de reagentes e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa de mestrado (nº 086/2020; EDITAL FAPES Nº 14/2019 - PROCAP 2020).

EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.” (Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

BERGAMI, A. A. de L. **Influência da fibronectina sobre a proliferação de cardiomiócitos**. 2022. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em todo o mundo e a Bioengenharia de Tecidos é uma alternativa promissora para tratamento, sendo os *scaffolds*, células e fatores de crescimento os três fatores que compõem esta área. No geral, os *scaffolds* devem auxiliar na adesão, proliferação, diferenciação e maturação celular, atuando de modo análogo à matriz extracelular nativa. A fibronectina é uma das proteínas mais importantes na constituição da matriz extracelular e contribui significativamente para a manutenção celular. O grupo de pesquisa em que esse trabalho está inserido tem o intuito de avaliar a recelularização do coração descelularizado a partir do enriquecimento com fibronectina. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da fibronectina na proliferação celular de cardiomiócitos *in vitro* a partir da análise da proliferação e viabilidade de (i) cardiomiócitos da linhagem H9c2, (ii) cardiomiócitos isolados de corações de camundongos *Swiss* adultos e (iii) neonatais. Os resultados mostraram que a presença de fibronectina não influenciou na viabilidade e proliferação celular. A partir disto, novas proteínas devem ser analisadas para este fim, como colágeno, laminina, periostina e vitronectina.

Palavras-chave: Bioengenharia de tecidos. Coração. Cardiomiócitos. Fibronectina. Proliferação. Hidrogel.

INFLUENCE OF FIBRONECTIN IN CARDIOMYOCYTE PROLIFERATION

ABSTRACT

BERGAMI, A. A. de L. **Influence of fibronectin in cardiomyocyte proliferation.** 2022. 68f. Dissertation (Master in Biotechnology) – Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Cardiovascular diseases are among the leading cause of death worldwide and Tissue engineering is a promising alternative for treatment, with scaffolds, cells and growth factors being the three factors that make up this area. Generally, scaffolds assist in cell adhesion, proliferation, differentiation and maturation, acting in a similar way to the native extracellular matrix. Fibronectin is one of the most important proteins constituted in the extracellular matrix and contributes significantly to cellular maintenance. The research group in which this work is inserted aims to evaluate the recellularization of the decellularized heart from the enrichment with fibronectin. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of fibronectin on the cell proliferation of cardiomyocytes in vitro, by analyzing the proliferation and viability of (i) cardiomyocytes of the H9c2 lineage, (ii) cardiomyocytes isolated from the hearts of adult Swiss mice and (iii) neonates. The results showed that the presence of fibronectin did not influence cell viability and proliferation. From this, new proteins must be analyzed for this purpose, such as collagen, laminin, periostin and vitronectin.

Key words: Tissue engineering. Heart. Cardiomyocytes. Fibronectin. Proliferation. Hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação do sistema de descclularização do coração. Em a) a representação esquemática e em b) a imagem real do sistema no interior da cabine de fluxo laminar. 38
- Figura 2. Fotos demonstrando o aspecto do hidrogel. Em a) o pó após os corações serem moídos e liofilizados. Em b) logo após a adição do pó, mais pepsina e HCl. 40
- Figura 3. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de cardiomiócitos adultos de cultura primária após três e cinco dias. Valores representados pela média \pm EPM. n = três/grupo. Os grupos controles não diferiram dos grupos enriquecidos com FN. 48
- Figura 4. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de cardiomiócitos neonatais de cultura primária após três, cinco, dez e 15 dias. Em a) enriquecimento por FNc e em b) enriquecimento por FNs. Valores representados pela média \pm EPM. Números acima da barra indicam tamanho da amostra. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). 50
- Figura 5: Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) da linhagem H9c2 analisada nas duas formas de enriquecimento (FNc e FNs). Em a) após três, cinco e dez dias para concentração 5×10^3 células/mL e em b) após três, cinco, dez e 15 dias para concentração 1×10^4 células/mL. Valores representados pela média \pm EPM. Números acima da barra indicam tamanho da amostra. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$). 51
- Figura 6. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de hepatócitos após quatro dias na concentração de 1×10^5 células/mL. Valores representados pela média \pm EPM. n = quatro/grupo. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$). 53
- Figura 7. Fotomicrografia após 5 dias em cultura das células extraídas de corações neonatais. Citoplasmas marcados em verde, núcleos marcados em azul e núcleos de células inviáveis marcados em vermelho. Escala da barra = 100 μ m. Legenda: a) b) e c) correspondem ao C+ = controle positivo (meio+células); d) e) e f) correspondem ao FNs..... 54
- Figura 8. Fotomicrografia após 5 dias em cultura das células linhagem H9c2. Citoplasmas marcados em verde, núcleos marcados em azul e núcleos de células inviáveis marcados em vermelho. Escala da barra = 100 μ m. Legenda: a) b) e c) correspondem ao C+ = controle positivo (meio+células); d) e) e f) correspondem ao FNc; g) h) e i) correspondem ao FNs; j) k) e l) correspondem ao C-: controle negativo adição de etanol para matar as células. 55
- Figura 9. Médias do percentual de células vivas/campo nos diferentes grupos. Valores representados pela média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos; n = quatro/grupo. 56

Figura 10. Fotomicrografias de cardiomiócitos adultos. Em a) logo após o isolamento e em b) após 11 dias em cultura, ambas obtidas em microscópio invertido (Microscópio Zeiss Axio Observer) magnificação de 400x. Já c) e d) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala: em c) igual a 50 μm e em d) igual a 100 μm 57

Figura 11. Fotomicrografias de cardiomiócitos neonatais. Em a) após um dia do isolamento e em b) após 3 dias, ambas obtidas pelo Microscópio Zeiss Axio Observer com aumento de 200x. Já c) e d) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura após 5 dias em cultura. Em c) são cardiomiócitos do grupo controle, cultivado apenas com meio e em d) grupo enriquecido com FNs. Barra de escala: em c) e d) igual a 100 μm 58

Figura 12. Fotomicrografias de cardiomiócitos da linhagem H9c2. Em a) são cardiomiócitos do grupo controle e em b) grupo enriquecido com FNs, ambas obtidas pelo Microscópio Zeiss Axio Observer com magnificação de 200x após 5 dias em cultura. Já c) e d) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala: em c) igual a 50 μm e em d) igual a 100 μm 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
AA	Ácido acético
HCl	Ácido clorídrico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGTA	ácido etileno glicol bis(B-amino etilenoéter
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PLGA	Ácido poliglicólico polilático
BSA	Albumina sérica bovina
ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
CEUA	Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo
NS	Diferença não significativa
CO ₂	Dióxido de carbono
SDS	Dodecilsulfato de sódio
Em	Emissão
EPM	Erro padrão médio
Ex	Excitação
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
FN	Fibronectina
FNc	Fibronectina <i>coating</i>
FNs	Fibronectina solúvel
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico

GAG	Glicosaminoglicanos
g	Gramas
°C	Graus Celsius
NaOH	Hidróxido de sódio
h	Horas
LHMI	Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica
LABIOM	Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares
LUCCAR	Laboratório Multiusuário de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins
MEC	Matriz extracelular
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
µL	Microlitros
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg/mL	Miligramas por mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
mM	Milimolar
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PLA	Poliácido láctico
PGA	Poliglicólico
kHz	Quilohertz
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
PBS	Tampão fosfato de sódio
UI/mL	Unidade internacional de enzima por mililitro
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1	BIOENGENHARIA DE TECIDOS	22
2.1.1	Biomateriais e <i>Scaffolds</i>	23
2.1.2	Descelularização	24
2.2	O CORAÇÃO	27
2.2.1	Cardiomiócitos	31
2.2.2	Matriz extracelular (MEC)	33
2.2.3	Fibronectina (FN)	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	ANIMAIS	37
4.2	DESCELULARIZAÇÃO DOS ÓRGÃOS	38
4.3	PRODUÇÃO DO HIDROGEL	39
4.4	ISOLAMENTO CELULAR	40
4.4.1	Cardiomiócitos adultos	40
4.4.2	Cardiomiócitos neonatais	42
4.4.3	Hepatócitos adultos	43
4.5	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	44
4.5.1	Enriquecimento da cultura celular com fibronectina	44
4.6	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	45
4.7	AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	46
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	48
5.2	VIABILIDADE DOS CARDIOMIÓCITOS	53
5.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CARDIOMIÓCITOS	56
5.4	PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS	59
6	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A	68

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de morte em todo o mundo (OGLE et al., 2016; PAEZ-MAYORGA et al., 2019). Em 2019, foram estimadas 17,9 milhões de mortes no mundo causadas por doenças cardiovasculares, representando 32% de todas as mortes globais (WHO, 2021). O coração é altamente ligado à sobrevivência, algumas das doenças que mais acometem esse órgão são pressão alta, insuficiência cardíaca, infarto, arritmia, cardiopatia congênita, acidente vascular encefálico, angina e miocardite (BRASIL, 2021).

O transplante cardíaco constitui um tratamento definitivo, mas é indicado apenas quando há insuficiência cardíaca irreversível e outros tratamentos não fizeram efeito (BRASIL, 2020). No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), a necessidade anual estimada de transplantes de coração são 1681, sendo que em 2021 o total de transplantes realizados foram 334 (RBT, 2020). Esses números deixam clara a carência de órgãos.

Uma solução para diminuir essa escassez é a Bioengenharia de Tecidos, uma ciência interdisciplinar que surgiu para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm e/ou melhoram as funções teciduais diminuídas (LANGER; VACANTI, 1993). Três fatores compõem a base principal da Bioengenharia de Tecidos, sendo elas o *scaffold*, células e fatores de crescimento (PEREIRA et al., 2011; TOLLEMAR et al., 2016).

O *scaffold* deve auxiliar na adesão, proliferação, diferenciação e maturação celular, atuando de modo análogo à matriz extracelular (MEC) nativa (BAČÁKOVÁ; NOVOTNÁ; PAŘÍZEK, 2014). Então, quanto mais próximo o *scaffold* for do ambiente nativo melhor. Os *scaffolds* produzidos pelo nosso grupo de pesquisa são obtidos por meio da descelularização por perfusão.

Essa metodologia consiste na remoção das células, permanecendo os principais componentes da MEC nativa (LIAO et al., 2020), mas mesmo com todo cuidado alguns elementos da MEC são removidos, o que pode dificultar o processo de recelularização

desse *scaffold*. Para isso, procuram-se formas de enriquecimento que possam favorecer a recelularização, facilitando processos de adesão, proliferação e diferenciação celular.

O coração é formado por vários tipos celulares, entre eles os cardiomiócitos, células vitais para o seu funcionamento. Os cardiomiócitos de mamíferos param de proliferar e saem do ciclo celular após o nascimento e esse ponto recebe grande atenção, pois ao entender os mecanismos envolvidos cria-se a possibilidade de manipulação para que retornem ao ciclo celular (PAYAN; HUBERT; ROCHAIS, 2020).

Estudos sobre os mecanismos de regulação do processo de regeneração cardíaca indicam que a regulação da capacidade de proliferação dos cardiomiócitos é o evento primordial para se controlar a regeneração cardíaca. Por isso, o foco é estimular o potencial proliferativo dessas células e tentar mimetizar o que ocorre naturalmente (ALI; BRAGA; GIACCA, 2020).

Um fator que exerce influência sobre o comportamento dos cardiomiócitos é a MEC. Ozcebe e colaboradores (2021) mostraram que a idade da MEC influencia a capacidade proliferativa, a maturidade e a resposta ao estresse de cardiomiócitos jovens e envelhecidos. A entrega de MEC jovem a um coração envelhecido tem o potencial de induzir a regeneração, assim como a entrega de um conjugado de células jovens e MEC adulta mostrou potencial em melhorar a função cardíaca.

Visto isso, uma estratégia pode ser utilizar o tecido cardíaco descelularizado digerido em géis, funcionando como *scaffold* injetável (LANZA et al., 2020). Williams e colaboradores (2014) mostraram que a MEC cardíaca fetal e neonatal de ratos tem a fibronectina (FN) como componente mais abundante, enquanto na adulta tem o colágeno tipo I. E já foi observado em corações de camundongos neonatais capacidade de regeneração, embora seja restrita à primeira semana após o nascimento (HESSE; WELZ; FLEISCHMANN, 2018).

A FN promove processos como migração, adesão e proliferação celular e influencia na deposição de colágeno, já que é uma glicoproteína adesiva, permitindo a fixação de outros componentes da MEC (KLIMEK; GINALSKA, 2020). Com isso, escolheu-se avaliar a influência da FN sobre a proliferação de cardiomiócitos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A Bioengenharia de Tecidos é uma ciência interdisciplinar que surgiu para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm e/ou melhoram as funções teciduais diminuídas (LANGER; VACANTI, 1993). Ela pode ser empregada em áreas como terapia gênica, terapia medicamentosa e transplante de órgãos, além de possibilitar, por exemplo, o controle de processos de reparo e cura de tecidos, substituir células que estão ausentes e produzir novos modelos para o estudo da fisiologia humana (SALTZMAN, 2004).

Três fatores compõem a base principal da Bioengenharia de Tecidos, sendo eles: o *scaffold*, células e fatores de crescimento. O *scaffold* tem a função de suporte, propiciando um ambiente favorável para as células, que formam novos tecidos. E os fatores de crescimento facilitam e promovem a regeneração (IKADA, 2006; PEREIRA et al., 2011; TOLLEMAR et al., 2016).

Nos últimos anos, os estudos tem abordado teste de medicamentos, modelagem de doenças e medicina de precisão, inspirados pelo desenvolvimento das células pluripotentes induzidas, edição gênica, além de envolver estruturas como organoides, *organ-on-a-chips* ou *body-on-a-chip* e modelos para estudo do câncer (LANZA et al., 2020; WOBMA; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2016).

Outra aplicação com destaque é a fabricação de órgãos inteiros em laboratório, utilizando bioimpressão ou processo de descelularização, mas que ainda enfrentam muitos desafios, como proporcionar vascularização, ter um grande número de células e otimizar o tempo de produção e custo (SHAFIEE; ATALA, 2017). O avanço da Bioengenharia de Tecidos também tem sido muito beneficiado pelo desenvolvimento de biorreatores, já que simulam um ambiente muito próximo ao *in vivo*, e fornecem o controle da aplicação de forças mecânicas, estimulação elétrica, indução de diferenciação celular (LANZA et al., 2020).

Em relação aos negócios, em 2018 nos Estados Unidos, 49 empresas operavam nessa área e 66 ensaios clínicos já tinham sido realizados ou estavam em andamento durante os sete anos anteriores a 2018. Um campo com visível crescimento nas últimas duas décadas e com perspectiva de avanços no mercado terapêutico (KIM et al., 2019).

2.1.1 Biomateriais e *Scaffolds*

Os biomateriais são substâncias capazes de interagir com sistemas biológicos, podendo ser obtidos de materiais naturais ou sintéticos e são muito utilizados para assistência médica (BHASKAR et al., 2021). Os biomateriais naturais mais utilizados são celulose, quitina, quitosana, alginato, dextrana, glicosaminoglicanos (GAG), colágeno, gelatina, elastina, fibrinogênio, laminina, seda e MEC descelularizada (ULLAH; CHEN, 2020).

Já em relação aos biomateriais sintéticos, os poliésteres alifáticos são os mais utilizados, como poliácido láctico (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poliglicólico (PGA) e seu copolímero ácido poliglicólico polilático (PLGA) (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019). Os biomateriais naturais têm boa biocompatibilidade, mas em relação às propriedades mecânicas são instáveis. O que não acontece com os biomateriais sintéticos, que possibilitam um bom controle das propriedades mecânicas e, só que são inativos biologicamente (ULLAH; CHEN, 2020).

Para obter um biomaterial ideal devem ser consideradas sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, propriedades estruturais, porosidade (BHASKAR et al., 2021), facilidade de fabricação e estabilidade em condições fisiológicas (KHANG, 2017).

Uma das aplicações dos biomateriais é como *scaffolds*, servindo como um suporte temporário para orientar o crescimento das células. Para isso deve permitir a difusão livre de nutrientes, ser biocompatível, não tóxico, possuir resistência mecânica (COHEN et al., 1993; HUSSEIN et al., 2016), ser biodegradável, promovendo a ligação célula-biomaterial e a proliferação celular (BHASKAR et al., 2021).

Os *scaffolds* podem ser compostos por metais, biocerâmicas, polímeros ou uma associação entre eles, chamados de compósitos. Os polímeros se destacam pela possibilidade de controle da biodegradabilidade e processabilidade, alta porosidade e relação superfície-volume, bem como tamanho de poro pequeno (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; PINA et al., 2019).

As MEC's de tecido acelular são outra opção para produção de *scaffolds*. A metodologia consiste na descelularização de tecidos ou órgãos, no qual as células são removidas, permanecendo os principais componentes da MEC nativa (LIAO et al., 2020). Com isso, apresentam estrutura e composição muito similar ao tecido nativo (LEE; YOO; ATALA, 2018).

2.1.2 Descelularização

A obtenção dos *scaffolds* de MEC ocorre por meio da remoção de todas as células, sendo o processo denominado descelularização. Para ser bem sucedida deve ser considerada a preservação da composição e estrutura da MEC, além de garantir a remoção de todos componentes antigênicos para evitar respostas imunes (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). As várias etapas de processamento visam destruição da membrana celular, dissolução de componentes celulares e remoção de materiais de ácido nucléico que resultam na alteração da coloração do tecido para translúcida (GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018).

A remoção das células pode ser feita de forma química, física ou enzimática. Os tratamentos físicos utilizam imersão e agitação, sonicação, gradiente de pressão, congelamento e descongelamento, entre outros. Os tratamentos químicos fazem uso de soluções iônicas e detergentes. E, por último, o tratamento enzimático engloba o uso de enzimas como nucleases, tripsina, colagenase e lipase (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Sobre os tratamentos físicos, a imersão e agitação proporcionam grande contato entre as células e o agente de descelularização. Parâmetros como tempo de imersão e intensidade de agitação devem ser ajustados e a turbulência pode ser gerada por

barra magnética, ultrassom ou câmara rotativa. A sonicação utiliza ondas ultrassônicas em frequências acima de 20 quilohertz (kHz), pois quanto menor o valor, maior o dano das ondas (RABBANI; ZAKIAN; ALIMORADI, 2021).

A utilização de um gradiente de pressão é muito útil em combinação com o tratamento enzimático, pois facilita a permeação das enzimas no tecido. Além de reduzir o tempo de processamento e possibilitar o uso de agentes químicos menos agressivos. O congelamento e descongelamento ou choque térmico consiste em ciclos de variação de temperatura, que variam entre a faixa de -80°C e 37°C . Além desses tratamentos é possível usar abrasão mecânica e pressão hidrostática, eletroporação, vácuo, fluido supercrítico e perfusão (RABBANI; ZAKIAN; ALIMORADI, 2021).

O método de perfusão atrai grande atenção já que proporciona uma descellularização adequada em órgãos inteiros e mantém o tecido vascularizado. O princípio dessa técnica é canular o órgão, aplicando uma pressão de perfusão fisiológica com auxílio de uma bomba. Em relação à direção do fluxo, esta pode ocorrer de forma anterógrada ou retrógrada. O resultado é um *scaffold* com a ultraestrutura 3D bem similar à nativa e microambiente apropriado (GUPTA; MISHRA; DHASMANA, 2017).

Sobre os tratamentos químicos podem ser utilizados ácidos, bases, solventes orgânicos, soluções hipertônicas, hipotônicas e detergentes. Os ácidos mais utilizados são o ácido acético (AA) e ácido peracético e entre as bases estão o hidróxido de cálcio e de sódio. Como solventes orgânicos são usados álcoois, acetona e tributil fosfato. Em relação aos detergentes, eles podem ser iônicos, não iônicos ou zwitteriônicos, que são as moléculas que possuem cargas locais, mas são globalmente neutras (GUPTA; MISHRA; DHASMANA, 2017; GURUSWAMY DAMODARAN; VERMETTE, 2018; SOMUNCU, 2019).

Um detergente amplamente utilizado é o dodecilsulfato de sódio (SDS), iônico e capaz de remover maioria das células, mas exige uma série de enxágues extras de outras soluções, devido sua dificuldade em ser removido. Para as lavagens são utilizados o tampão fosfato de sódio (PBS) e o Triton. Esse último também é um detergente, mas não iônico, que também pode ser utilizado como agente de descellularização (SOMUNCU, 2019).

Em relação aos tratamentos enzimáticos, a enzima mais utilizada é a tripsina juntamente com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Elas podem ser empregadas para eliminar ácidos nucleicos restantes ou eliminar células inteiras, processo que dura em torno de 24 horas (SOMUNCU, 2019). A maioria dos tratamentos citados sozinhos não são suficientes para uma descclularização eficaz, então geralmente se faz uma combinação de tratamentos (RABBANI; ZAKIAN; ALIMORADI, 2021).

Outro ponto importante é a origem do tecido, devido a diferença de composição, densidade, conteúdo de lipídeos e espessura o processo de descclularização irá variar. Então para cada tecido é necessário otimizar um protocolo, no qual é verificado se as células foram removidas e se não há alguma substância residual. Podem ser realizadas análises histológicas pela coloração por Hematoxilina e Eosina, tricromo de Masson ou Safranin O; análise da presença de ácido desoxirribonucleico (DNA); e análises imuno-histoquímicas para proteínas específicas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Um dos desafios em torno da descclularização é a recelularização. A dificuldade está em proporcionar uma distribuição eficaz em regiões específicas, além de se conseguir escalonar uma produção na ordem de se obter bilhões de células, bem como também encontrar um ponto ótimo de diferenciação das células, de forma que elas reconheçam os sinais da matriz e sejam capazes de amadurecer no *scaffold* (WOBMA; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2016).

Outro desafio é como automatizar esse processo, já que ainda demanda muitas etapas manuais, que são demoradas e exigem supervisão. Além disso, ainda não existem análises totalmente viáveis e universais para caracterização do material, no qual mostrem, de maneira rápida e sem trazer perda, que o material está totalmente descclularizado. Por último, o desafio de desenvolver um só biorreator que possa atender toda variedade de órgãos, sendo que cada um tem características específicas (CHOUDHURY et al., 2020).

2.2 O CORAÇÃO

O coração é altamente ligado à sobrevivência, já que se parar de contrair nenhum outro órgão continua funcionando no organismo. Algumas das doenças que mais acometem esse órgão são pressão alta, insuficiência cardíaca, infarto, arritmia, cardiopatia congênita, angina e miocardite. Essas patologias são mais comuns em pessoas com antecedentes familiares, que estão acima do peso ideal, fumam ou possuem colesterol alto, diabetes e aterosclerose (BRASIL, 2021).

Elas são a principal causa de morte em todo o mundo. Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2019, representando 32% de todas as mortes globais. Dentro dessa porcentagem, 85% foram causadas por infarto e acidente vascular encefálico (WHO, 2021). O transplante é uma opção de tratamento, mas só é indicado quando há insuficiência cardíaca irreversível e outros tratamentos não fizeram efeito (BRASIL, 2020).

No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), a necessidade anual estimada de transplantes de coração são 1681, sendo que em 2020 o total de transplantes realizados foram 307 (RBT, 2020) e em 2021 foram 334 (RBT, 2022). Esses números deixam clara a carência de órgãos viáveis, o que mostra a grande necessidade do desenvolvimento de terapias mais acessíveis.

A Bioengenharia de Tecidos cardíacos tem o potencial de desenvolver terapias capazes de diminuir essa carência. Embora apresente muitas perguntas não respondidas, ela cresce nessa tentativa. Atualmente, os tipos de biomateriais mais estudados para fabricação de *scaffolds* incluem hidrogéis, MEC descelularizada e membranas celulares automontadas (termo em inglês, *cell sheets*) (THEUS et al., 2019).

Ott e colaboradores (2008) foram os primeiros a conseguirem descelularizar um órgão inteiro, produzindo um *scaffold* cardíaco complexo, biocompatível e vascularizado. Eles também recelularizaram o *scaffold*, mostrando a possibilidade de fazer com que esse órgão seja transplantável. Ng e colaboradores (2011) cultivaram células-tronco

embrionárias humanas em corações descelularizados de camundongos e os resultados indicaram que o *scaffold* foi capaz de direcionar a diferenciação das células-tronco na linhagem cardíaca.

Guyette e colaboradores (2016) realizaram os experimentos em corações humanos não usados para transplante, com doação após morte circulatória ou morte encefálica. Para recelularização utilizaram cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (linhagem BJ-RiPS-1.1 da *Harvard Medical School*, Boston, EUA), que foram cultivados em fatias do tecido e mantidas por 120 dias em cultura. Como resultado conseguiram um *scaffold* com uma microvasculatura preservada e na recelularização foi demonstrado aumento da estrutura sarcomérica e função eletromecânica.

Kitahara e colaboradores (2016) realizaram transplantes heterotópicos em suínos, sendo um com coração suíno apenas descelularizado e outro com um coração descelularizado e recelularizado com células estromais mesenquimais suínas (cedidas pela *Jichii Medical University*, Tochigi, Japão). Os transplantes foram realizados com sucesso, demonstrando boa perfusão e sem sangramento. Os corações foram coletados no terceiro dia após o transplante e análises de coloração com hematoxilina e eosina em ambos corações mostraram trombose nas artérias coronárias e migração de células inflamatórias.

Um ensaio clínico majoritariamente patrocinado pela empresa Aziyo Biologics (Maryland, EUA) está testando envelopes compostos por material biológico acelular derivado da submucosa do intestino delgado suíno em comparação com outro material. O objetivo desses envelopes é fornecer um ambiente estável na implantação de marca-passo cardíaco. O estudo ainda está em fase de recrutando participantes e a estimativa para os primeiros resultados são dezembro de 2022 (AZIYO BIOLOGICS, 2020).

Alguns dos desafios encontrados na Bioengenharia de Tecidos cardíacos são evitar a formação de trombos, que ocorre devido a resposta imunológica, endotelização incompleta, conteúdo celular e/ou soluções da descelularização remanescentes (TANG-QUAN et al., 2018). Além da necessidade de garantir a recelularização

completa, para isso é necessário fornecer uma cobertura celular em todo o órgão, assim como estímulo elétrico, garantir maturidade dos cardiomiócitos e seu desenvolvimento no tecido (GUYETTE et al., 2016).

A fonte celular pode ser considerada o maior desafio. Nenhum estudo conseguiu produzir uma massa celular próxima à massa celular nativa, o que exige dimensionar as técnicas atuais para um nível industrial (HILLEBRANDT et al., 2019). Visto isso, outra estratégia pode ser utilizar o tecido cardíaco descelularizado digerido em géis, funcionando como *scaffolds* injetáveis (LANZA et al., 2020).

Os hidrogéis podem ser descritos como uma malha. Eles são uma rede reticulada tridimensional insolúvel formada por polímeros hidrofílicos, que são macios, elásticos e apresentam a capacidade de absorver grandes quantidades de água. A água ocupa os espaços intersticiais e as cadeias poliméricas podem ser interligadas de formas variadas, por exemplo, por ligação de hidrogênio, interação de Van der Waals, ligações covalentes, interações eletrostáticas ou emaranhados físicos, o que possibilita grande versatilidade para sua formação. Por exemplo, por reação entre monômeros, ciclos de congelamento e descongelamento, reação enzimática, automontagem de fibrilas, entre outros (KHANG, 2017; MIGLIARESI; MOTTA, 2014).

Na Bioengenharia de Tecidos cardíacos, os hidrogéis são os biomateriais mais amplamente utilizados, devido suas propriedades bioquímicas, biofísicas e facilidade em projetar várias geometrias. Em sua fabricação são utilizados compostos naturais, sintéticos ou híbridos, na qual ainda não há um consenso de qual deles é o ideal (POMEROY; HELFER; BURSAC, 2019). Novas estratégias exploradas envolvem os hidrogéis injetáveis, na qual foi evidenciado que materiais injetáveis combinados com células melhoraram o efeito terapêutico geral (SALDIN et al., 2017; WANG; CHRISTMAN, 2016).

Os hidrogéis de MEC podem ser usados como suportes minimamente invasivos para Bioengenharia de Tecidos com o objetivo de fornecerem pistas bioquímicas para o tecido que se pretende regenerar e auxiliar na infiltração celular. Sua fabricação começa com a descelularização do tecido seguida de liofilização, digestão com pepsina e ajustes de pH e concentração salina para adequar-se às condições *in vivo*.

Essa MEC digerida passa por uma automontagem e forma um hidrogel nanofibroso após incubação a 37°C (SPANG; CHRISTMAN, 2018; UNGERLEIDER et al., 2015).

Então, as duas etapas essenciais para formação de um hidrogel são a solubilização da MEC e a neutralização. Para solubilização normalmente se utiliza a pepsina que digere a MEC em componentes monoméricos. A neutralização controlada pela temperatura e pH são responsáveis por permitir a formação espontânea das ligações intramoleculares dos componentes monoméricos para formação do hidrogel.

Alguns dos benefícios dessa metodologia são o uso da MEC digerida liofilizada, obtendo uma vida útil longa com o congelamento e o rápido preparo com a ressuspensão (UNGERLEIDER et al., 2015). Seif-Naraghi e colaboradores (2013) desenvolveram um hidrogel de MEC miocárdica suína e analisaram a resposta à injeção desse biomaterial duas semanas após indução de infarto do miocárdio em suínos. O hidrogel melhorou a função cardíaca, aumentou o músculo cardíaco, reduziu a fibrose do infarto, não afetou ritmo cardíaco ou química do sangue em porcos tratados, nem causou embolização ou isquemia, se mostrando biocompatível e biodegradável.

Já foi demonstrado por meio de análises de expressão gênica que um hidrogel injetável derivado de miocárdio ventricular suíno descelularizado após uma semana da injeção foi capaz de modular a resposta inflamatória, reduzir a apoptose dos cardiomiócitos, melhorar o desenvolvimento dos vasos sanguíneos e diminuir a hipertrofia cardíaca e a fibrose (WASSENAAR et al., 2016).

O hidrogel de MEC tem sido aplicado na bioimpressão 3D (TANG-QUAN et al., 2018). Em geral, eles não apresentam uma resistência mecânica alta, fazendo com que pesquisadores explorem alternativas com o propósito de aumentá-la. Diferentes grupos têm apostado na adição de substâncias como quitosana, genipina (EFRAIM et al., 2017), polietilenoglicol, fibrina, seda (STOPPEL et al., 2016), obtendo um hidrogel híbrido.

Em relação a ensaios clínicos, a empresa Ventrix foi a que realizou o primeiro teste da aplicação de hidrogel injetável de MEC descelularizada em humanos (VENTRIX, 2014). Ela realizou um estudo de fase 1, no qual investigou a aplicação de seu

produto, VentiGel. Os pacientes que participaram do estudo tiveram infarto agudo do miocárdio, em um tempo de pelo menos 60 dias e no máximo três anos, e o hidrogel foi injetado por meio de cateter. Ele é derivado de ventrículos esquerdos suínos. Nenhum evento adverso grave foi observado e conseguiram atestar a segurança e viabilidade do produto (TRAVERSE et al., 2019).

2.2.1 Cardiomiócitos

As células do músculo cardíaco ou cardiomiócitos não são os únicos tipos de células presentes no coração, mas são vitais para o funcionamento desse órgão. Nas doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio, fibrose cardíaca e insuficiência cardíaca, a perda e regeneração insuficiente dos cardiomiócitos são um dos fatores que causam a disfunção do tecido (PONNUSAMY; LI; WANG, 2017). Por isso, os mecanismos de proliferação e regeneração dos cardiomiócitos são muito estudados. Esse entendimento facilita o desenvolvimento de terapias para o miocárdio.

A proliferação consiste no crescimento e divisão das células, processo regulado por interações célula-célula e célula-MEC, sinalizações nutricionais, autócrina e hormonais, adesão de moléculas, entre outras vias. A mensuração desse processo é frequentemente utilizada para analisar a resposta celular à determinado estímulo ou toxina e pode ser realizado por diferentes metodologias, por exemplo: contagem de células, eficiência de plaqueamento e marcação com anticorpos para proteínas específicas do ciclo celular (FRESHNEY, 2010).

Ao se falar de regeneração trata-se da situação em que ocorre reconstituição da estrutura danificada mantendo o mesmo número de células, padrão e forma. A regeneração cardíaca está relacionada ao ciclo celular dos cardiomiócitos, que difere durante os estágios da vida. A regeneração completa é observada em corações de peixe-zebra. Em corações de camundongos neonatais também já foi observada, mas essa capacidade é restrita à primeira semana após o nascimento (HESSE; WELZ; FLEISCHMANN, 2018).

Como os cardiomiócitos de mamíferos param de proliferar e saem do ciclo celular após o nascimento, percebe-se a importância de se entender os diversos mecanismos envolvidos. Como reguladores do ciclo celular, exposição ao oxigênio, metabolismo energético, MEC e fatores de crescimento interferem na regulação da proliferação de cardiomiócitos e regeneração cardíaca, e como eles podem ser manipulados para permitir o retorno ao ciclo celular (PAYAN; HUBERT; ROCHAIS, 2020).

Estudos sobre os mecanismos de regulação do processo de regeneração cardíaca indicam que a regulação da capacidade de proliferação dos cardiomiócitos é o evento primordial para se controlar a regeneração cardíaca. Por isso, o foco é estimular o potencial proliferativo dessas células e tentar mimetizar o que ocorre naturalmente nos peixes, anfíbios e mamíferos neonatais. Mas esse é um evento complexo que envolve todas as células do coração, incluindo células endoteliais, células musculares lisas vasculares e fibroblastos cardíacos (ALI; BRAGA; GIACCA, 2020).

leda e colaboradores (2009) estudaram os efeitos dos fibroblastos cardíacos nos cardiomiócitos e encontraram evidências de que fibroblastos cardíacos embrionários secretam altos níveis de FN, colágeno e fator de crescimento de ligação à heparina (HB-EGF), que favorecem a sinalização para proliferação de cardiomiócitos. Li, Asfour e Bursac (2017) também estudaram os fibroblastos cardíacos e mostraram que a idade deles influencia na estrutura, função e propriedades moleculares de tecidos cardíacos manipulados.

Outro fator que exerce influência sobre o comportamento dos cardiomiócitos é a MEC. Ozcebe e colaboradores (2021) mostraram que a idade da MEC influencia a capacidade proliferativa, a maturidade e a resposta ao estresse de cardiomiócitos jovens e envelhecidos. A entrega de MEC jovem a um coração envelhecido tem o potencial de induzir a regeneração, assim como a entrega de um conjugado de células jovens e MEC adulta mostrou potencial em melhorar a função cardíaca. Esse resultado se mostra útil para desenvolvimento de terapias.

2.2.2 Matriz extracelular (MEC)

Os tecidos do corpo são um agrupamento de células, que são mantidas unidas por conexões específicas denominadas junções celulares e outras estruturas de sustentação, como a MEC. A MEC é sintetizada e secretada pelas células e desempenha papel importante em vários processos biológicos, desde o crescimento e desenvolvimento até a morte das células. Sua composição varia de tecido para tecido, mas sempre apresenta dois componentes: proteoglicanos e proteínas fibrosas insolúveis. A primeira são proteínas covalentemente ligadas a cadeias de polissacarídeos. E a segunda são substâncias como colágeno, FN e laminina (SILVERTHORN, 2010).

Estudos proteômicos revelaram que 90% da MEC cardíaca é composta por dez proteínas diferentes, sendo as mais abundantes: albumina sérica, colágenos (colágenos I, III e IV), glicoproteínas não colágenas (FN e laminina), proteoglicanos, GAG's e elastinas (LINDSEY et al., 2018). Essa composição proporciona à MEC resistência, flexibilidade e durabilidade (MENDIBIL et al., 2020).

Estudos comparando corações de peixe-zebra e camundongos pós-lesão ventricular mostraram FN elevada, enquanto fibrilina e múltiplos genes codificadores de colágeno foram reduzidos. Além disso, os corações de peixe-zebra pós-lesão cardíaca foram descelularizados, liofilizados e adicionados como suplemento na cultura de células progenitoras cardíacas humanas. A adição da MEC descelularizada provocou aumento na migração e capacidade proliferativa (DERRICK; NOËL, 2021).

No caso de infarto do miocárdio, há uma grande mudança na composição da MEC cardíaca. Primeiro ocorre a morte de cardiomiócitos, que desencadeia uma série de respostas inflamatórias, levando à infiltração de leucócitos. Eles fagocitam células mortas e detritos da MEC, que sofre degradação, enquanto se inicia a fase reparadora. Ela é caracterizada pelo acúmulo de miofibroblastos, que produzem proteínas da MEC, que levará a formação de uma cicatriz (DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOIANNIS, 2010).

A FN é importante no reparo cardíaco para a organização e estabilização da nova MEC, durante essa fase ocorre a formação de uma matriz provisória rica em fibrina e FN. Ela também auxilia na diferenciação e ativação dos miofibroblastos, na deposição de colágeno, nos processos migração e proliferação de células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos (DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOIANNIS, 2010).

Williams e colaboradores (2014) mostraram que a MEC fetal e neonatal de ratos tem a FN como componente mais abundante, enquanto na adulta tem o colágeno tipo I, sendo que os corações fetais também apresentaram considerável abundância de periostina. Além disso, demonstraram que a adição de MEC fetal em cultura de cardiomiócitos neonatais aumentou significativamente a proliferação, em comparação com adição de polilisina, MEC neonatal e MEC adulta. Esses indicativos de que a MEC jovem promove propriedade benéficas em cultura, fortalece a estratégia de desenvolvimento de terapias na Bioengenharia de Tecidos que imitem o ambiente extracelular fetal-neonatal (SILVA et al., 2021).

2.2.3 Fibronectina (FN)

A FN é uma glicoproteína adesiva abundante, encontrada nos fluidos corporais, MEC e membranas basais. No plasma, por exemplo, ela é encontrada em quantidades em torno de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma característica importante é sua capacidade de interação com várias outras macromoléculas, como gelatina e colágenos, fibrina e heparina. Ela adquire variadas conformações, que de uma forma geral são divididas em FN celulares e plasmáticas (HYNES; YAMADA, 1982).

Depois do colágeno, a FN é a proteína mais importante na constituição da MEC. Sua função relaciona-se com migração, adesão, proliferação, morfologia celular, cicatrização de feridas, no período embrionário para o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos (KLIMEK; GINALSKA, 2020), coagulação sanguínea, defesa e metástase.

Seu gene possui três regiões onde ocorre *splicing* alternativo, possibilitando a formação de 20 variantes diferentes (NCBI, 2022). Em relação ao coração, Wang e colaboradores (2013) estudaram esse órgão do peixe-zebra, que mesmo adultos apresentam capacidade de regeneração e demonstraram que a FN é necessária para regeneração.

Em relação aos hepatócitos, células do fígado, já foi demonstrado essas células de ratos neonatais e adultos se ligam com alta eficiência em placas revestidas com FN (DESCHÊNES; VALET; MARCEAU, 1980) e que a FN favorece a síntese de DNA e a migração desse tipo celular (SAWADA et al., 1987).

Os hepatócitos são capazes de sintetizar FN (SUDHAKARAN; STAMATOGLOU; HUGHES, 1986; TAMKUN; HYNES, 1983; VOSS et al., 1979) e a elevação dos níveis plasmáticos de FN se correlaciona com o grau de regeneração do fígado, sendo útil para detecção de regeneração no fígado (KWON et al., 1990). Isso mostra que na literatura está elucidada a influência favorável da FN sobre os hepatócitos, então estes podem funcionar como um controle positivo no estudo de proliferação celular.

Como já mencionado, as doenças cardíacas estão entre as principais causas de morte no mundo, o que traz urgência para o desenvolvimento de terapias que atendam todos os pacientes acometidos e de maneira eficaz, por isso o foco nessa demanda. Em relação à FN, estudos mostram sua importância na regeneração, proliferação celular e desenvolvimento do coração, o que motiva a escolha dessa proteína para o enriquecimento de culturas de cardiomiócitos para analisar sua influência na proliferação celular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência da fibronectina sobre a proliferação de cardiomiócitos *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da FN na proliferação celular de hepatócitos obtidos por cultura primária, que funcionam como um controle positivo;
- Analisar viabilidade dos cardiomiócitos utilizados;
- Realizar caracterização morfológica dos cardiomiócitos obtidos de cultura primária e os de cultura estabelecida (linhagem H9c2);
- Produzir hidrogel derivado de matriz cardíaca descelularizada de camundongos adultos e neonatais, que potencialize a proliferação de cardiomiócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os animais foram utilizados seguindo normas estabelecidas por entidades científicas nacionais e com aprovação do Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES nº 27/2020). Os camundongos foram mantidos em gaiolas com temperatura e umidade controlados, em regime de ciclo claro/escuro (12h/12h) e alimentação com água e ração comercial para animais experimentais *ad libitum*.

Os animais adultos foram eutanasiados para a retirada do coração e a pesagem foi previamente realizada para o cálculo do anestésico. A administração foi via intraperitoneal de solução de cloridrato cetamina 10% (Cetamin®, Syntec) e cloridrato xilazina 2% (Xilazin®, Syntec) na proporção 9:1, respectivamente. A dose utilizada foi de 0,2 mL de anestésico para cada cem gramas em peso. Em seguida, injetou-se heparina sódica (5000 UI/mL, Hemofol®, Cristália) a 0,1% na mesma dosagem, também pela via intraperitoneal.

Após a constatação visual da completa indução anestésica foi realizada a laparotomia e a esternotomia para obtenção dos corações. Os animais neonatais foram eutanasiados por decapitação. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos adultos com idades entre dois e nove meses, pesando entre 40-70 gramas e quando neonatais com até três dias de vida.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos específicos para resíduo biológico e congelados em freezer a -20°C para posterior coleta pela empresa responsável pelo descarte de material biológico da Prefeitura de Vitória.

4.2 DESCELULARIZAÇÃO DOS ÓRGÃOS

Para descelularização dos corações adultos foram feitas adaptações dos procedimentos descritos por Guyette e colaboradores (2014) e Ott e colaboradores (2008). O acondicionamento do coração após sua retirada foi em placa de Petri com PBS pH 7,2, onde realizou-se a canulação aórtica, para realização da perfusão com auxílio de uma bomba peristáltica (**Figura 1**).

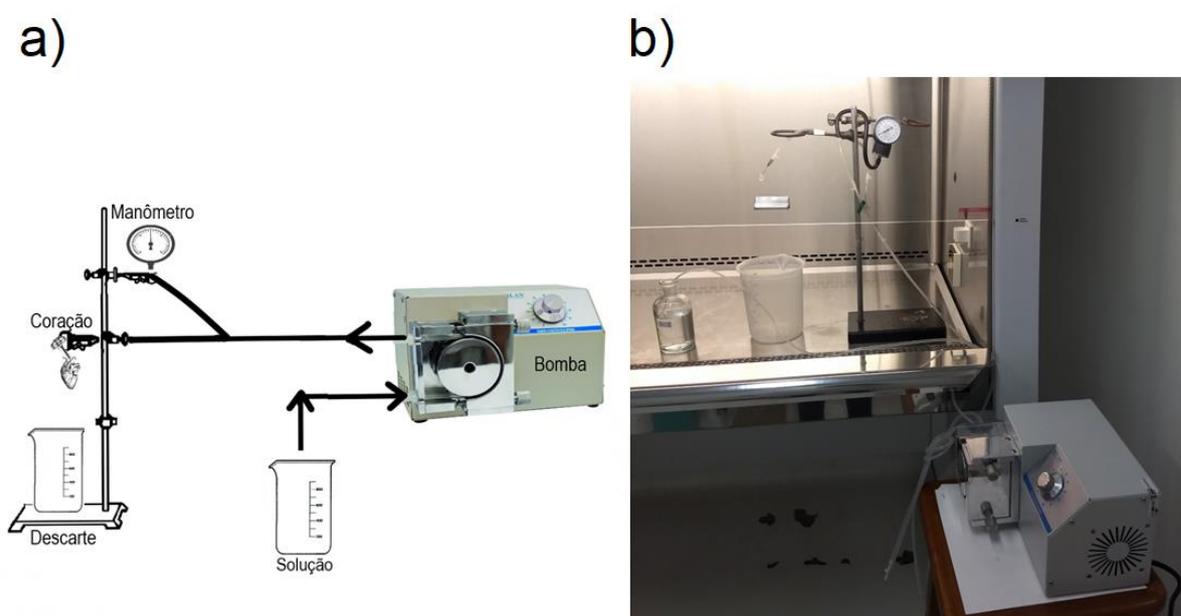


Figura 1: Representação do sistema de descelularização do coração. Em **a)** a representação esquemática e em **b)** a imagem real do sistema no interior da cabine de fluxo laminar.

A primeira solução perfundida foi de PBS associada a heparina 50 UI/mL durante 30 minutos, seguida da solução de SDS (Sigma®, L5750) 1% por 12 horas, PBS por 30 minutos, solução de Triton (Sigma®, X100) 1% por uma hora e, por último, água destilada por uma hora. A realização da desinfecção do coração foi feita antes da etapa de cultura celular, baseada no procedimento de Wainwright e colaboradores (2010).

Após a perfusão com água destilada, o suporte com coração foi acondicionado no interior de uma cabine de fluxo laminar. Durante essa etapa foi perfundida solução de ácido peracético (ProSani Prox 35®, 3,5% p/p) 0,1% com etanol 4% por uma hora, seguido de PBS e água destilada estéreis por 30 minutos cada. No decorrer das perfusões a pressão foi medida e o fluxo regulado de maneira que a pressão estivesse

dentro da faixa de 80-120 mmHg. No término do processo o coração foi acondicionado em tubo cônico de 15 mL e congelado a -80°C .

Para descelularização dos corações neonatais utilizou-se protocolo padronizado anteriormente pelo grupo de pesquisa em que esse trabalho está inserido, que consistiu em imersão e agitação. Cada órgão foi adicionado em um tubo cônico de 50 mL com 15 mL de solução e agitado a 150 rpm em um agitador orbital. A primeira solução adicionada foi de PBS com heparina 50 UI/mL durante 30 minutos, seguida da solução de SDS 0,2% por 48 horas, com troca após 24 horas, PBS estéril por 30 minutos e, por último, três lavagens com água destilada estéril por uma hora cada.

4.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL

Para produção do hidrogel foram feitas adaptações dos procedimentos descritos por Freytes e colaboradores (2008). O órgão foi macerado com auxílio de um almofariz, pistilo e nitrogênio líquido em ambiente estéril. Para recolher o material no almofariz, utilizou-se solução de PBS estéril, o qual foi pipetado e acondicionado em tubos cônicos de 15 mL.

As amostras foram liofilizadas durante 24 horas no liofilizador K108 (Liotop[®]) do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), obtendo-se um pó (**Figura 2a**), que foi pesado e digerido por pepsina (Sigma[®], P6887). A pepsina foi solubilizada em ácido clorídrico (HCl) 0,01 M em uma concentração de um mg/mL de ácido (**Figura 2b**) e o pH foi acompanhado durante todo o processo de digestão. A concentração do pó na solução com a enzima de dez mg/mL e o tempo de digestão de 48 horas a 37°C .

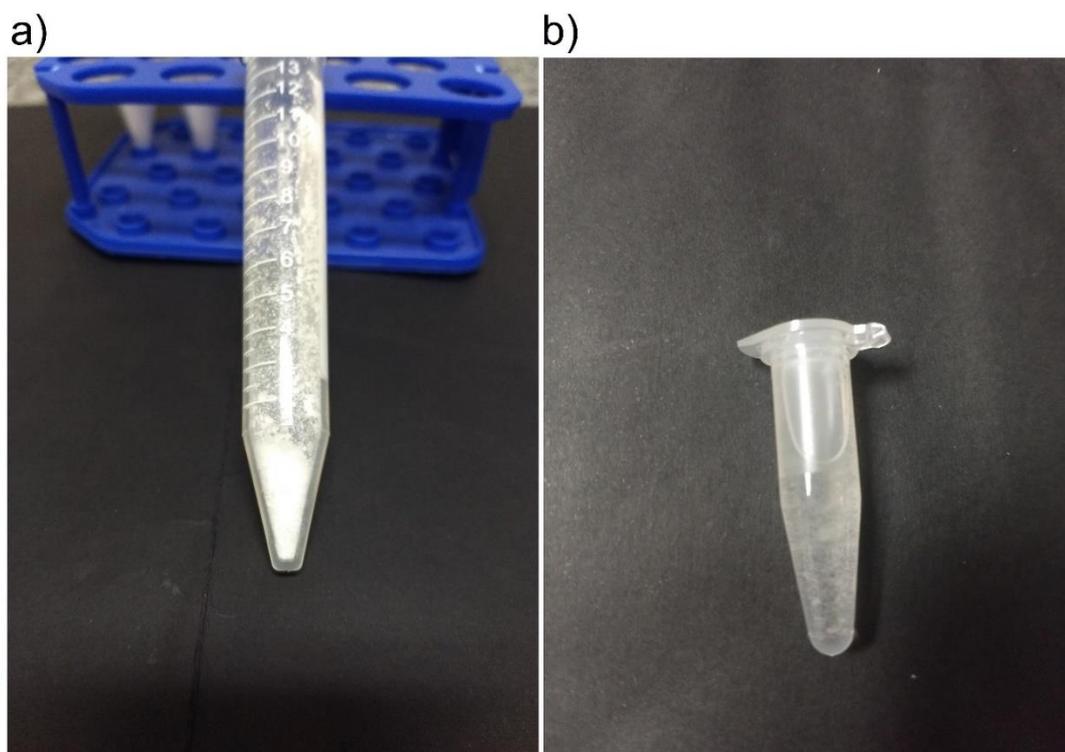


Figura 2. Fotos demonstrando o aspecto do hidrogel. Em **a)** o pó após os corações serem moídos e liofilizados. Em **b)** logo após a adição do pó, mais pepsina e HCl.

A digestão foi realizada em microtubos, seguida do ajuste para PBS 1x por meio da adição de PBS 10x e ajuste do pH para sete pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) 7 N. Logo após, a solução foi disposta em placa de 12 poços, um mL por poço, e levada para gelificação a 37°C por uma hora.

4.4 ISOLAMENTO CELULAR

4.4.1 Cardiomiócitos adultos

Para o isolamento de cardiomiócitos adultos utilizou-se a metodologia descrita por Guatimosim e colaboradores (2001). Todas as etapas possíveis foram realizadas no interior de uma cabine de fluxo laminar. A obtenção do coração seguiu os mesmos procedimentos descritos acima para descellularização e também a utilização do mesmo sistema de perfusão.

Após a retirada do coração, o mesmo foi acondicionado em uma placa de Petri sob o gelo contendo solução de digestão gelada (NaCl 130 mM; KCl 5,4 mM; Hepes 25 mM; NaH₂PO₄ 0,33 mM; glicose 22 mM; MgCl₂ 1 mM) enriquecida com solução de ácido etileno glicol bis (B-amino etileno éter) (EGTA) e Hepes (cem e 25 mM, respectivamente), sendo 450 µL dessa última para cada 150 mL da solução de digestão.

A canulação foi realizada em uma placa de Petri e o coração adicionado no sistema de perfusão, que anteriormente foi perfundido com álcool 70% por 15 minutos e água destilada estéril por mais 15 minutos. A primeira perfusão no coração constituiu de uma lavagem com a mesma solução de digestão utilizada na placa de Petri, porém aquecida a 37°C, por três minutos com ajuste da vazão para manter a pressão em níveis fisiológicos, isto é, na faixa de 80-120 mmHg.

A segunda perfusão foi da solução de digestão sem EGTA+Hepes com Colagenase A (Sigma®, REF 10103578001) na concentração de um mg/mL e cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0,096 mM. Nessa etapa, foi preparada 15 mL da solução, a qual reperfundiu por 15 minutos. Após as duas perfusões, o coração foi retirado e acondicionado em outra placa de Petri, na qual passou pelo processo de picotagem com o auxílio de duas pinças.

O órgão picotado foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, ainda com a solução de digestão com colagenase, com auxílio de uma pipeta de dez mL, quando também foi utilizada para digestão mecânica, isto é, aspirada e dispensada diversas vezes durante dois minutos. Logo após, o tubo foi deixado em repouso por um minuto e o sobrenadante coletado para outro tubo cônico de 15 mL. O tubo passou por centrifugação por um minuto a 500 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* adicionou-se sete mL da solução de digestão com CaCl₂ a 0,256 mM.

Após a homogeneização, esperou-se um minuto e centrifugou novamente por um minuto a 500 rpm. Novamente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se sete mL de solução de digestão mais CaCl₂ a 0,499 mM ao *pellet*, homogeneizou e aguardou-se um minuto. Na última centrifugação, por um minuto a 500 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspendido em meio DMEM alta glicose (Sigma®,

D6429) enriquecido com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Sigma[®], A5955). As células foram mantidas em cultura a 37°C em 5% de dióxido de carbono (CO₂).

4.4.2 Cardiomiócitos neonatais

Para o isolamento de cardiomiócitos neonatais utilizou-se como base os procedimentos descritos por Fu e colaboradores (2005). Todas as etapas possíveis foram realizadas no interior de uma cabine de fluxo laminar. Os camundongos *Swiss* neonatais com até três dias de vida foram sacrificados por decapitação, o coração retirado e lavado em PBS gelado. Depois foram acondicionados em placa de Petri e picotados com auxílio de duas pinças.

Os órgãos picotados foram transferidos para um tubo cônico de 50 mL e adicionou-se 500 µL de tripsina (Sigma[®], T3924) por coração. O tubo foi acondicionado em gelo por 20 minutos, agitado a cada três minutos, e permaneceu em agitação durante dez minutos em banho maria a 37°C. Logo após realizou-se a digestão mecânica com auxílio de uma pipeta de dez mL, na qual a solução foi aspirada e dispensada durante um minuto.

O tubo foi deixado em repouso por um minuto e o sobrenadante recolhido para outro tubo cônico de 15 mL, no qual foi adicionado a mesma quantidade de meio DMEM enriquecido com 15% de SFB e 1% de antibiótico. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a mil rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido no meio de cultura aquecido (37°C).

Para possibilitar purificação, as células foram incubadas por 1h30 a 37°C em 5% de CO₂ e o meio foi acondicionado em outra garrafa, pois os não miócitos se fixam mais rapidamente em comparação aos cardiomiócitos. Após a troca, as células não foram utilizadas por pelo menos 24h.

4.4.3 Hepatócitos adultos

Para o isolamento de hepatócitos adultos utilizou-se como base os procedimentos descritos por Reis (2014). Todas as etapas possíveis foram realizadas no interior de uma cabine de fluxo laminar. Para a retirada do fígado dos camundongos *Swiss* adultos, os animais foram previamente pesados e anestesiados por administração intraperitoneal de solução de cetamina e xilazina na proporção 9:1, respectivamente, na dosagem de 0,2 mL de anestésico para cada cem g em peso.

Após a constatação visual da completa indução anestésica foi realizada a laparotomia e a esternotomia para injeção de 0,5 mL de PBS com heparina a 0,1% no coração. Tentou-se canular o fígado pela veia porta, mas sem sucesso, então o procedimento foi realizado com o órgão picotado. Retirou-se o fígado e em uma placa de Petri foi picotado com o auxílio de duas pinças.

O tecido picotado foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, onde foram realizadas várias lavagens com solução de Krebs-Henseleit (glicose dez mM; NaCl 120 mM; KCl 4,8 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; MgSO_4 1,2 mM; NaHCO_3 24 mM; HEPES dez mM; pH = 7,4) até que a solução saísse límpida. Depois das lavagens adicionou-se 15 mL da solução de Krebs-Henseleit com colagenase A (Sigma®, REF 10103578001) a um mg/mL, no qual ficou por sete minutos em banho maria com agitação por todo tempo.

Logo após foi realizada digestão mecânica com auxílio de uma pipeta de dez mL, na qual a solução foi aspirada e dispensada durante um minuto. O tubo ficou em repouso por um minuto e o sobrenadante recolhido para outro tubo cônico de 15 mL. O tubo foi centrifugado por quatro minutos a mil rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em sete mL da solução de Krebs-Henseleit com CaCl_2 1,3 mM.

Novamente o tubo foi centrifugado por quatro minutos a mil rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em dois mL da solução de Krebs-Henseleit com BSA 2%. Nova centrifugação foi feita por quatro minutos a mil rpm, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em meio DMEM alta glicose enriquecido com 15% de SFB e 1% de antibiótico. As células foram mantidas em cultura a 37°C em 5% de CO_2 .

4.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços no volume de 150 μL por poço, sendo que para as células extraídas para cultura primária utilizou-se a concentração obtida após a tripsinização (procedimento padrão de dissociação enzimática): 10^5 células/mL. Já no caso das células obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro da linhagem H9c2 foram plaqueadas em duas concentrações: 5×10^3 e 1×10^4 células/mL. Todos os ensaios foram realizados com seu próprio controle.

Para avaliação da proliferação utilizou-se kit baseado no corante indicador de oxidorredução resazurina (Sigma[®], TOX8-1KT). No dia da análise foi acrescentado o reagente no volume referente a 10% do volume do meio e deixou reagir no escuro por quatro horas. Para leitura, como foi realizada fluorometricamente, foi necessário transferir cem μL de cada poço para uma placa de 96 poços preta (Corning, Costar[®]) e conforme indicado pelo fabricante a leitura foi feita em um comprimento de onda de 590 nm usando um comprimento de onda de excitação de 560 nm. O equipamento utilizado foi o Leitor de Microplacas Multidetecção Híbrido Synergy H1 (BioTek[®]) do LABIOM.

A análise com a resazurina consiste em medir a atividade metabólica das células vivas, sendo um indicador de oxirredução. A resazurina preparada em soluções salinas balanceadas sem vermelho de fenol é um corante azul escuro não fluorescente e ao ser reduzida pelas células vivas adquire coloração vermelha e fluorescência. Então a conversão do corante em solução é medida fluorometricamente.

4.5.1 Enriquecimento da cultura celular com fibronectina

Para avaliação da influência da FN na proliferação dos cardiomiócitos utilizou-se duas formas de enriquecimento, segundo a metodologia de Cuciolo (2018):

1. FN *coating* (FNc): revestimento da placa de cultura com FN;
2. FN solúvel (FNs): adição de FN ao meio.

Para o revestimento da placa (FNc), ao meio de cultura DMEM alta glicose, suplementado com 15% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionada a quantidade necessária da solução estoque de FN (em água ultrapura) para obter concentração de 20 µg/mL. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 80 µL em cada poço do meio enriquecido com FN e incubou na estufa a 37°C por pelo menos duas horas. Já para FNs apenas se adicionou a quantidade necessária da solução estoque de FN ao meio com as células durante seu plaqueamento.

4.6 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para avaliação da viabilidade celular foi utilizado o ensaio Live/Dead (*Live and Dead Cell Assay Kit*, Abcam®, ab270789). As células foram plaqueadas como descrito para proliferação celular e analisadas cinco dias após o plaqueamento. No dia da análise, os poços foram incubados com calceína a dez µM por uma hora protegidos da luz e com agitação a cada 20 minutos. Em seguida, acrescentou-se a solução de Hoechst na quantidade de dois µL para 400 µL de células, que reagiu no escuro por 30 minutos.

Por último, adicionou-se a solução de 7-aminoactinomicina D, dois µL para 400 µL de células, que reagiu sob agitação de 150 rpm e sob o gelo por 30 minutos protegido da luz. As imagens (n = quatro) foram obtidas pelo microscópio de fluorescência invertido DMi8 (Leica®) do Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI), com magnificação de 100X e utilizando os cubos de fluorescência DAPI (Excitação 350/50; dicroico 400; Emissão 460/50), FITC (Ex 480/40; dicroico 505; Em 527/30) e RHOD (Ex 546/10; dicroico 560; Em 585/40).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a Fórmula 1 abaixo descrita:

$$(1) \quad \text{viabilidade celular} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ de células totais}} \times 100$$

4.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

Para avaliação da morfologia celular foram utilizados o microscópio invertido e microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo esse último do Laboratório Multiusuário de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR). As imagens usando o microscópio invertido foram fotografadas quando estavam na garrafa de cultivo ou na placa de 96 poços. Já para o MEV, as células foram plaqueadas em lamínulas, que foram acondicionadas em placas de 24 poços. Para utilização na cultura, as lamínulas foram lavadas com detergente, depois mergulhadas em água com detergente e aquecidas até começar a ferver.

Para retirar todo o sabão, cada lamínula foi lavada com bastante água corrente. Em seguida, ficaram submersas em álcool 70% *overnight*. Elas foram secas em estufa e antes do uso foram colocadas na radiação ultravioleta por 15 minutos cada lado. Para o plaqueamento das células, após o procedimento padrão de dissociação enzimática, 50 µL da suspensão de células foi semeada nas lamínulas, com cuidado para não extravasar e incubou-se por uma hora a 37°C. Após esse tempo, adicionou-se 500 µL de meio e incubou-se por cinco dias.

O meio foi retirado e adicionou-se PBS a 37°C duas vezes para lavagem. As células foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% e tampão cacodilato 0,1 M) por duas horas a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a três lavagens por 30 minutos em tampão cacodilato 0,1M e seguiu-se com etapas de desidratação.

Para essa etapa 500 µL de etanol foi adicionado ao poço por 30 minutos para cada concentração: 30, 50, 70, 90 e 100%, e na última concentração realizou-se duas vezes. Em seguida, montou-se os *stubs* para revestir a amostra com dez nm de ouro puro em aspensor a vácuo (Denton Vacuum®, Desk V) e, por fim, as imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol®, JEM-6610 LV).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Primeiramente, os grupos controle (meio+células) e os grupos enriquecidos (meio+células+FN) tiveram a subtração do branco, que constituiu apenas em meio para o branco do grupo controle e meio+FN para o branco dos grupos enriquecidos. Depois os grupos foram analisados quanto a presença de *outliers* e quando presente foram retirados.

Em seguida realizou-se comparações entre os grupos controle com os grupos enriquecidos, sempre em duplas, para avaliar se eram estatisticamente diferentes. Para saber se os dados seguiam distribuição normal utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk. Se não seguissem a distribuição normal empregou-se o Teste de Mann-Whitney para comparação. E se seguissem, o teste *t* de Student. Além disso, nesse último caso, também foi avaliado se as variâncias entre os grupos eram significativamente diferentes, se sim o teste *t* de Student foi calculado novamente com a correção de Welch.

Todas as comparações foram entre dois grupos, grupo enriquecido com o grupo controle. Todas as análises foram realizadas no GraphPad Prism 9.3.1 para Windows (GraphPad Software Inc., Califórnia, EUA). Quando p-valor menor que 0,05 foi considerada diferença estatisticamente significativa e a seguinte notação foi utilizada: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INFLUÊNCIA DA FIBRONECTINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A resazurina foi utilizada para análise da proliferação celular. Esse corante altera de azul escuro para vermelho e passa a ser fluorescente, então a análise foi realizada fluorometricamente. Os experimentos foram realizados com quatro tipos de células: cardiomiócitos adultos e neonatais de cultura primária, linhagem H9c2 e hepatócitos adultos também de cultura primária.

Na **Figura 3** são apresentados os dados da cultura primária de cardiomiócitos adultos no terceiro e quinto dia com FNs. Como pode ser observado, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo enriquecido e percebe-se uma diminuição da proliferação celular.

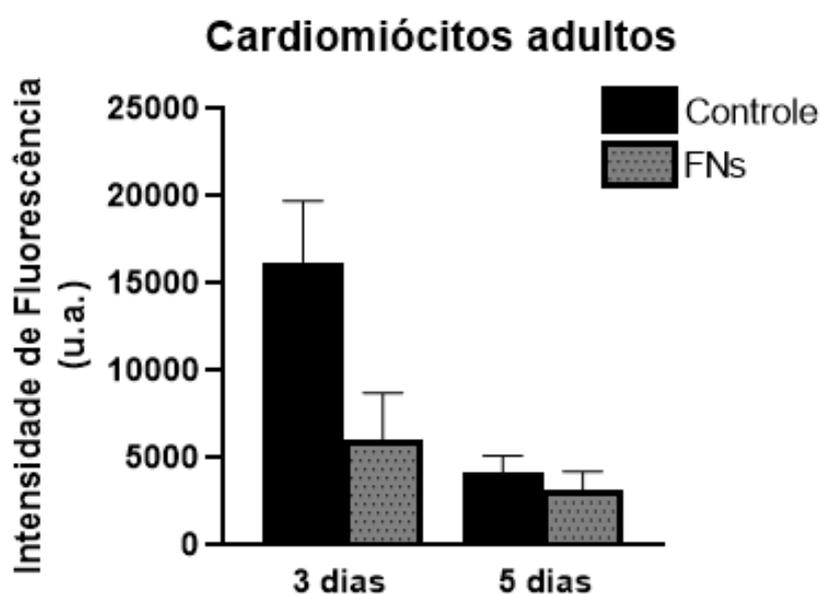


Figura 3. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de cardiomiócitos adultos de cultura primária após três e cinco dias. Valores representados pela média \pm EPM. $n =$ três/grupo. Os grupos controles não diferiram dos grupos enriquecidos com FN.

O isolamento de cardiomiócitos adultos é um procedimento desafiador e a obtenção de células com qualidade e alta viabilidade depende de muitos fatores, como qualidade da água, instrumentos limpos, pH e temperaturas ideais, lotes de produtos químicos (especialmente enzimas), ausência de bolhas de ar, manuseio do coração,

entre outros. Ainda não existe um protocolo universal, que garanta alta qualidade, sempre são necessários ajustes (LOUCH; SHEEHAN; WOLSKA, 2011).

Algumas metodologias isolam os cardiomiócitos baseados apenas na digestão mecânica do órgão, picotando e digerindo o tecido na solução enzimática, outros realizam a perfusão das soluções e posterior digestão mecânica. Nesse trabalho testou-se as duas metodologias e a realização da perfusão seguida da digestão mecânica apresentou melhores resultados. A dificuldade encontrada foi na manutenção da cultura, que pode ter relação com a canulação do coração que não foi rápida o suficiente.

Além disso, pode ser a falta de algum nutriente, por exemplo, Alam e colaboradores (2020) utilizaram a blebistatina, que proporcionou melhora na capacidade de sobrevivência; Graham e colaboradores (2013) utilizaram CO₂ na cultura de modo que dissolvido estivesse na concentração de 2%, além de revestimento com laminina; Louch, Sheehan e Wolska (2011) utilizaram a butanodiona monoxima, que proporcionou melhora no número e morfologia das células isoladas.

Em relação aos cardiomiócitos neonatais de cultura primária os dados são referentes aos dias três, cinco, dez e 15, mostrados na **Figura 4**. A maioria das comparações não apresentaram diferença significativa, sendo que para o enriquecimento com FNC com três e cinco dias e para enriquecimento com FNs com cinco dias apresentaram diferença significativa com redução de proliferação para os grupos enriquecidos em comparação com os controles.

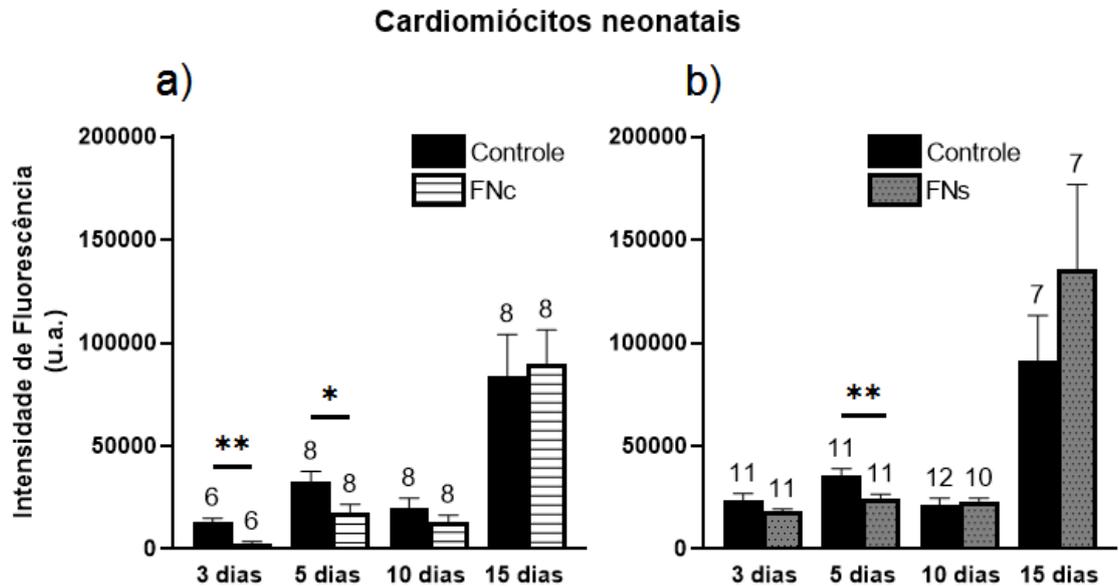


Figura 4. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de cardiomiócitos neonatais de cultura primária após três, cinco, dez e 15 dias. Em **a)** enriquecimento por FNC e em **b)** enriquecimento por FNs. Valores representados pela média \pm EPM. Números acima da barra indicam tamanho da amostra. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Em relação a linhagem H9c2 os dados são referentes aos dias três, cinco, dez e 15, mostrados na **Figura 5**. Diferentes concentrações foram testadas: 5×10^3 e 1×10^4 células/mL. A maioria das comparações não apresentaram diferença significativa, sendo que para o enriquecimento por FNC com três e cinco dias apresentaram diferença significativa com redução de proliferação para os grupos enriquecidos em comparação com os controles.

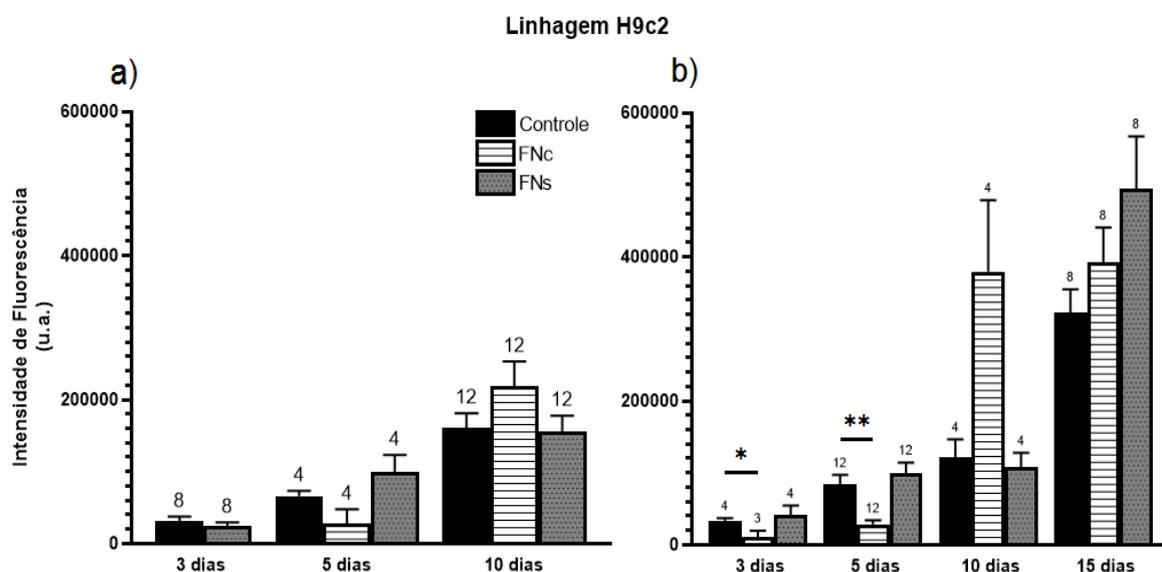


Figura 5: Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) da linhagem H9c2 analisada nas duas formas de enriquecimento (FNC e FNs). Em **a)** após três, cinco e dez dias para concentração 5×10^3 células/mL e em **b)** após três, cinco, dez e 15 dias para concentração 1×10^4 células/mL. Valores representados pela média \pm EPM. Números acima da barra indicam tamanho da amostra. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

A FN é um componente natural da MEC e permite a fixação de outros componentes da MEC. Van Dijk e colaboradores (2008) mostraram que a adesão e proliferação de células estromais derivadas do tecido adiposo em placas são aumentadas quando revestidas com FN $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e cinco $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Janarthanan e colaboradores (2019) desenvolveram filmes à base de PCL associado com partículas de fosfato α -tricálcico e o revestimento com FN aumentou significativamente a proliferação de células estromais mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo.

Embora a FN favoreça a proliferação de muitos tipos celulares, no caso dos cardiomiócitos, nos tempos e na concentração testada, os resultados demonstraram que não. Na **Tabela 1** encontra-se um resumo das comparações entre os grupos controles e os grupos enriquecidos. Percebe-se que a maioria das comparações não apresentou diferença significativa, e quando apresentou foi no sentido de que a presença da FN reduziu a proliferação.

Tabela 1. Análise estatística das células cardíacas comparando os grupos controles e os grupos enriquecidos com FN (FNc e FNs). Foram utilizados três tipos de células cardíacas: cardiomiócitos adultos e neonatais de cultura primária e a linhagem H9c2. As células da linhagem H9c2 foram testadas em diferentes concentrações: 5×10^3 e 10^4 células/mL.

		3 dias	5 dias	10 dias	15 dias
ADULTO	FNs	NS	NS	-	-
	FNc	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,05$	NS	NS
NEONATAL	FNs	NS	$p \leq 0,01$	NS	NS
	FNc	-	NS	NS	-
H9c2 5×10^3	FNs	NS	NS	NS	-
	FNc	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	NS	NS
H9c2 10^4	FNs	NS	NS	NS	NS
	FNc	NS	NS	NS	NS

Legenda: NS = diferença não significativa.

Já foi demonstrado que a hipertrofia cardíaca está relacionada com o acúmulo das proteínas da MEC, que acaba resultando em uma rigidez miocárdica, disfunção ventricular e insuficiência cardíaca. E que a FN está envolvida ativamente nos processos que levam à hipertrofia dos cardiomiócitos (OGAWA et al., 2000). O papel da FN na sinalização molecular, que leva à hipertrofia, está relacionada com a ativação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) via calcinerina (KONSTANDIN et al., 2013).

Os grupos que apresentaram diferença significativa foram das células neonatais após três e cinco dias com o enriquecimento FNc e após cinco dias com o enriquecimento FNs; e células da linhagem H9c2 na concentração 1×10^4 após três e cinco dias com o enriquecimento FNc. Essa diferença pode ter ocorrido devido a hipertrofia cardíaca, mas estudos adicionais por análise morfométrica são necessários para confirmar.

Os hepatócitos foram utilizados como um controle positivo, porque já foi demonstrado que hepatócitos de ratos neonatais e adultos se ligam com alta eficiência em placas revestidas com FN (DESCHÊNES; VALET; MARCEAU, 1980) e que a FN aumenta a síntese de DNA de hepatócitos jovens e adultos (TOMOMURA et al., 1987). Por isso, realizou-se um ensaio com hepatócitos adultos com a forma de enriquecimento FNs na concentração 1×10^5 células/mL após quatro dias. Os resultados demonstraram

diferença significativa, indicando que a presença de FNs favoreceu a proliferação celular (**Figura 6**).

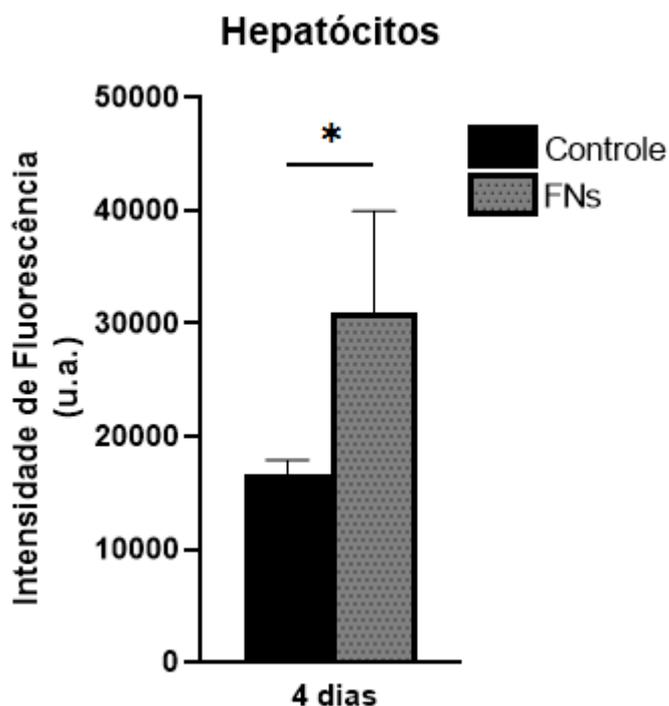


Figura 6. Proliferação celular mostrada como intensidade de fluorescência (em unidades arbitrárias) de hepatócitos após quatro dias na concentração de 1×10^5 células/mL. Valores representados pela média \pm EPM. $n =$ quatro/grupo. *Diferenças estatísticas significativas entre os grupos (* $p \leq 0,05$).

5.2 VIABILIDADE DOS CARDIOMIÓCITOS

A viabilidade celular foi avaliada pelo *Live and Dead Cell Assay Kit* (Abcam ab270789), no qual combina Calcein AM com 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para determinar simultaneamente células vivas e mortas. Esse é um teste fluorescente, sendo que verde identifica células vivas e vermelho identifica células mortas. Além disso, utilizou-se a solução Hoechst para coloração em azul dos núcleos.

A **Figura 7** mostra as imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência invertido das células extraídas de corações neonatais, enquanto a **Figura 8** é referente às células

da linhagem H9c2. Em relação as células extraídas de corações adultos foram realizadas duas tentativas, mas não se observou células.

A primeira linha é referente ao controle positivo, isto é, meio mais as células (**Figura 7a, b, c; Figura 8a, b, c**). Para as células neonatais em relação ao enriquecimento com FN apenas se avaliou ela solúvel ao meio (**Figura 7d, e, f**), enquanto para linhagem se avaliou das duas formas: FNc (**Figura 8d, e, f**) e FNs (**Figura 7g, h, i**), além de realizar o controle negativo (**Figura 8j, k, l**), no qual no dia do ensaio foi adicionado 20 μ L de etanol 70% 30 minutos antes de iniciar a adição das soluções.

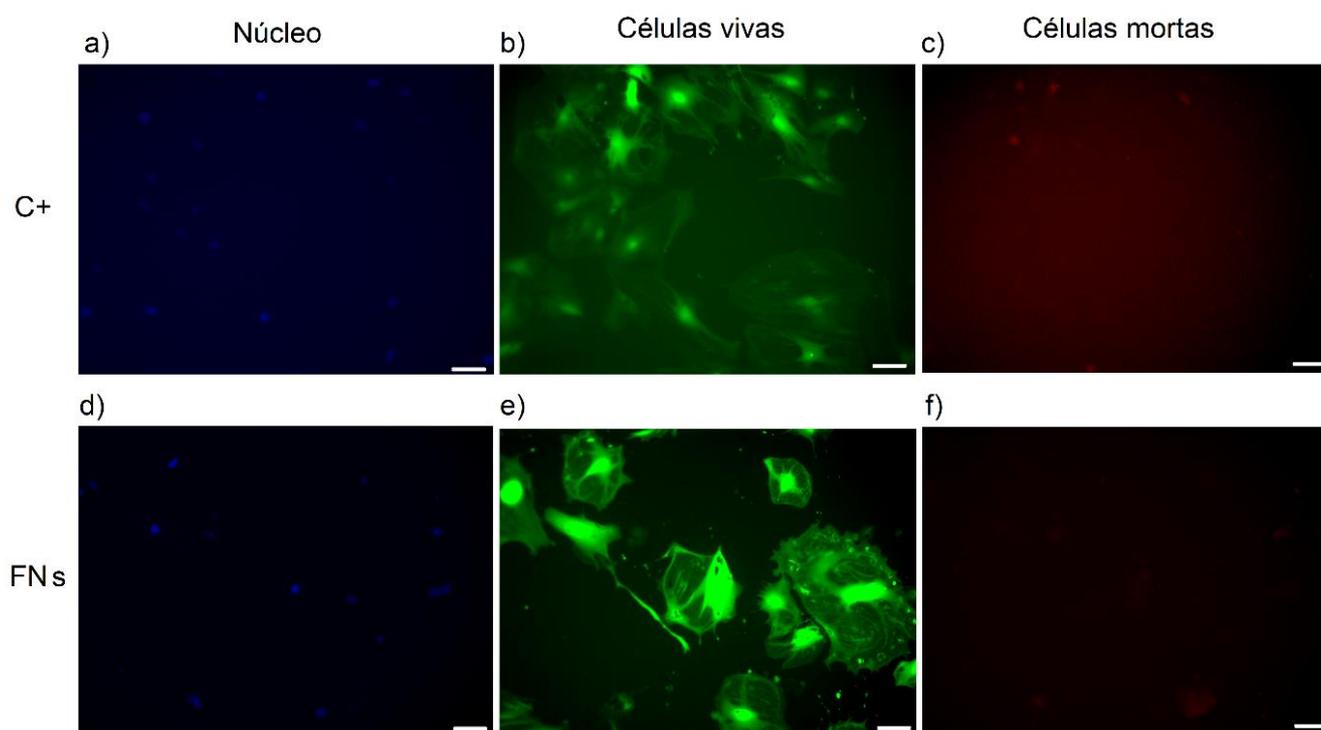


Figura 7. Fotomicrografia após 5 dias em cultura das células extraídas de corações neonatais. Citoplasmas marcados em verde, núcleos marcados em azul e núcleos de células inviáveis marcados em vermelho. Escala da barra = 100 μ m. Legenda: **a) b) e c)** correspondem ao C+ = controle positivo (meio+células); **d) e) e f)** correspondem ao FNs.

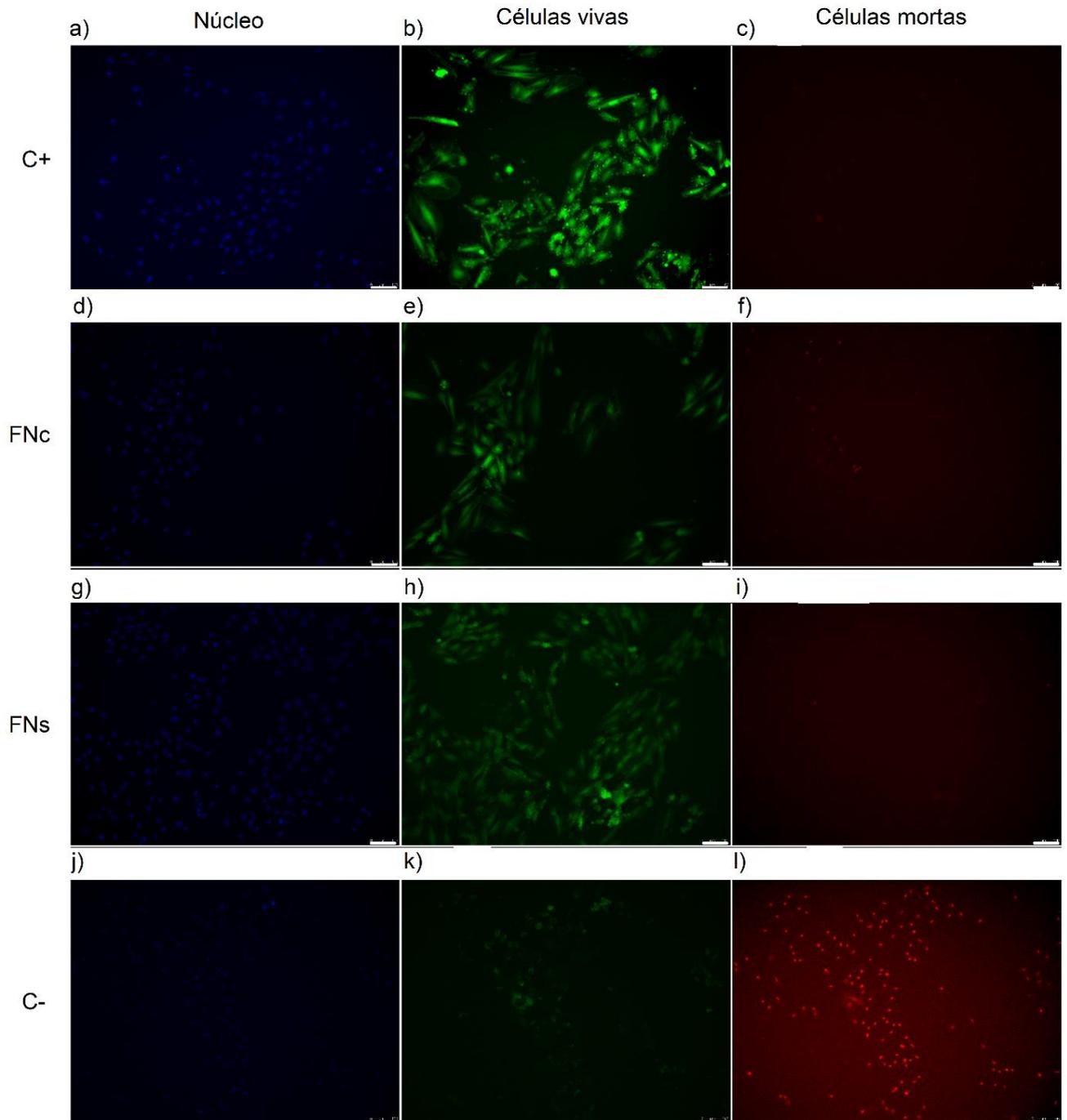


Figura 8. Fotomicrografia após 5 dias em cultura das células linhagem H9c2. Citoplasmas marcados em verde, núcleos marcados em azul e núcleos de células inviáveis marcados em vermelho. Escala da barra = 100 μm . Legenda: **a) b) e c)** correspondem ao C+ = controle positivo (meio+células); **d) e) e f)** correspondem ao FNc; **g) h) e i)** correspondem ao FNs; **j) k) e l)** correspondem ao C-: controle negativo adição de etanol para matar as células.

Após a contagem das células foi possível realizar uma análise quantitativa, na qual calculou-se a viabilidade celular por meio da Fórmula 1. Os resultados demonstraram

que não houve diferença significativa entre os grupos controle e enriquecidos com FN (Figura 9).

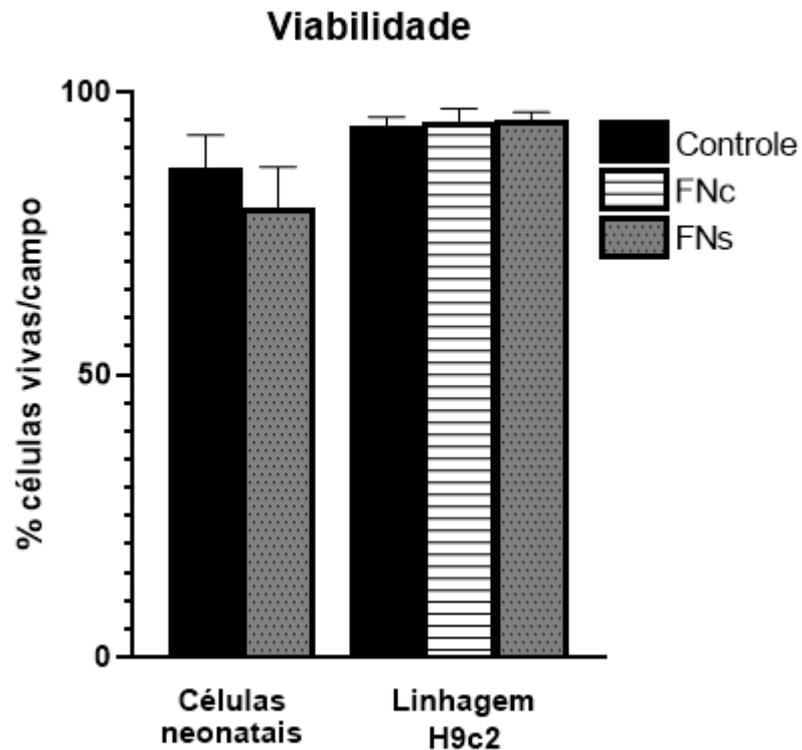


Figura 9. Médias do percentual de células vivas/campo nos diferentes grupos. Valores representados pela média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos; n = quatro/grupo.

5.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CARDIOMIÓCITOS

Os cardiomiócitos sofrem mudanças em sua morfologia durante a maturação. Nos primeiros anos de vida, elas são pequenas, semelhantes a paralelepípedos e euploides. Em humanos adultos, essas células são grandes, alongadas e poliploides. Além disso, já foi observada binucleação na 32ª semana de gestação em um coração infantil humano com menos de um dia de idade (MURPHY et al., 2021).

Sua morfologia muda quando em cultura, após o isolamento e plaqueamento. Além de haver uma perda significativa, cerca de 50-70% do número total de células, em

uma semana, suas extremidades se tornam arredondadas, seu tamanho é diminuído e as estrias se tornam indistintas (LOUCH; SHEEHAN; WOLSKA, 2011).

No caso das células adultas, após o isolamento elas são estriadas e apresentam a forma de bastonete (GRAHAM et al., 2013). No dia da extração dos cardiomiócitos adultos foi possível observar as estrias (**Figura 10a**) e a presença de batimento voluntário. Depois de alguns dias em cultura é possível observar a aderência celular (**Figura 10b**).

Cardiomiócitos adultos

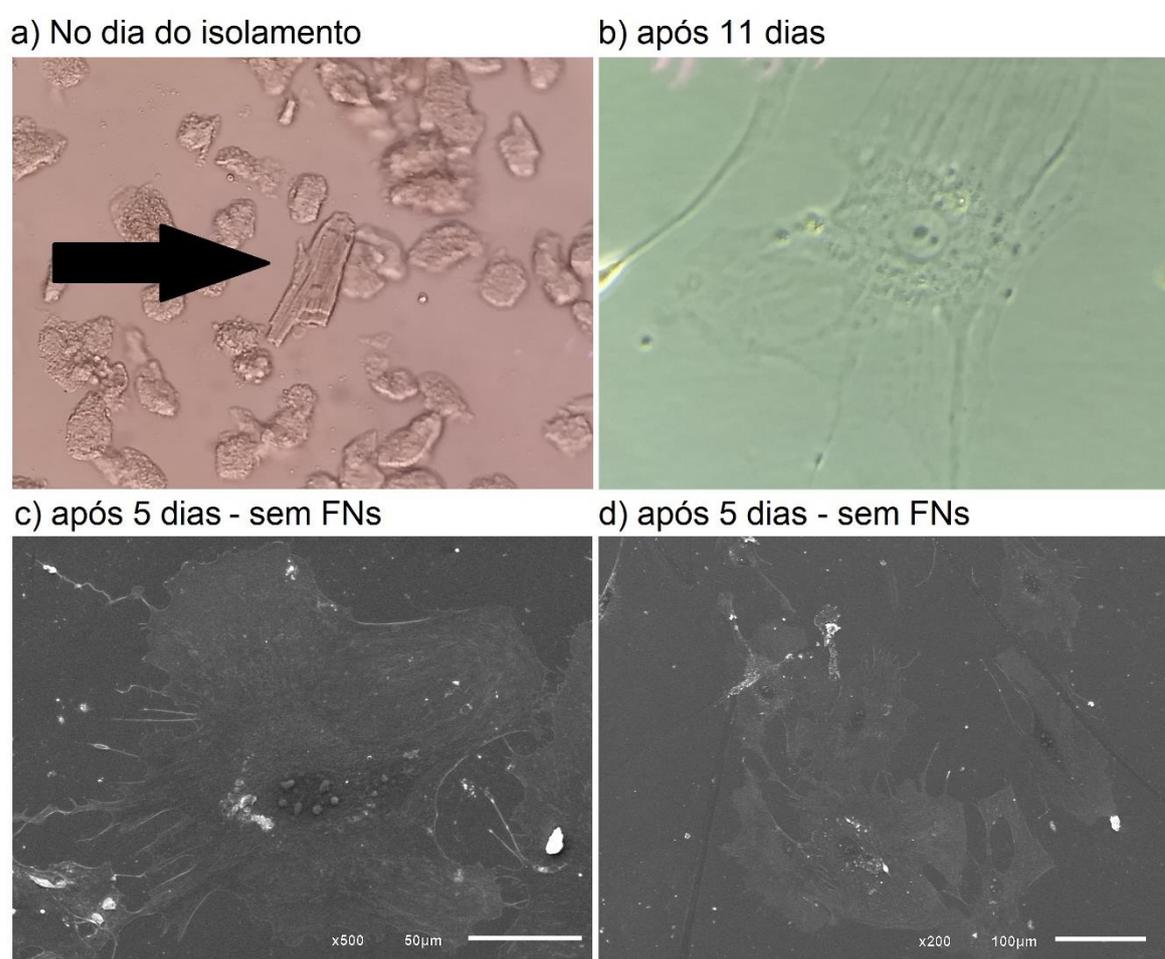


Figura 10. Fotomicrografias de cardiomiócitos adultos. Em **a**) logo após o isolamento e em **b**) após 11 dias em cultura, ambas obtidas em microscópio invertido (Microscópio Zeiss Axio Observer) magnificação de 400x. Já **c**) e **d**) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala: em **c**) igual a 50 μm e em **d**) igual a 100 μm.

Em relação aos cardiomiócitos neonatais, no dia da extração observou-se células arredondadas em suspensão, que após um dia (**Figura 11a**) em cultura já era possível

ver algumas aderidas à garrafa de cultura. Após três dias observou-se células multinucleadas (**Figura 11b**). As células também foram observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (**Figura 11c e d**).

Cardiomiócitos neonatais

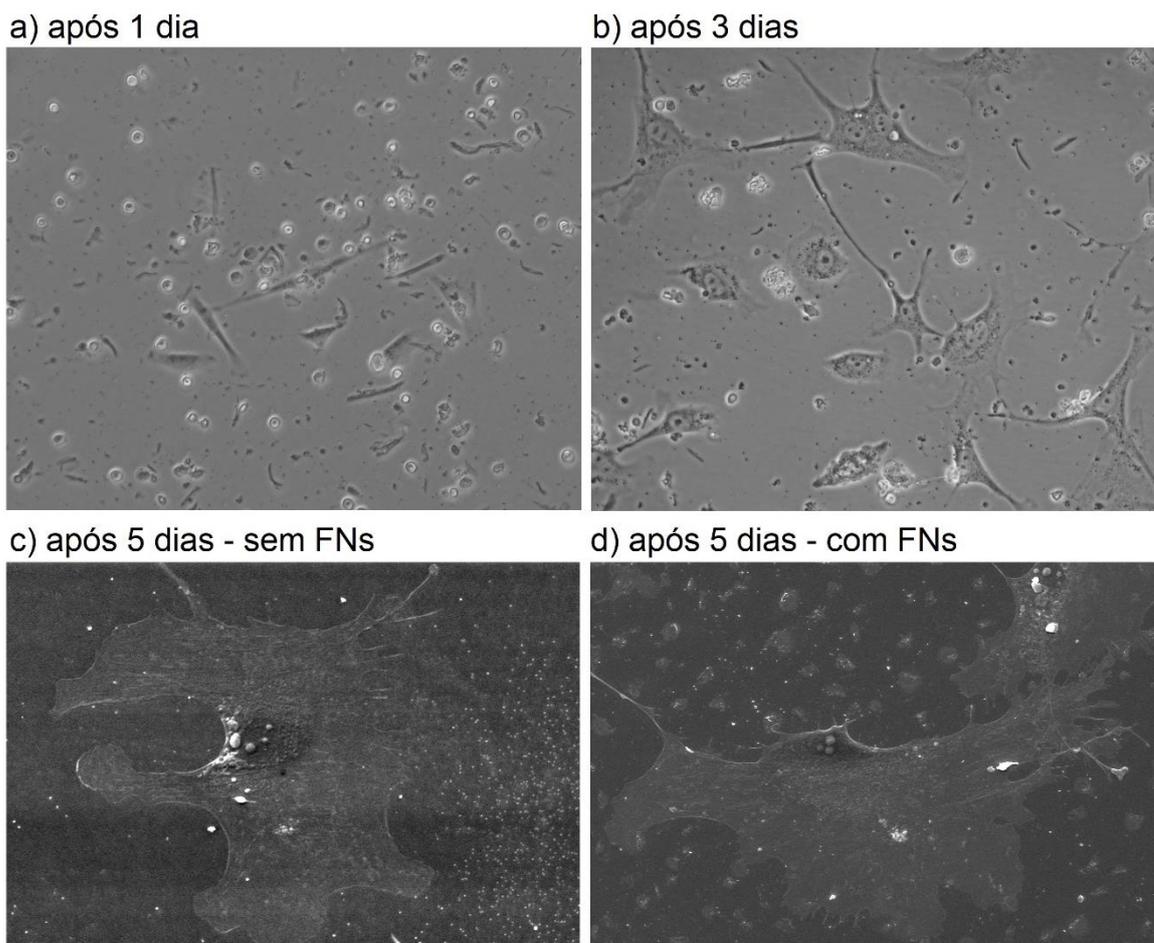


Figura 11. Fotomicrografias de cardiomiócitos neonatais. Em **a**) após um dia do isolamento e em **b**) após 3 dias, ambas obtidas pelo Microscópio Zeiss Axio Observer com aumento de 200x. Já **c**) e **d**) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura após 5 dias em cultura. Em **c**) são cardiomiócitos do grupo controle, cultivado apenas com meio e em **d**) grupo enriquecido com FNs. Barra de escala: em **c**) e **d**) igual a 100 μ m.

Ao comparar com outros trabalhos (ALAM et al., 2020; GRAHAM et al., 2013; KRAMER et al., 2020; LOUCH; SHEEHAN; WOLSKA, 2011; NIPPERT; SCHRECKENBERG; SCHLÜTER, 2017; YÜCEL; SOLINSKY; VAN BERLO, 2020) é possível ver a semelhança e caracterizar as células como cardiomiócitos. Embora análises de imunocitoquímica seriam mais precisas, mas a aquisição da linhagem H9c2 (**Figura 12**) possibilitou trabalhar com a certeza de que são cardiomiócitos.

Linhagem H9c2

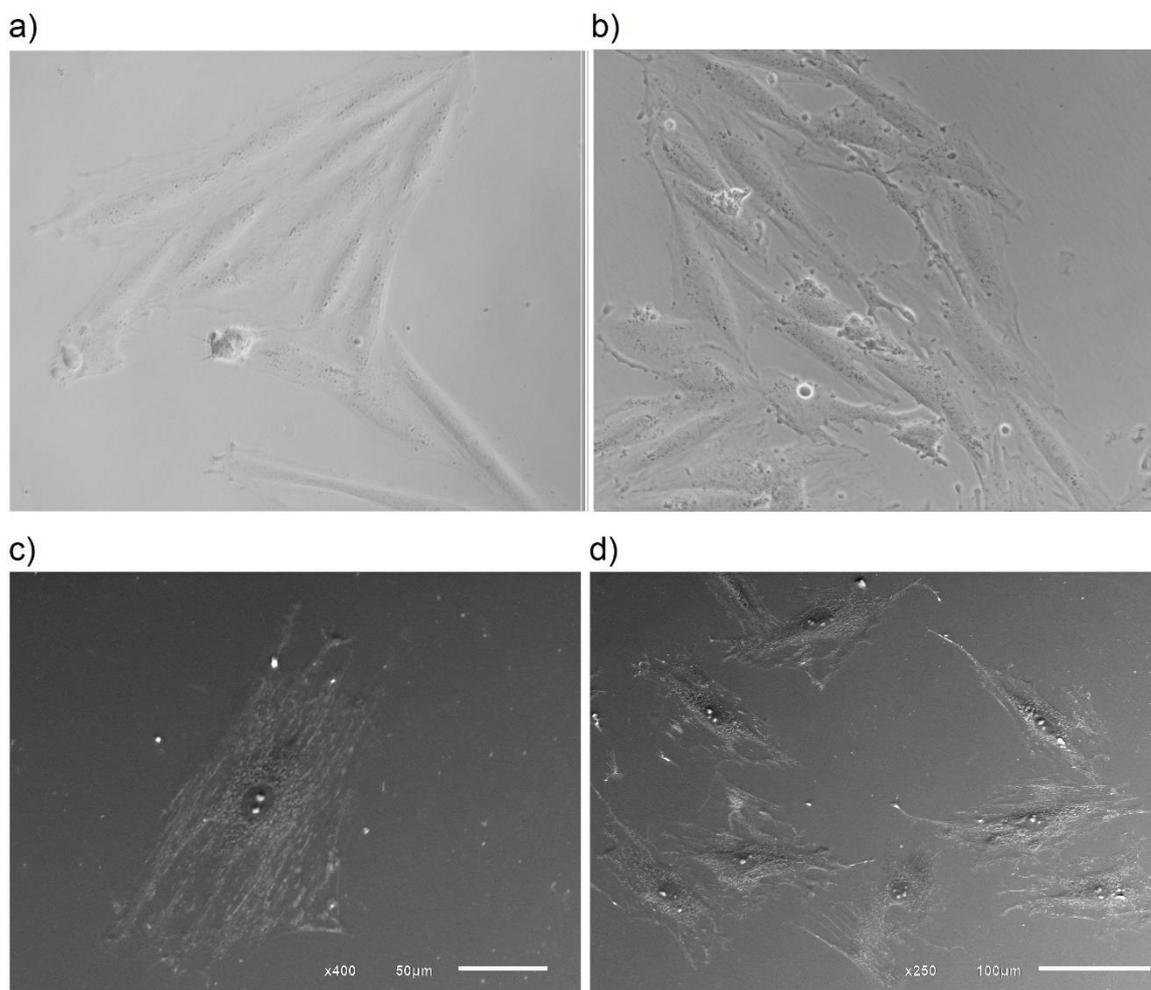


Figura 12. Fotomicrografias de cardiomiócitos da linhagem H9c2. Em **a)** são cardiomiócitos do grupo controle e em **b)** grupo enriquecido com FNs, ambas obtidas pelo Microscópio Zeiss Axio Observer com magnificação de 200x após 5 dias em cultura. Já **c)** e **d)** foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura. Barra de escala: em **c)** igual a 50 μm e em **d)** igual a 100 μm.

5.4 PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS

Um dos objetivos do trabalho foi o desenvolvimento de hidrogéis derivados de MEC cardíaca descelularizada com expectativa de enriquecer *scaffolds* e analisar se a sua presença favoreceria a proliferação celular dos cardiomiócitos. Mas diante da não formação do hidrogel (dados demonstrados no Apêndice A) testou-se apenas o enriquecimento com FN.

6 CONCLUSÕES

A caracterização morfológica confirmou a presença de cardiomiócitos nas culturas utilizadas e alta viabilidade das mesmas. No teste *in vitro* a FN não favoreceu a proliferação dos cardiomiócitos e em alguns grupos houve redução da proliferação celular. O que pode ser explicado pela FN contribuir para a hipertrofia cardíaca patológica. Quando realizou o enriquecimento com outro tipo celular, os hepatócitos, houve aumento da proliferação na presença da FN.

Com isso, percebe-se que a influência da FN sobre os cardiomiócitos na concentração e nos tempos testados não é vantajosa para proliferação celular. Como a proposta é o desenvolvimento de um sistema que além da descelularização e recelularização promova o enriquecimento de *scaffolds* com FN, esse trabalho evidencia o foco para outros órgãos e tipos celulares. Ou se continuar no tecido cardíaco testar outro componente, por exemplo, colágeno, laminina, periostina ou vitronectina.

Quanto à produção do hidrogel derivado de matriz cardíaca descelularizada de camundongos ainda não se atingiu a consistência de hidrogel, o que exige mais tentativas. Recomenda-se que os próximos estudos testem métodos de descelularização e digestão com tempos menores para danificar menos a MEC e trocar o modelo animal para suíno.

REFERÊNCIAS

- ABDULGHANI, S.; MITCHELL, G. Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 750, 19 nov. 2019.
- ALAM, P. et al. Isolation, Transfection, and Long-Term Culture of Adult Mouse and Rat Cardiomyocytes. **Journal of Visualized Experiments**, n. 164, 10 out. 2020.
- ALI, H.; BRAGA, L.; GIACCA, M. Cardiac regeneration and remodelling of the cardiomyocyte cytoarchitecture. **The FEBS Journal**, v. 287, n. 3, p. 417–438, 6 fev. 2020.
- AZIYOBIOLOGICS. **Comparison of Participants Who Received a CanGaroo® Envelope, TYRX™ Envelope, or no Envelope During CIED Implantation (HEAL)** EUANCT04645173, , 2020. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04645173?term=ecm&recrs=a&cond=Heart+Diseases&draw=2&rank=1#contacts>>
- BAČÁKOVÁ, L.; NOVOTNÁ, K.; PAŘÍZEK, M. Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: the use of cellulose in vascular wall reconstruction. **Physiological research**, v. 63 Suppl 1, p. S29-47, 2014.
- BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 27–53, 15 ago. 2011.
- BHASKAR, B. et al. (EDS.). **Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Singapore: Springer Singapore, 2021.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Portaria Conjunta nº 17, de 18 de novembro de 2020. Aprova as Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/pcdt/arquivos/2021/portaria-conjunta-17_18_11_2020_diretrizes-brasileiras-icfer__-1.pdf>. Acesso em: 26 jul. 2022.
- BRASIL. **Coração (Ministério da Saúde)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt/coracao>>. Acesso em: 5 jan. 2022.
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 2, n. 2, p. 67–77, 1 fev. 2002.
- CHOUDHURY, D. et al. Decellularization systems and devices: State-of-the-art. **Acta Biomaterialia**, v. 115, p. 51–59, out. 2020.
- COHEN, S. et al. Design of synthetic polymeric structures for cell transplantation and tissue engineering. **Clinical Materials**, v. 13, n. 1–4, p. 3–10, jan. 1993.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, abr. 2011.

CUCIELO, M. S. **Formação de Invadopódios na Migração de Células Neoplásicas Malignas Expostas à Fibronectina**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

DERRICK, C. J.; NOËL, E. S. The ECM as a driver of heart development and repair. **Development**, v. 148, n. 5, 1 mar. 2021.

DESCHÊNES, J.; VALET, J.-P.; MARCEAU, N. Hepatocytes from newborn and weanling rats in monolayer culture: Isolation by perfusion, fibronectin-mediated adhesion, spreading, and functional activities. **In Vitro**, v. 16, n. 8, p. 722–729, ago. 1980.

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOGIANNIS, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 3, p. 504–511, mar. 2010.

EFRAIM, Y. et al. Biohybrid cardiac ECM-based hydrogels improve long term cardiac function post myocardial infarction. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 220–233, mar. 2017.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

FREYTES, D. O. et al. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1630–1637, abr. 2008.

FU, J. et al. An Optimized Protocol for Culture of Cardiomyocyte from Neonatal Rat. **Cytotechnology**, v. 49, n. 2–3, p. 109–116, out. 2005.

GILBERT, T.; SELLARO, T.; BADYLAK, S. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, 7 mar. 2006.

GRAHAM, E. L. et al. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Adult Mouse Cardiomyocytes. **Journal of Visualized Experiments**, n. 79, 24 set. 2013.

GUATIMOSIM, S. et al. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca²⁺ current. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 280, n. 5, p. C1327–C1339, 1 maio 2001.

GUPTA, S. K.; MISHRA, N. C.; DHASMANA, A. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. In: [s.l.: s.n.]. p. 1–10.

GURUSWAMY DAMODARAN, R.; VERMETTE, P. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p.

1494–1505, 8 nov. 2018.

GUYETTE, J. P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature Protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451–1468, 29 jun. 2014.

GUYETTE, J. P. et al. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. **Circulation Research**, v. 118, n. 1, p. 56–72, 8 jan. 2016.

HESSE, M.; WELZ, A.; FLEISCHMANN, B. K. Heart regeneration and the cardiomyocyte cell cycle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 470, n. 2, p. 241–248, 28 fev. 2018.

HUSSEIN, K. H. et al. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 766–778, out. 2016.

HYNES, R. O.; YAMADA, K. M. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. **The Journal of cell biology**, v. 95, n. 2 Pt 1, p. 369–377, 1982.

IEDA, M. et al. Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through β 1 Integrin Signaling. **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 233–244, fev. 2009.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, n. 10, p. 589–601, 22 out. 2006.

JANARTHANAN, G. et al. Comparative studies on thin polycaprolactone-tricalcium phosphate composite scaffolds and its interaction with mesenchymal stem cells. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 1, p. 1, 3 dez. 2019.

KHANG, G. **Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Second Edition**. 2. ed. [s.l.] Pan Stanford, 2017.

KIM, Y. S. et al. An Overview of the Tissue Engineering Market in the United States from 2011 to 2018. **Tissue Engineering Part A**, v. 25, n. 1–2, p. 1–8, jan. 2019.

KITAHARA, H. et al. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v. 22, n. 5, p. 571–579, maio 2016.

KLIMEK, K.; GINALSKA, G. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications—A Review. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 844, 6 abr. 2020.

KONSTANDIN, M. H. et al. Fibronectin contributes to pathological cardiac hypertrophy but not physiological growth. **Basic Research in Cardiology**, v. 108, n. 5, p. 375, 4 set. 2013.

KRAMER, J. P. M. et al. Recombinant spider silk protein eADF4(C16)-RGD coatings are suitable for cardiac tissue engineering. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8789, 29 dez. 2020.

LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 14 maio 1993.

LANZA, R. et al. **Principles of Tissue Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2020.

LEE, S. J.; YOO, J. J.; ATALA, A. Biomaterials and Tissue Engineering. In: **Clinical Regenerative Medicine in Urology**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 17–51.

LI, Y.; ASFOUR, H.; BURSAC, N. Age-dependent functional crosstalk between cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in a 3D engineered cardiac tissue. **Acta Biomaterialia**, v. 55, p. 120–130, jun. 2017.

LIAO, J. et al. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 44, p. 10023–10049, 2020.

LINDSEY, M. L. et al. Proteomic analysis of the cardiac extracellular matrix: clinical research applications. **Expert Review of Proteomics**, v. 15, n. 2, p. 105–112, 9 fev. 2018.

LOUCH, W. E.; SHEEHAN, K. A.; WOLSKA, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 51, n. 3, p. 288–298, set. 2011.

MENDIBIL, U. et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5447, 30 jul. 2020.

MURPHY, S. A. et al. Maturing heart muscle cells: Mechanisms and transcriptomic insights. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 119, p. 49–60, nov. 2021.

NCBI. **FN1 fibronectina 1 [Homo sapiens (humano)]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2335>>. Acesso em: 4 jul. 2022.

NG, S. L. J. et al. Lineage restricted progenitors for the repopulation of decellularized heart. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7571–7580, out. 2011.

NIPPERT, F.; SCHRECKENBERG, R.; SCHLÜTER, K.-D. Isolation and Cultivation of Adult Rat Cardiomyocytes. **Journal of Visualized Experiments**, n. 128, 19 out. 2017.

OGAWA, E. et al. Outside-in Signalling of Fibronectin Stimulates Cardiomyocyte Hypertrophy in Cultured Neonatal Rat Ventricular Myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 5, p. 765–776, maio 2000.

OGLE, B. M. et al. Distilling complexity to advance cardiac tissue engineering. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 342, p. 342ps13-342ps13, 8 jun. 2016.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer

a bioartificial heart. **Nature Medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–221, 13 fev. 2008.

OZCEBE, S. G. et al. Effect of cellular and ECM aging on human iPSC-derived cardiomyocyte performance, maturity and senescence. **Biomaterials**, v. 268, p. 120554, jan. 2021.

PAEZ-MAYORGA, J. et al. Bioreactors for Cardiac Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 7, p. 1701504, 8 abr. 2019.

PAYAN, S. M.; HUBERT, F.; ROCHAIS, F. Cardiomyocyte proliferation, a target for cardiac regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 3, p. 118461, mar. 2020.

PEREIRA, H. et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine Strategies in Meniscus Lesions. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 27, n. 12, p. 1706–1719, dez. 2011.

PINA, S. et al. Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. **Materials**, v. 12, n. 11, p. 1824, 5 jun. 2019.

PONNUSAMY, M.; LI, P.-F.; WANG, K. Understanding cardiomyocyte proliferation: an insight into cell cycle activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 6, p. 1019–1034, 30 mar. 2017.

RABBANI, M.; ZAKIAN, N.; ALIMORADI, N. Contribution of physical methods in decellularization of animal tissues. **Journal of Medical Signals & Sensors**, v. 11, n. 1, p. 1, 2021.

RBT. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado. **ABTO**, v. XXVI, n. 4, p. 88, 2020.

RBT. Dados Numéricos da doação de órgãos e transplantes realizados por estado e instituição no período: JANEIRO / MARÇO - 2022. **ABTO**, v. XXVIII, n. 1, p. 23, 2022.

REIS, F. H. Z. DOS. **Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2014.

SALDIN, L. T. et al. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 49, p. 1–15, fev. 2017.

SALTZMAN, W. M. **Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues**. [s.l.] Oxford university press, 2004.

SEIF-NARAGHI, S. B. et al. Safety and Efficacy of an Injectable Extracellular Matrix Hydrogel for Treating Myocardial Infarction. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 173, 20 fev. 2013.

SHAFIEE, A.; ATALA, A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine.

Annual Review of Medicine, v. 68, n. 1, p. 29–40, 14 jan. 2017.

SILVA, A. C. et al. Bearing My Heart: The Role of Extracellular Matrix on Cardiac Development, Homeostasis, and Injury Response. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 12 jan. 2021.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. [s.l.] Artmed, 2010.

SOMUNCU, Ö. S. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. In: [s.l.: s.n.]. p. 71–85.

SPANG, M. T.; CHRISTMAN, K. L. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. **Acta Biomaterialia**, v. 68, p. 1–14, mar. 2018.

STOPPEL, W. L. et al. Elastic, silk-cardiac extracellular matrix hydrogels exhibit time-dependent stiffening that modulates cardiac fibroblast response. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 12, p. 3058–3072, dez. 2016.

THEUS, A. S. et al. Biomaterial approaches for cardiovascular tissue engineering. **Emergent Materials**, v. 2, n. 2, p. 193–207, 29 jun. 2019.

TOLLEMAR, V. et al. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 1, p. 56–71, mar. 2016.

TOMOMURA, A. et al. The control of DNA synthesis in primary cultures of hepatocytes from adult and young rats: Interactions of extracellular matrix components, epidermal growth factor, and the cell cycle. **Journal of Cellular Physiology**, v. 130, n. 2, p. 221–227, fev. 1987.

TRAVERSE, J. H. et al. First-in-Man Study of a Cardiac Extracellular Matrix Hydrogel in Early and Late Myocardial Infarction Patients. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 4, n. 6, p. 659–669, out. 2019.

ULLAH, S.; CHEN, X. Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. **Applied Materials Today**, v. 20, p. 100656, set. 2020.

UNGERLEIDER, J. L. et al. Fabrication and characterization of injectable hydrogels derived from decellularized skeletal and cardiac muscle. **Methods**, v. 84, p. 53–59, ago. 2015.

VAN DIJK, A. et al. Accumulation of fibronectin in the heart after myocardial infarction: a putative stimulator of adhesion and proliferation of adipose-derived stem cells. **Cell and Tissue Research**, v. 332, n. 2, p. 289–298, 28 maio 2008.

VENTRIX. **A Study of VentiGel in Post-MI Patients** California, 2014. Disponível em:

<<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT02305602?term=hydrogel&cond=Heart+Failure&draw=2&rank=7>>

WAINWRIGHT, J. M. et al. Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 3, p. 525–532, jun. 2010.

WANG, J. et al. Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration. **Developmental Biology**, v. 382, n. 2, p. 427–435, out. 2013.

WASSENAAR, J. W. et al. Evidence for Mechanisms Underlying the Functional Benefits of a Myocardial Matrix Hydrogel for Post-MI Treatment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 9, p. 1074–1086, mar. 2016.

WHO. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 5 jan. 2022.

WILLIAMS, C. et al. Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 194–204, jan. 2014.

WOBMA, H.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 22, n. 2, p. 101–113, abr. 2016.

YÜCEL, D.; SOLINSKY, J.; VAN BERLO, J. H. Isolation of Cardiomyocytes from Fixed Hearts for Immunocytochemistry and Ploidy Analysis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 164, 7 out. 2020.

APÊNDICE A

PRODUÇÃO DOS HIDROGÉIS

O foco inicial do trabalho foi o desenvolvimento de hidrogéis derivados de MEC cardíaca descelularizada. Por se aproximar da complexidade do ambiente nativo a expectativa era enriquecer *scaffolds*, também produzidos a partir de corações descelularizados, com esse hidrogel e analisar se sua presença favoreceria a adesão e proliferação celular no processo de recelularização.

Para isso 16 corações de camundongos adultos e 21 de neonatais foram descelularizados. Com o material adulto foi possível realizar oito testes para formação do hidrogel (**Tabela 2**).

Tabela 2. Resumo das tentativas de produção do hidrogel derivado de MEC cardíaca adulta descelularizada.

Tentativas	Conc. do pó liofilizado (mg/mL)	Conc. da enzima (mg/mL)	pH ácido	Tempo de digestão (horas)
Do protocolo	10	1	HCl	48
1	10	1	HCl	50
2	10	1	HCl	60
3	10	1	AA	50
4	10	1	Tampão biftalato	60
5	10	1	Tampão biftalato	70
6	21,2	2,42	AA	70
7	133,7	33	AA	1 semana
8	10	1	HCl	70

Em nenhuma das tentativas foi possível observar formação do hidrogel, a consistência sempre se manteve líquida. Na primeira tentativa, seguindo os parâmetros do

protocolo base, percebeu-se um residual de MEC, como se não tivesse sido digerida, então nos próximos testes aumentou-se o tempo de digestão.

Diante da não formação do hidrogel, escolheu-se avaliar se o pH durante a etapa de digestão estava na faixa ideal da pepsina, conforme o fabricante: entre dois e quatro. Analisou-se o HCl (0,01 M), AA (1 M) e o tampão biftalato. O HCl apresentou pH abaixo de dois, o AA foi o que se manteve na faixa durante toda a digestão e o tampão biftalato apresentou pH acima de 4.

Mesmo mantendo o pH dentro da faixa ideal, não houve a formação de hidrogel. Então testou-se aumentar em duas vezes a quantidade de MEC liofilizada e enzima, mas mantendo a mesma proporção entre elas. Depois a próxima tentativa foi aumentar bastante a quantidade de MEC liofilizada: tanto em relação ao volume total, quanto em relação a quantidade de enzima.

Nesse teste também se aumentou o tempo de digestão e a quantidade de enzima que começou em um e foi até 33 mg/ml. Após uma semana foi possível perceber a digestão de toda a MEC, mas novamente na etapa final para formação do hidrogel, a mistura continuou líquida.

O protocolo utilizado como base tinha como modelo animal suínos e nesse trabalho foram utilizados camundongos. Esse pode ter sido um fator dificultador, já que apresentam composições diferentes. A formação do hidrogel derivado de MEC descelularizada é baseada na formação de redes de colágeno, então pode ser que os corações de camundongos apresentem uma quantidade insuficiente de colágeno para formação do hidrogel.

Além de ser um processo de automontagem baseado em colágeno, esse processo também é regulado pela presença de GAG's, proteoglicanos e proteínas gerais da MEC, então o processo de descelularização e digestão devem manter, na medida do possível, a composição do tecido nativo (SALDIN et al., 2017). E pode ser que o protocolo utilizado afetou negativamente a capacidade de formação do hidrogel, retirando ou degradando os componentes necessários para formação da rede do hidrogel.

E outro fator dificultador é utilizar camundongo como modelo animal, pois são necessários muitos corações descelularizados para obter uma pequena quantidade de pó liofilizado, ainda mais quando se trabalha com animais neonatos. Quatro corações adultos descelularizados, moídos e liofilizados resultaram em 31 mg de pó, enquanto 14 corações neonatos resultaram em 2,9 mg de pó. Quantidades muito pequenas, que limitam bastante a realização dos testes e repetições.