



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

GABRIEL HENRIQUE TAUFNER

**DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
ENRIQUECIDA COM FIBRONECTINA PLASMÁTICA HUMANA**

VITÓRIA – ES

2023

GABRIEL HENRIQUE TAUFNER

**DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
ENRIQUECIDA COM FIBRONECTINA PLASMÁTICA HUMANA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) – Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA – ES
2023

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

T222d Taufner, Gabriel Henrique, 1994-
Desenvolvimento de coração bioartificial a partir de arcabouço de matriz extracelular descelularizada enriquecida com fibronectina plasmática humana / Gabriel Henrique Taufner. - 2023.
90 f. : il.

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

1. Descelularização. 2. Fibronectina. 3. Espectroscopia Raman. I. Nogueira, Breno Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

GABRIEL HENRIQUE TAUFNER

**DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE
ARCABOUÇO DE MATRIZ EXTRACELULAR DESCELULARIZADA
ENRIQUECIDA COM FIBRONECTINA PLASMÁTICA HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO)
– Ponto focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Camilo Arturo Rodríguez Díaz
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Adilson Ribeiro Prado
Instituto Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Marcelo Perim Baldo
Universidade Estadual de Montes Claros

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Deus por sempre guiar meus passos.

À Ariany, minha esposa, namorada, amiga, conselheira e companheira de todos os momentos.

À minha família, em especial minha mãe Gizella e aos meus avós.

Ao meu querido orientador e inspiração Professor Breno Valentim Nogueira, que acima de tudo é um grande amigo e parceiro.

Aos professores com quem pude aprender durante meu ciclo no doutorado, em especial Marco Guimarães, Jairo Pinto e Adilson Ribeiro.

A todos os amigos e colegas de laboratório da família LUCCAR, em especial Bruno, Rodolpho, Afrânio, Tadeu, Flávio, Danilo, Suely, Wanderson e Ézio.

Aos laboratórios parceiros, em especial ao Laboratório de Química (IFES Campus Serra), sob direção do querido Prof. Adilson Ribeiro Prado, e ao Laboratório de Nanotecnologia, Nanobiolab, sob direção dos queridos Prof. Jairo Pinto e Prof. Marco Guimarães.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Edital nº06/2019 – PRONEM, T.O. 508/2020).

Ao apoio institucional da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).

RESUMO

TAUFNER, G.H. **Desenvolvimento de coração bioartificial a partir de arcabouço de matriz extracelular descelularizada enriquecida com fibronectina plasmática humana.** 2023. 90f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, UFES, Espírito Santo, Brasil.

A reconstrução de órgãos complexos após a descelularização apresenta como maior desafio a entrega, adesão, proliferação e diferenciação de células. Para ter êxito no processo é preciso mimetizar ao máximo o microambiente *in vivo*. É sabido que a descelularização é capaz de remover biomoléculas importantes na morfofisiologia do órgão, tal qual os glicosaminoglicanos e glicoproteínas como a fibronectina. A fibronectina remanescente na matriz extracelular após o processo de descelularização pode não ser suficiente para promover de maneira satisfatória o processo de reconstrução tecidual, principalmente se o arcabouço se encontrar em estágio adulto de desenvolvimento, onde sabidamente a composição da referida glicoproteína é reduzida. Em nosso estudo obtivemos arcabouço descelularizados para investigar a influência da fibronectina plasmática humana na reconstrução do coração de camundongo adulto. Demonstramos que os arcabouços descelularizados se apresentaram consideravelmente preservados no que tange a sua composição biomolecular matrissomal. Ressaltamos a manutenção da molécula de hidroxiprolina, encontrada em concentração de $5.509 \pm 818,13$ vs. 4.881 ± 1.487 $\mu\text{g}/\text{peso seco total}$ em órgão adulto descelularizado e controle respectivamente. Em relação aos arcabouços descelularizados neonatais, observamos a manutenção da hidroxiprolina quando comparado ao seu controle nativo ($330,5 \pm 17,60$ vs. $273,9 \pm 12,30$ $\mu\text{g}/\text{peso seco total}$). Além das biomoléculas matrissomais, ressaltamos a notável redução de DNA (83,63% e 93% em neonatal e adulto respectivamente) e SDS residual (33,92% e 96,44% em neonatal e adulto respectivamente), interferentes do processo de reconstrução. Investigamos a utilização de abordagem analítica não destrutiva para tecidos descelularizados: a espectroscopia Raman, cujos resultados corroboraram as análises espectrofotométricas de biomoléculas matrissomais. Estabelecemos estratégia eficaz para recomposição da fibronectina em arcabouço descelularizados adultos, entretanto, constatamos que apesar do sucesso na recomposição da glicoproteína, não encontramos significância estatística após a reconstrução dos

órgãos a partir de células da linhagem H9c2. Diante deste último achado, sugerimos estudos adicionais capazes de investigar outras classes de fibronectina. Além disso, também é necessário investigar populações celulares além da linhagem H9c2.

Palavras-chave: Descelularização, Fibronectina, Espectroscopia Raman.

ABSTRACT

TAUFNER, G.H. **Development of a bioartificial heart from a decellularized extracellular matrix framework enriched with human plasmatic fibronectin.** 2023. 90f. Thesis (Doctoral Program in Biotechnology) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, UFES, Espírito Santo, Brazil.

The reconstruction of complex organs after decellularization presents as the greatest challenge the delivery, adhesion, proliferation and differentiation of cells. To succeed in the process, it is necessary to mimic the in vivo microenvironment as much as possible. It is known that decellularization is capable of removing important biomolecules in the morphophysiology of the organ, such as glycosaminoglycans and glycoproteins such as fibronectin. Fibronectin remaining in the extracellular matrix after the decellularization process may not be sufficient to satisfactorily promote the tissue reconstruction process, especially if the scaffold is in the adult stage of development, where the composition of said glycoprotein is known to be reduced. In our study, we obtained decellularized scaffolds to investigate the influence of human plasma fibronectin on adult mouse heart reconstruction. We demonstrated that the decellularized scaffolds were considerably preserved in terms of their matrix biomolecular composition. We emphasize the maintenance of the hydroxyproline molecule, found in a concentration of $5,509 \pm 818.13$ vs. $4,881 \pm 1,487$ $\mu\text{g}/\text{total dry weight}$ in decellularized adult organ and control respectively. Regarding neonatal decellularized scaffolds, we observed maintenance of hydroxyproline when compared to its native control (330.5 ± 17.60 vs. 273.9 ± 12.30 $\mu\text{g}/\text{total dry weight}$). In addition to matrix biomolecules, we emphasize the remarkable reduction of DNA (83.63% and 93% in neonatal and adult respectively) and residual SDS (33.92% and 96.44% in neonatal and adult respectively), interfering with the reconstruction process. We investigated the use of a non-destructive analytical approach for decellularized tissues: Raman spectroscopy, whose results corroborated the spectrophotometric analyzes of matrix biomolecules. We established an effective strategy for the recomposition of fibronectin in adult decellularized scaffolds, however, we found that despite the success in the recomposition of the glycoprotein, we did not find statistical significance after the reconstruction of the organs from cells of the H9c2 lineage. Given this last finding, we suggest additional studies capable of investigating other classes of

fibronectin. Furthermore, it is also necessary to investigate cell populations beyond the H9c2 lineage.

Keywords: Decellularization, Fibronectin, Raman Spectroscopy.

LISTA DE SIGLAS

µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometros
AH	Ácido Hialurônico
BMP2	Proteína Morfogenética Óssea (<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>)
cm⁻¹	Centrímetros ⁻¹
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FN	Fibronectina
g	Gramas
GAG	Glicosaminoglicanos
GLY	Glicina (<i>glycine</i>)
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HYP	Hidroxi prolina (<i>hydroxyproline</i>)
iPSCs	Células Tronco Pluripotentes Induzidas
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligrama
mg/kg	Miligramas/Kilogramas
mM	Milimolar
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetros
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH	Potencial Hidrogeniônico
PRO	Prolina (<i>proline</i>)
PSA	Penicilina, Streptomicina e Anfotericina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento Beta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema representativo do colágeno e seus aminoácidos constituintes. Prolina (pro), hidroxiprolina (hyp) e glicina (gly). Fonte: próprio autor.29
- Figura 2** – Esquema representativo da fibronectina evidenciando a sua estrutura dimérica, bem como seus principais sítios de ligação a outras biomoléculas constituintes ou não da matriz extracelular. Fonte: próprio autor.31
- Figura 3** – Esquema representativo da interação fibronectina-colágeno através dos domínios 6FNI, 1-2FNII, 7-9FNI da fibronectina e o sítio de ligação à colagenase no domínio aa757-791 do colágeno. Fonte: próprio autor.32
- Figura 4** – Esquema representativo da interação fibronectina-fibronectina, bem como seus principais sítios. Fonte: próprio autor.32
- Figura 5** – Esquema representativo da laminina evidenciando a sua estrutura trimérica, bem como as cadeias alfa, beta e gama, que são diretamente responsáveis pelas variações moleculares da laminina. Fonte: adaptado de Mouw e colegas (2014).
.....33
- Figura 6** – Esquema representativo dos proteoglicanos e sua associação com moléculas de glicosaminoglicanos. Fonte: próprio autor.34
- Figura 7** – Esquema representativo da molécula integrina e suas unidades estruturais. Fonte: próprio autor.37
- Figura 8** – Esquema representativo do processo de descelularização realizado em corações adultos. Fonte: do autor.46
- Figura 9** – Esquema representativo do processo de descelularização realizado em corações neonatais. Fonte: do autor.47
- Figura 10** – Esquema representativo da técnica de espectroscopia Raman. Fonte: do autor.52
- Figura 11** – Aspecto visual dos órgãos nativos e descelularizados durante o processo de descelularização. **(a-b)** Imagens representativas do coração adulto nativo e descelularizado respectivamente. **(c-d)** Imagens representativas dos corações neonatal nativo e descelularizado respectivamente. Barra de escala: 1 mm.54

Figura 12 – Aspecto qualitativo da matriz extracelular de arcabouços descelularizados e órgãos nativos (n=5). **(a-b)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal corado por HE, evidenciando os núcleos celulares. **(c-d)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal corado por HE, evidenciando a matriz extracelular preservada. **(e-f)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal corado por picosirius, evidenciando fibras colágenas por entre as populações celulares. **(g-h)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal corado por picosirius, evidenciando a integridade da matriz de colágeno após o processo de descelularização. Barra de escala: 50 μ m.56

Figura 13 – Aspecto qualitativo das glicoproteínas fibronectina e laminina em arcabouços descelularizados e seus respectivos controles nativos (n=5). **(a-b)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal marcado com anti-fibronectina, evidenciando os núcleos celulares, células e glicoproteínas (marrom). **(c-d)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal marcado com anti-fibronectina, evidenciando a preservação e disposição da referida molécula. **(e-f)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal marcado com anti-laminina, evidenciando os núcleos celulares, células e glicoproteínas (marrom). **(g-h)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal marcado com anti-laminina, evidenciando a disposição e sugestiva perda da referida molécula. Barra de escala: 50 μ m.58

Figura 14 – Análise de SDS residual em arcabouços acelulares (n=5). **(a)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de SDS no coração descelularizado adulto pós-lavagem. **(b)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de SDS no coração descelularizado neonatal. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, * $p < 0,05$ 59

Figura 15 – Análise de material genético e hidroxiprolina remanescentes em arcabouços acelulares e em tecidos nativos (n=5). **(a-b)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de DNA nos corações adultos e neonatais nativo e descelularizado. **(c-d)** Gráfico de barras indicando a manutenção no conteúdo do aminoácido hidroxiprolina nos corações adultos e neonatais nativo e descelularizado. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, * $p < 0,05$61

- Figura 16** – Frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Sobreposição dos espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal.63
- Figura 17** – Frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Picos representativos de ácidos nucleicos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(c-d)** Representação do açúcar desoxirribose em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal.64
- Figura 18** – Investigação semiquantitativa das frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-d)** Representação de ácidos nucleicos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação do açúcar desoxirribose em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, *p<0,0565
- Figura 19** – Frequências vibracionais específicas em órgãos neonatais nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Frequências vibracionais representativas do aminoácido hidroxiprolina, diretamente relacionada ao colágeno. **(c-d)** Picos representativos de glicosaminoglicanos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação da fibronectina em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal.66
- Figura 20** – Investigação semiquantitativa das frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Representação do aminoácido hidroxiprolina, diretamente relacionada ao colágeno. **(c-d)** Representação de glicosaminoglicanos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação da fibronectina em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, *p<0,0567
- Figura 21** – Fotomicrografias representando a morfologia da linhagem H9c2. **(a-c)** É possível evidenciar conjunto de células aderentes e em contato. **(d)** Imagem representativa de uma única célula aderida apresentando aspecto de célula muscular. Barra de escala: 20 μ m.68

Figura 22 – Aspecto qualitativo de histoquímica dos arcabouços recelularizados enriquecido e não enriquecido com fibronectina (n=3). **(a-b)** Imagens representativas de células aderidas a matriz extracelular com aspecto circular. **(c-d)** Imagens representativas de células aderidas a matriz extracelular apresentando corpo celular com aspecto de aderência. Barra de escala: 50 μ m.69

Figura 23 – Gráficos representativos para contagem de células e fibronectina em órgãos suplementados e não suplementados (n=3). **(a)** A contagem de células por campo me scaffolds recelularizados (n=3) enriquecidos ou não com fibronectina não apresentou diferença estatística significativa. **(b)** A semi-quantificação de fibronectina por meio de fotomicrografias obtidas após a imunohistoquímica evidenciou que o processo de suplementação foi funcional. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, *p<0,05.70

Figura 24 – Marcações imunohistoquímicas por anti-troponina cardíaca I e fibronectina (n=3). **(a-b)** Fotomicrografias evidenciando a marcação das troponinas cardíacas em células no interior dos scaffolds. **(c-d)** Fotomicrografias evidenciando a marcação da fibronectina em coração não suplementado e suplementado. Barra de escala: Barra de escala: 50 μ m.70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – As biomoléculas de maior incidência em matriz extracelular cardíaca....	28
Tabela 2 – Vantagens no uso de arcabouços descelularizados.	40
Tabela 3 – Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman em órgãos adultos. A frequência vibracional em tecidos compactos pode sofrer sobreposição, portanto, considera-se variabilidade de $\pm 1-5 \text{ cm}^{-1}$	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4 REFERÊNCIAL TEÓRICO	25
4.1 O CORAÇÃO	25
4.2 A MATRIZ EXTRACELULAR	26
4.2.1 Colágeno	28
4.2.2 Glicoproteínas	30
4.2.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos	34
4.2.4 Fatores de Crescimento e Moléculas Reguladoras	35
4.2.5 Moléculas de Integração	36
4.3 BIOENGENHARIA DE TECIDOS	37
4.3.1 Descelularização	39
4.3.2 Recelularização	42
5 METODOLOGIA	45
5.1 MODELO EXPERIMENTAL	45
5.2 EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	45
5.3 DESCELULARIZAÇÃO	46
5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ESTRUTURAL DE ARCABOUÇO ACELULAR ..	47
5.4.1 Análise Histoquímica	47
5.4.2 Análise Imunohistoquímica	47

5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARCABOUÇO ACELULAR	48
5.5.1 Determinação Quantitativa de DNA Residual	48
5.5.2 Determinação Quantitativa de SDS Residual	49
5.5.3 Determinação Quantitativa de Hidroxiprolina	49
5.5.4 Determinação Quantitativa de Glicosaminoglicanos	50
5.5.5 Análise Qualitativa e Semi-quantativa da MEC por Espectroscopia Raman	51
5.6 RECELULARIZAÇÃO	52
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6 RESULTADOS	54
6.1 DESCELULARIZAÇÃO	54
6.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOESTRUTURAL DE ARCABOUÇO ACELULAR....	55
6.2.1 Análise Histoquímica	55
6.2.2 Análise Imunohistoquímica	57
6.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARCABOUÇO ACELULAR	59
6.3.1 Determinação de SDS Residual	59
6.3.2 Determinação de DNA Residual	59
6.3.3 Determinação Glicosaminoglicanos	60
6.3.4 Determinação de Hidroxiprolina	60
6.3.5 Avaliação Qualitativa da Matriz Extracelular	62
6.4 RECELULARIZAÇÃO	68
8 DISCUSSÃO	71
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	89

ANEXO I – CERTIFICADO DO CEUA 42/2016.....	89
ANEXO I – CERTIFICADO DO CEUA 27/2020.....	89
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	90
ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	90
DEPÓSITO DE PATENTES	90

1 INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares como as coronarianas e cerebrovasculares estão entre as maiores causas de morte no mundo (LU et al., 2013; OMS, 2017). Inúmeros fatores comportamentais podem contribuir para o aumento do risco dessas doenças, como hábitos alimentares, tabagismo, alcoolismo e sedentarismo. Além disso, comorbidades como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia também podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (SMITH et al., 2007; WU, 1999).

O infarto agudo do miocárdio, estado grave que leva a insuficiência cardíaca congestiva, é capaz de reduzir a capacidade do coração em bombear o sangue (INAMDAR; INAMDAR, 2016; MINICUCCI et al., 2011). Durante um evento de infarto, o microambiente cardíaco é caracterizado por morte celular e intensa atividade inflamatória representada por recrutamento considerável de macrófagos cuja função é realizar a limpeza da área infartada (LONDONO; BADYLAK, 2015). Concomitantemente, fibroblastos proliferam-se no estroma tecidual com o intuito de substituir os cardiomiócitos mortos, formando uma cicatriz colagenosa capaz de conferir resistência e impedir que haja a ruptura do músculo cardíaco (LISTER; RAYNER; SUURONEN, 2016).

Em pacientes com grande acometimento da função cardíaca, terapias medicamentosas não surtem efeito, reduzindo drasticamente a sobrevida (LU et al., 2013). Ressalta-se que para estes pacientes, a saída apropriada é a substituição do órgão doente por um saudável por meio do transplante, entretanto, a referida abordagem só é possível a um número limitado de pacientes devido à escassez de doadores (FUNAKOSHI et al., 2016). De acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, no ano de 2020, cerca de 40 mil brasileiros encontravam-se cadastrados na lista de espera de transplantes, onde cerca de 1.681 pacientes aguardavam pelo transplante cardíaco completo, e pouco mais de 300 pacientes foram, de fato, contemplados (BRAZILIAN ORGAN TRANSPLANT ASSOCIATION, 2020).

Apesar de melhorar as taxas de sobrevida a curto prazo, o transplante cardíaco ainda possui limitações devido a rejeição ao órgão e aos efeitos da imunossupressão

(GUYETTE et al., 2016). Por este motivo, novas abordagens terapêuticas estão sendo pensadas e elaboradas para suprir a necessidade de órgãos e as consequências da rejeição.

Dentre o leque de metodologias e estratégias em estudo, a bioengenharia tecidual surge como uma abordagem demasiadamente promissora, fornecendo condições para reparo e reestabelecimento estrutural e funcional de tecidos e órgãos danificados (DESTEFANI; SIRTOLI; NOGUEIRA, 2017). A bioengenharia tecidual é uma área integrada e multidisciplinar que envolve a engenharia e as ciências naturais no desenvolvimento de biomateriais sintéticos e/ou naturais capazes de substituir, reparar e melhorar a função de órgãos complexos ou segmentos teciduais (ZHAO et al., 2018). Seu objetivo é diminuir a escassez de órgãos para transplante, por meio da fabricação de estruturas biológicas funcionais capazes de suportar a reconstrução com células tronco, progenitoras ou terminalmente diferenciadas (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; SHAFIEE; ATALA, 2016).

No contexto da bioengenharia tecidual, um biomaterial é capaz de fornecer suporte mecânico e sinais bioquímicos para estimular a fixação e modular o comportamento celular (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Cabe ressaltar que os biomateriais podem possuir origem natural e/ou sintética. Em relação aos materiais naturais, são comumente presentes na natureza, tais como agarose, colágeno, alginato, quitosana, ácido hialurônico ou fibrina, além de possuírem baixa citotoxicidade, interagem com os tecidos do receptor promovendo a formação de um novo tecido (SEKUŁA; ZUBA-SURMA, 2018).

Dada a complexidade e a incompleta compreensão da composição e estrutura da matriz extracelular (MEC), a fabricação de um arcabouço que mimetize totalmente sua bioquímica e a sua arquitetura ainda não é atualmente possível (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Deste modo, tem havido um interesse crescente na utilização da própria matriz extracelular nativa, a qual pode ser obtida através do processo de descelularização de um tecido específico.

A descelularização é o processo pelo qual as células são removidas dos tecidos/órgãos, e os componentes da MEC são mantidos em um arcabouço

tridimensional (FU et al., 2014; OTT et al., 2008). A aplicação desta técnica minimiza eventuais complicações relacionadas a biocompatibilidade, tornando-a mais vantajosa em relação ao uso de matrizes sintéticas para o desenvolvimento de órgãos bioartificiais (LU et al., 2013).

Cabe ressaltar que o desenvolvimento artificial de órgãos, incluindo o coração, deve levar em consideração as diferentes nuances relacionadas à morfologia e fisiologia tecidual e que são capazes de interferir diretamente em etapas críticas do processo. Neste contexto, a composição molecular dos arcabouços descelularizados, incluindo o cardíaco, pode ser considerado um fator interferente pois existe diferença na composição biomolecular das matrizes extracelulares em diferentes estágios de desenvolvimento. Além disso, como consequência do tratamento químico no processo de descelularização, é evidente a defasagem de biomoléculas como glicosaminoglicanos e a glicoproteína fibronectina, que no caso do coração, é um importante mediador de eventos celulares (WILLIAMS et al., 2014).

Sendo assim, a presente pesquisa se apresenta como uma ferramenta para investigar a possível influência da fibronectina no processo de recelularização e assim fornecer dados capazes de apontar a sua viabilidade ou não como uma biomolécula influente na reconstrução de tecidos e órgãos complexos.

2 JUSTIFICATIVA

A fibronectina remanescente na matriz extracelular após o processo de descelularização pode não ser suficiente para promover de maneira satisfatória o processo de reconstrução tecidual principalmente se o arcabouço se encontrar em estágio adulto de desenvolvimento, onde sabidamente a composição da referida glicoproteína é reduzida, como relatado por Williams e colegas (2014). Além disso, ressalta-se que o processo de descelularização por agentes químicos, como o detergente aniônico SDS, é capaz de solubilizar biomoléculas importantes, incluindo a fibronectina (WHITE et al., 2017). Sendo assim, a recomposição através da suplementação com fibronectina humana plasmática pode conferir ao arcabouço potencial organogênico adicional. Neste contexto, elaborar uma estratégia de recomposição e elucidar a influência da referida biomolécula pode oferecer uma saída para o reestabelecimento funcional de órgãos reconstruídos a partir da recelularização.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a influência da fibronectina plasmática humana na reconstrução de arcabouço cardíaco descelularizado.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a espectroscopia Raman como ferramenta de avaliação de *scaffolds* descelularizados de diferentes estágios de desenvolvimento;
- Comparar a composição de *scaffolds* descelularizados a partir de diferentes estágios de desenvolvimento com intuito de investigar a viabilidade da espectroscopia Raman;
- Elaborar protocolo de enriquecimento de arcabouços descelularizados;
- Avaliar a recomposição de fibronectina através da suplementação com fibronectina plasmática solúvel;
- Padronizar o cultivo de cardiomioblastos H9c2 destinados ao repovoamento dos *scaffolds*.

4 REFERÊNCIAL TEÓRICO

4.1 O CORAÇÃO

O tecido cardíaco é composto por numerosa população celular que desde o desenvolvimento embrionário é circundada por inúmeras moléculas proteicas e não proteicas que em conjunto formam uma estrutura denominada matriz extracelular (MEC) (DE ROBERTIS; HIB, 2004). A população celular do coração, representada principalmente por cardiomiócitos, fibroblastos, fibras de purkinje e células marca-passo são responsáveis por exercerem funções estruturais e fisiológicas (VALIENTE-ALANDI; SCHAFFER; BLAXALL, 2016).

Os cardiomiócitos são células alongadas que dispõem-se em malha, dividindo-se e recombinando-se através de estruturas denominadas discos intercalares, que possuem em seu interior zônulas de adesão, junções comunicantes do tipo desmossomos capazes de que permitir a propagação de força entre uma célula, e junções do tipo *gap* que conferem a propagação de pulsos elétricos através da difusão livre de íons entre células (LEONARD; SMAILL; LEGRICE, 2012; WINSLOW; WALKER; GREENSTEIN, 2016).

A comunicação entre os cardiomiócitos torna o coração um grande sincício tridimensional, que estruturalmente é subdividido em dois: atrial e ventricular. Os átrios e ventrículos são separados por uma fina camada de tecido conjuntivo que circunda as aberturas das valvas atrioventriculares. A presença de uma camada fibrosa na divisão entre o leito atrial e ventricular atua como barreira impedindo a propagação de potencial de ação entre cardiomiócitos atriais e ventriculares. A propagação de potencial de ação nessa região é realizada exclusivamente pelas células nodais, que propagam entre cardiomiócitos os feixes elétricos gerados por células marca-passo proveniente do nó sinoatrial encontrado na região superior do átrio direito (XIN; OLSON; BASSEL-DUBY, 2013). Os fibroblastos são responsáveis por secretar a grande maioria dos componentes proteicos e não proteicos de matriz extracelular (PALAZZOLO et al., 2016). Essas células desempenham um papel crítico na manutenção da função cardíaca normal, bem como no remodelamento cardíaco em condições patológicas tais como infarto do miocárdio e hipertensão arterial. Essas células possuem inúmeras funções, incluindo síntese e deposição de matriz

extracelular, comunicação célula-célula com cardiomiócitos, sinalização para com outros fibroblastos, bem como com células endoteliais. As células musculares lisas estão presentes nas artérias coronárias e na vasculatura de entrada e saída do coração. As células endoteliais revestem o endocárdio, o interior dos vasos e as válvulas cardíacas (HSIEH et al., 2006).

Em estágio de desenvolvimento embrionário e pré-natal, o coração possui considerável capacidade mitótica, conferindo a ele neste momento um crescimento somático. Quando em estágio final de desenvolvimento, a bomba cardíaca passa a apresentar crescimento expansivo e reduzida ocorrência de mitose (PORRELLO et al., 2011; PORRELLO; OLSON, 2014). No estágio de crescimento somático, o músculo cardíaco apresenta capacidade promissora de regeneração quando lesionado (PORRELLO et al., 2011). Os fenômenos regenerativos já foram descritos em hidra, crustáceos, vermes, moscas da fruta, sapos, salamandras, peixe zebra, roedores e humanos (PORRELLO; OLSON, 2014). O processo de regeneração tecidual está em plena elucidação e já é de conhecimento que envolve uma série de interações entre matriz extracelular e células que resulta em uma diversidade de mecanismos celulares, incluindo recrutamento e ativação de células-tronco, bem como a desdiferenciação, trans-diferenciação e proliferação de tipos de células diferenciadas (POSS, 2010).

4.2 A MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular é uma ampla rede molecular tridimensional composta por proteínas estruturais e funcionais dispostas em camadas que comportam e interligam células de forma justaposta (THEOCHARIS et al., 2016). Ela é secretada principalmente por fibroblastos residentes e atua definindo os limites do tecido, suas propriedades biomecânicas e a polaridade celular. Sendo assim, a composição e a ultraestrutura tridimensional estão altamente relacionadas com o fenótipo celular e as funções necessárias do tecido ou órgão do qual é derivado (BROWN et al., 2010; HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014). Além disso, as matrizes extracelulares servem como substrato adesivo para a migração celular e, através da ligação de fatores de transição e fatores de crescimento (HYNES, 2009). As proteínas da MEC fornecem sinais bioquímicos interpretados pelos receptores da superfície celular, como as integrinas e iniciam cascatas de sinalização que controlam a

sobrevivência celular, a proliferação celular, a diferenciação e o estado das células estaminais (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011; WICKSTRÖM; RADOVANAC; FÄSSLER, 2011).

A matriz extracelular pode ser classificada em intersticial e pericelular. As matrizes intersticiais circundam as células e concentram-se no estroma tecidual, enquanto as matrizes pericelulares estão em contato íntimo com as células, interagindo principalmente com receptores celulares do tipo integrina (THEOCHARIS et al., 2016). As matrizes intersticiais possuem em sua composição fibrilas de colágeno, elastina, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico, molécula essencial para hidratação do estroma tecidual. Todos esses componentes interagem entre si criando uma rede dinâmica e complexa (THEOCHARIS et al., 2016). Em relação as matrizes pericelulares, aqui representada pelas membranas basais, são encontradas entre o parênquima e o tecido conjuntivo, atuando como um ponto de ancoragem para as células, impedindo desse modo que sofram lesões em decorrência da indução de propriedades mecânicas teciduais como contração e relaxamento. As membranas basais possuem em sua composição colágeno tipo IV, laminina, nidogênio, perlecan e agrina (JAYADEV; SHERWOOD, 2017).

A presença de cada elemento é modulada de acordo com a necessidade do tecido e a sua idade de desenvolvimento, o que influi diretamente no quantitativo de determinadas biomoléculas. Entre um tecido e outro, é bastante comum observar significativa mudança composicional e organizacional em função de diversos fatores como idade de desenvolvimento, estado metabólico das células em resposta a mudanças nas propriedades mecânicas; níveis de pH; concentração de gases, e outras variáveis no microambiente (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010; WILLIAMS et al., 2014). Vale ressaltar ainda que apesar de serem influenciadas diretamente por tais fatores, também são capazes de influenciar fenótipos, migração e adesão de células, evidenciando o estado de equilíbrio entre célula-matriz (BAKER; SOUTHGATE, 2008). Por estas razões, arcabouços acelulares de MEC passaram a ser investigados como modelos indutivos para a reconstrução funcional de diversos tecidos e órgãos.

Um claro exemplo relacionado a influência do fator estágio de desenvolvimento é observado na matriz extracelular cardiovascular, cuja composição das principais

biomoléculas varia com o avanço do desenvolvimento organogênico (**Tabela 1**). No microambiente do coração adulto, é possível observamos principalmente a incidência de moléculas estruturais como colágenos, fibronectina, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Durante os estágios embrionários e pré-natal, nota-se a variação na incidência de algumas moléculas, sendo bastante comum observarmos maior presença neste que em estágio adulto, como é o caso da glicoproteína a fibronectina, diretamente envolvida na promoção do desenvolvimento tecidual com a sua influência em eventos celulares proliferativos. Além disso, nota-se a ausência considerável de laminina, molécula característica da membrana basal, intensamente estabelecida em estágio adulto (PORRELLO; OLSON, 2014; WILLIAMS et al., 2014).

Tabela 1 – As biomoléculas de maior incidência em matriz extracelular cardíaca.

Biomolécula	Fetal	Neonatal	Adulto
Colágeno I	11%	16%	38%
Colágeno III	-	-	4%
Colágeno IV	8%	6%	5%
Colágeno V	-	-	2%
Colágeno VI	11%	6%	6%
Emilina-1	4%	6%	-
Fibrilina-1	13%	18%	18%
Fibrilina-2	8%	8%	-
Fibronectina	26%	21%	4%
Laminina	-	5%	14%
Periostina	7%	4%	1%
Perlecan	12%	10%	8%

Fonte: Adaptado de Williams e colegas (2014).

4.2.1 Colágeno

O colágeno é o componente estrutural mais abundante da MEC, sendo relatados até o momento pelo menos 28 tipos numerados em algarismos romanos (I – XXVIII) que são sintetizados pelas células residentes e fibroblastos (GILLIES et al., 2011; GORDON; HAHN, 2010; ICARDO; COLVEE, 1995). Na matriz extracelular do coração, diferentes tipos podem ser encontrados: os colágenos fibrilares (tipo I, III, V), colágeno formador de rede (tipo IV) e colágeno de ancoragem (tipo VII) (LOCKHART et al., 2011; LONDONO; BADYLAK, 2015).

As moléculas colágenas da classe fibrilar possuem estrutura imprescindível para a função estrutural e biomecânica do coração, possibilitando a contração e relaxamento do tecido. O colágeno formador de rede, em conjunto com proteoglicanos e a glicoproteína laminina originam uma estrutura denominada membrana basal, cuja função está ligada diretamente a delimitação, sustentação e nutrição celular. A classe de ancoragem atua diretamente na estabilização da membrana basal. Embora o tipo fibrilar predomine em um organismo, ambas as classes proporcionam propriedades estruturais e funcionais essenciais, e ainda são de grande valor em outras funções, tais como migração celular, adesão, angiogênese, e no reparo e desenvolvimento de tecidos (KADLER et al., 2007).

Estruturalmente, as moléculas de colágeno são formadas por pelo menos quarenta e seis cadeias polipeptídicas denominadas alfa organizadas em formato de tripla hélice, as quais podem constituir a maior parte de sua estrutura, com cerca de 96% para o colágeno tipo I e ao menos 10% para o colágeno tipo XII (KULAR; BASU; SHARMA, 2014; RICARD-BLUM, 2011). Em sua estrutura micromolecular, os aminoácidos frequentemente encontrados são glicina, 4-hidroxiprolina e prolina (**Fig. 1**) (SHOULDERS; RAINES, 2010).

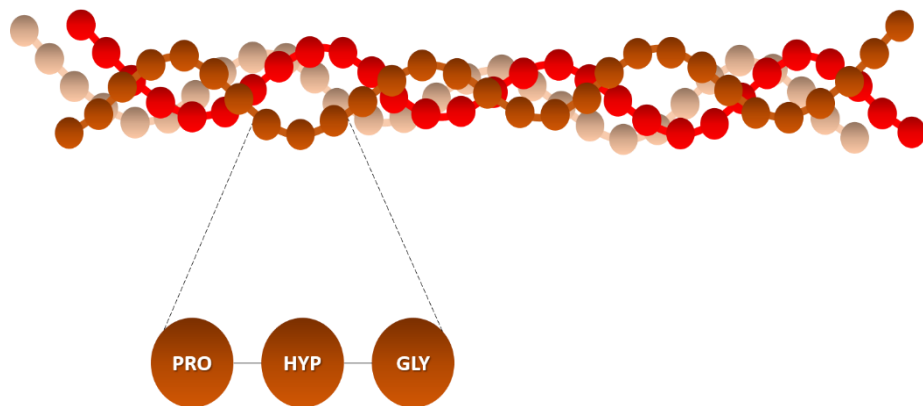


Figura 1 – Esquema representativo do colágeno e seus aminoácidos constituintes. Prolina (pro), hidroxiprolina (hyp) e glicina (gly). Fonte: próprio autor.

Cabe ressaltar que a função dos colágenos não se restringe apenas a fibrilas e feixes com papel estrutural. Eles são capazes de interagir com células através de uma ampla gama de receptores, tendo uma função importante na regulação, crescimento, diferenciação, adesão e migração celular. Além disso, as moléculas de colágeno podem interagir com outras biomoléculas da matriz extracelular conferindo e

estabilidade a estrutura (RICARD-BLUM, 2011). Além disso, é bem documentado seu papel no reparo tecidual, filtração molecular e supressão tumoral (MUIZNIEKS; KEELEY, 2013).

4.2.2 Glicoproteínas

Além dos múltiplos tipos de colágeno, a MEC contém uma série de proteínas multi-domínio, cada um com locais de ligação específicos para outras macromoléculas matriciais, receptores na superfície das células e fatores de crescimento (HYNES; NABA, 2012).

De maneira geral, a interação entre matriz extracelular e células se resume em uma conexão adesiva entre glicoproteínas e receptores de membrana, como já evidenciado anteriormente. Ressalta-se que as principais glicoproteínas relatadas até aqui são: fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondinas, tenascinas, nidogênio, fibrinogênio, dentre outras (MECHAM, 2012).

Essas proteínas, contribuem para a organização do meio extracelular e as células nele residentes. A fibronectina, uma grande molécula sintetizada por fibroblastos residentes no estroma tecidual é um exemplo de glicoproteína multi-domínio de grande abundância na MEC, sendo considerada a segunda de maior quantidade (LONDONO; BADYLAK, 2015). A FN interage com as células através da ligação com proteínas integrais de membrana, denominadas integrinas, sendo capaz de estabelecer um contato íntimo e profundamente essencial em processos de sinalização, proliferação e adesão celular. Além da interação com a população celular tecidual, a FN pode ainda estabelecer ligações com outras moléculas proteicas e não proteicas como colágeno e glicosaminoglicanos respectivamente (MEZZENGA; MITSU, 2019).

4.2.2.1 Fibronectina

A fibronectina é uma molécula composta por três domínios distintos (I, II e III) compostos por uma sequência de repetições com sítios ativos para interação com receptores celulares do tipo integrinas e também com inúmeros fatores de crescimento como o VEGF e BMP2, além de moléculas da matriz extracelular estrutural e funcional dos tecidos, tais como: a própria fibronectina, colágenos (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII), glicosaminoglicanos (sulfatados e não sulfatados),

proteoglicanos, fibras elásticas e outras glicoproteínas (**Fig. 2**) (MEZZENGA; MITSI, 2019).

A molécula de fibronectina consiste em duas subunidades, cada uma com um tamanho aproximado de 250 kDa, formando um dímero através de ligações dissulfureto no seu terminal C (**Fig. 2**). Ao nível molecular, a fibronectina dimérica secretada por células residentes apresenta-se sob a forma globular sendo capaz de, através das repetições 9-10FNIII (domínio III) interagir com integrinas $\alpha 51\beta$ sob o intermédio do peptídeo RGD (Arg – Gly – Asp), e esta interação, por sua vez, é capaz de alterar a conformação estrutural da fibronectina, tornando-a fibrilar e consequentemente expondo sítios de ligação afins para outras fibronectinas e até mesmo para colágenos (MOUW; OU; WEAVER, 2014; THEOCHARIS et al., 2016).

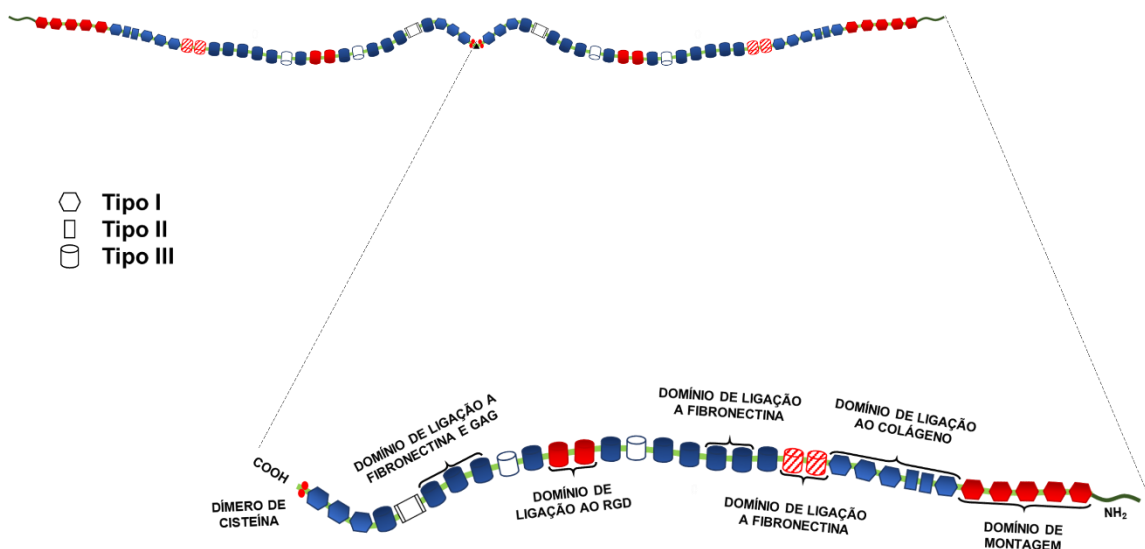


Figura 2 – Esquema representativo da fibronectina evidenciando a sua estrutura dimérica, bem como seus principais sítios de ligação a outras biomoléculas constituintes ou não da matriz extracelular. Fonte: próprio autor.

Além da interação fibronectina-célula, a interação e montagem entre fibronectina-colágeno que acontece entre repetições 6FNI (domínio I), 1-2FNII (domínio II) e 7-9FNI (domínio I) da fibronectina e o sítio de ligação da collagenase localizado na cadeia $\alpha 1$ (aa757-791) na molécula de colágeno é, de fato, um ponto chave no processo interativo célula-matriz, pois favorece a estabilização da rede macromolecular, conferindo estabilidade bioativa e estrutural a matriz extracelular (**Fig. 3**). Além disso, através deste estiramento, e da consequente exposição de sítios ativos antes não expostos, é comum observarmos a interação entre duas moléculas

de fibronectina através das suas subunidades 1-5 FNI (domínio I), 1-2 FNIII (domínio III) e 12-14FNIII (domínio III) (**Fig. 4**) (KADLER; HILL; CANTY-LAIRD, 2008; MAURER; MA; MOSHER, 2016; MEZZENGA; MITSI, 2019; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010).

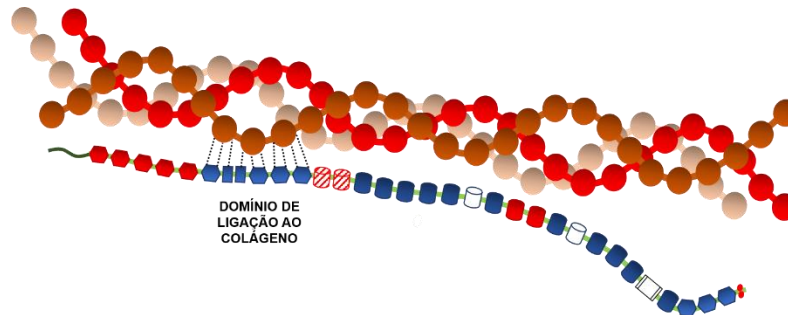


Figura 3 – Esquema representativo da interação fibronectina-colágeno através dos domínios 6FNI, 1-2FNII, 7-9FNI da fibronectina e o sítio de ligação à colagenase no domínio aa757-791 do colágeno. Fonte: próprio autor.

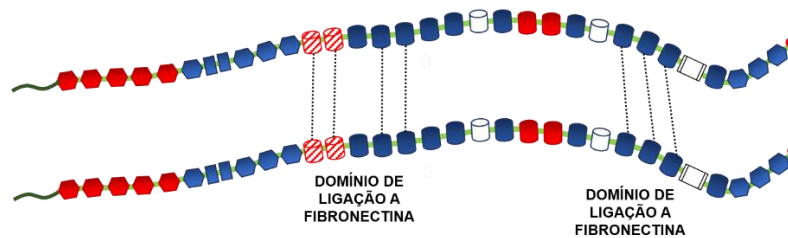


Figura 4 – Esquema representativo da interação fibronectina-fibronectina, bem como seus principais sítios. Fonte: próprio autor.

A glicoproteína fibronectina apesar de abundante, pode sofrer variações quantitativas a depender do estágio de desenvolvimento em que se encontra o tecido. Em estágios de desenvolvimento embrionário e pós-natal, no tecido cardíaco é bastante comum expressão elevada de FN, visto que essa molécula possui papel essencial na embriogênese atuando ativamente para que o tecido se desenvolva de forma homogênea e saudável (THEOCHARIS et al., 2014; WILLIAMS et al., 2014). Na contramão, no estágio de desenvolvimento adulto, a expressão de FN na MEC cardíaca é extremamente reduzida. Neste contexto, podemos observar em tecidos cardíacos adultos, ausência de eventos celulares como adesão, proliferação e diferenciação celular, o que sugere a importância da fibronectina no desenvolvimento tecidual (WILLIAMS et al., 2014).

4.2.2.2 Laminina

A laminina é uma glicoproteína frequentemente encontrada junto ao colágeno tipo IV na lâmina basal tecidual. A glicoproteína é composta por três dímeros denominados cadeias α , β e γ com tamanho variável. As cadeias α variam de 200 e 400 kDa enquanto as cadeias β e γ têm tamanhos de 120 a 200 kDa. A junção das cadeias origina estruturas com formato cruciforme em forma de Y apresentando três prolongamentos ou estruturas em forma de bastonetes apresentando um braço único (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

A nomenclatura oficial das lamininas leva em consideração a combinação dos nomes das cadeias diméricas. Até o momento, são relatadas cinco cadeias α ($\alpha 1$ - $\alpha 5$), quatro cadeias β ($\beta 1$ - $\beta 4$) e três cadeias γ ($\gamma 1$ - $\gamma 3$), que podem combinar-se dando origem a 16 heterotrímeros distintos (MOUW; OU; WEAVER, 2014).

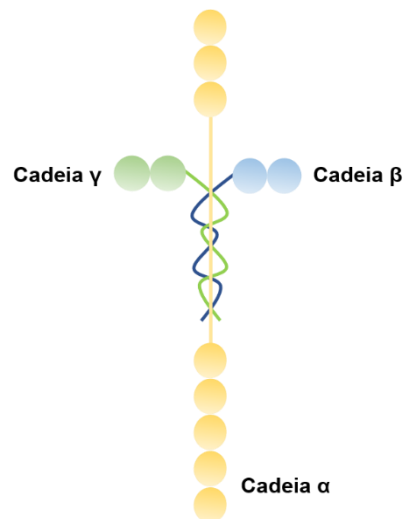


Figura 5 – Esquema representativo da laminina evidenciando a sua estrutura trimérica, bem como as cadeias alfa, beta e gama, que são diretamente responsáveis pelas variações moleculares da laminina. Fonte: adaptado de Mouw e colegas (2014).

Além de exercer importante função estrutural, sustentando e comportando de forma organizada as células no estroma tecidual, as lamininas também apresentam funções específicas relacionadas à eventos celulares como proliferação, adesão, diferenciação, manutenção do fenótipo e resistência apoptótica. Cabe ressaltar que os eventos mencionados e regulados pelas lamininas só são possíveis diante da integração dessas glicoproteínas com moléculas adesivas celulares do tipo integrina

(DOMOGATSKAYA; RODIN; TRYGGVASON, 2012; KULAR; BASU; SHARMA, 2014; LOCKHART et al., 2011; LONDONO; BADYLAK, 2015).

4.2.3 Proteoglicanos e Glicosaminoglicanos

Os proteoglicanos representam um grupo heterogêneo de moléculas com um núcleo proteico ligado covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs), que por sua vez, são polissacarídeos não ramificados, às vezes longos e que apresentam uma estrutura repetitiva de dissacarídeos de carga negativa (**Fig. 6**) (COUCHMAN; PATAKI, 2012; SCHAEFER, 2014).

Os proteoglicanos são classificados em subtipos com base na estrutura das cadeias de carboidratos das GAGs, bem como na distribuição e na densidade dessas cadeias ao longo do núcleo da proteína. Estruturalmente as GAGs sempre possuem um açúcar aminado e sulfatado, ou um segundo açúcar não sulfatado, sendo normalmente um ácido urônico (HUYNH et al., 2012; THEOCHARIS et al., 2016). As moléculas sulfatadas são encontradas na maioria das vezes ligadas covalentemente a um núcleo proteico para formar moléculas maiores denominadas de proteoglicanos, o que não ocorre com moléculas não sulfatadas (ALBERTS et al., 2008; THEOCHARIS et al., 2010).

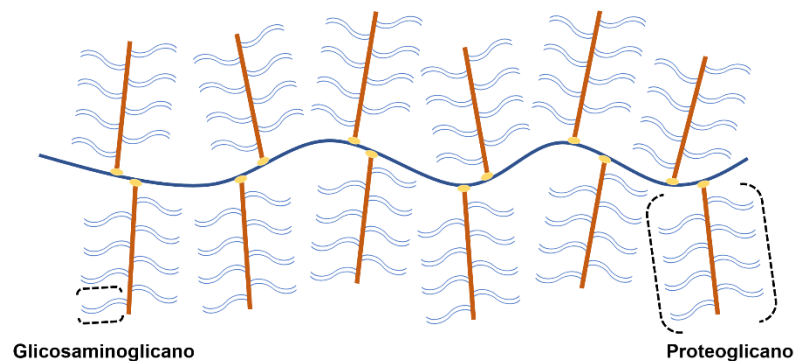


Figura 6 – Esquema representativo dos proteoglicanos e sua associação com moléculas de glicosaminoglicanos. Fonte: próprio autor.

A presença do grupamento sulfato e das carboxilas dos ácidos urônicos, tornam as moléculas de glicosaminoglicanos carregadas negativamente (ALBERTS et al., 2008; THEOCHARIS et al., 2016). As moléculas de GAG são as mais negativas que uma célula sintetiza. A junção de carga negativa com as cadeias de açúcar, que são, além de longas, bastante rígidas e hidrofílicas, fazem a GAG ocupar um enorme volume, e

por conta da carga, atraem muitos cátions, especialmente o Na^+ e, conseqüentemente, mais água, funcionando como verdadeiras esponjas. A grande capacidade de retenção de água possibilita a formação de um gel altamente hidratado, que preenche a maior parte do espaço extracelular, fornecendo suporte mecânico para os tecidos e permitindo a difusão rápida de moléculas hidrossolúveis, bem como a migração celular (ALBERTS et al., 2008).

O ácido hialurônico (AH), é a principal molécula de GAG presente no coração em desenvolvimento. Após a sua síntese, a molécula se expande devido à presença de água e passa a ocupar um grande volume que poderá ser mais tarde ocupado para a formação de órgãos como coração e córnea. Além dessa função imprescindível, as moléculas de ácido hialurônico possuem importante papel na indução de quimiotaxia – migração celular. Com o desenvolvimento em plena expansão, essas moléculas serão degradadas pela ação da hialuronidase secretada pelas próprias células atraídas (ALBERTS et al., 2008). Além do AH, são encontrados no coração outros três tipos de GAG: sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de heparina. O primeiro é abundante na região das válvulas cardíacas e no anel fibroso que separa os átrios dos ventrículos e não possui apenas papel estrutural. Ele é responsável por inúmeros processos relacionados a quimiotaxia celular. Os dois últimos são encontrados em menor porção (LOCKHART et al., 2011).

4.2.4 Fatores de Crescimento e Moléculas Reguladoras

O microambiente tecidual está em constante remodelação devido a eventos de deposição, degradação ou modificação de biomoléculas mediados por células residentes (YUE, 2014). Ressalta-se que todos os componentes proteicos no exterior e interior de uma célula são passíveis de sofrerem degradação e/ou modificação por enzimas proteolíticas. As enzimas mais importantes relatadas com função de remodelar a matriz extracelular são as metaloproteinases e as serina proteinases, que incluem a plasmina e a catepsina G. Já em relação a modificação proteica intracelular as proteinases de cisteína, aspartato e treonina são predominantes (HYNES; NABA, 2012; YUE, 2014).

Além de atuar como enzimas que regulam eventos reorganizadores na matriz extracelular, as mesmas são capazes de, indiretamente, favorecer eventos como

migração celular pela criação de espaços, contribuindo para a modificação da arquitetura tecidual. Também são relatadas a produção de fragmentos proteicos bioativos e a modificação direta e indireta do estágio de ativação de moléculas sinalizadoras (PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007).

A modulação da estrutura e bioatividade da matriz extracelular também pode ser mediada por estímulos exógenos, conferidos por citocinas, glicocorticoides, estresse oxidativo, pressão e estiramento mecânico. No contexto de estimulação exógena, a citocina de maior interesse é o TGF- β (fator de transformação do crescimento beta, do inglês “*transforming growth factor beta*”), molécula capaz de potencializar a biossíntese de matriz extracelular, favorecer eventos celulares e suprarregular os genes relacionados a remodelação endógena (YUE, 2014).

Outros fatores relacionados a remodelação da matriz extracelular e a proliferação de células também podem ser considerados, tais como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês “*vascular endothelial growth factor*”), HGF (fator de crescimento de hepatócitos, do inglês “*hepatocyte growth factor*”), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês “*growth factor platelet-derived*”), FGF (fator de crescimento de fibroblastos, do inglês “*fibroblast growth factor*”), dentre outros. Ressalta-se que tais fatores podem efetivar ligações com inúmeras moléculas da matriz extracelular, incluindo GAGs e fibronectina, que funcionam como reservatórios (HYNES; NABA, 2012; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010).

4.2.5 Moléculas de Integração

Os receptores celulares são moléculas capazes de viabilizar o contato dos componentes estruturais e biofuncionais com a população celular residente. As integrinas celulares são a principal classe de proteínas de integração relatadas. Suas funções vão de estruturação e organização tecidual até sinalização para eventos celulares. Elas representam uma família diversificada de proteínas transmembrana, as quais estão presentes em todas as células animais. Cada integrina é constituída por duas partes principais: uma subunidade alfa e uma subunidade beta. A variação nessas subunidades leva a uma grande diversidade de integrinas, sendo que somente em humanos existem mais de 20 tipos diferentes conhecidos (ALBERTS et al., 2008; THEOCHARIS et al., 2016).

As integrinas ligam o citoesqueleto de actina de uma célula a várias estruturas externas. A porção citoplasmática de cada molécula de integrina se liga a proteínas adaptadoras que se conectam aos filamentos de actina dentro da célula. A porção extracelular da integrina então se liga a moléculas na matriz extracelular ou na superfície de outras células. Os anexos de integração às células vizinhas podem quebrar e se reformar à medida que a célula se move (CALDERWOOD; CAMPBELL; CRITCHLEY, 2013).

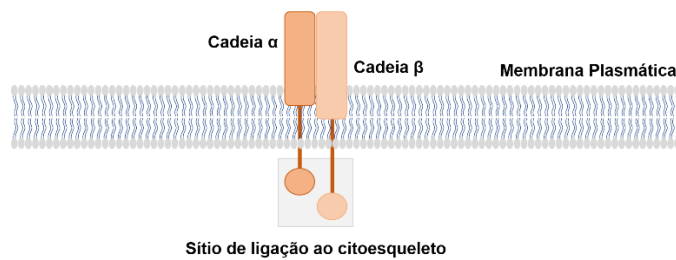


Figura 7 – Esquema representativo da molécula integrina e suas unidades estruturais. Fonte: próprio autor.

As integrinas são capazes de fornecer informações sensoriais via mecanotransdução e sinergismo com as vias de sinalização, fornecendo às células condições para diferenciação permissiva (HYNES; NABA, 2012; THEOCHARIS et al., 2016). Além disso, estão envolvidas em várias vias de sinalização celular para processos celulares, como propagação e motilidade (KULAR; BASU; SHARMA, 2014).

4.3 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

Relatos históricos trazem uma contextualização ampla acerca deste referido campo de conhecimento, que fora reconhecido oficialmente apenas na década de 80, durante a reunião da *National Science Foundation* (SKALAK; FOX, 1988).

Em Gênesis I, acredita-se que esteja contido o primeiro relato acerca deste campo de conhecimento. A referência contida no livro sagrado, em resumo, descreve a gênese de um ser humano do sexo feminino a partir de fragmentos teciduais obtidos de um indivíduo do sexo oposto. Contextualizando essas informações e dando contemporaneidade à mesma, trata-se de um evento relacionado à clonagem de seres humanos, ou até mesmo da manipulação de materiais biológicos, como células tronco mesenquimais, dotadas de capacidade de diferenciação, podendo gerar todos as classes celulares do organismo. Apesar de evidenciar informações interessantes

acerca do campo de estudo, a possível execução e aplicabilidade do mesmo no mundo moderno enfrenta consideráveis percalços, muito em relação aos aspectos ético-sociais envolvidos.

Em 1954, Joseph Murray (1919-2012), considerado o pai da técnica de transplantes de tecidos e órgãos realizou com sucesso o primeiro implante bem-sucedido, transplantando um rim saudável entre irmãos gêmeos idênticos. Anos mais tarde, Murray obteve avanços significativos ao transplantar órgãos entre indivíduos geneticamente diferentes e, tal feito foi capaz de revolucionar um quadro que até então, no século XX, encontrava-se sem solução: a ausência de abordagens terapêuticas eficazes capazes de tratar e reconstituir as funções de órgãos disfuncionais. Como resultado do estágio alcançado por Murray, milhares de vidas são salvas diariamente através dos transplantes de tecidos e órgãos, entretanto, muitas pessoas acabam não sendo contempladas, principalmente devido à escassez de doadores e ao envelhecimento da população. Tais condições exigem a busca constante por novos métodos que possam restaurar a função de órgãos e tecidos danificados (SHAFIEE; ATALA, 2016).

A bioengenharia tecidual é uma área integrada e multidisciplinar que envolve a engenharia e as ciências naturais no desenvolvimento de materiais biológicos sintéticos e/ou naturais capaz de substituir, reparar e melhorar a função de órgãos complexos ou segmentos teciduais (ZHAO et al., 2018). Seu objetivo é diminuir a escassez de órgãos para transplante, por meio da fabricação de estruturas biológicas funcionais (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; SHAFIEE; ATALA, 2016).

Na bioengenharia de tecidos e na medicina regenerativa, um biomaterial é capaz de fornecer suporte mecânico e sinais bioquímicos para estimular a fixação e modular o comportamento celular (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Materiais naturais comumente presentes na natureza, tais como agarose, colágeno, alginato, quitosana, ácido hialurônico ou fibrina, além de possuírem baixa citotoxicidade, interagem com os tecidos do receptor promovendo a formação de um novo tecido (SEKUŁA; ZUBA-SURMA, 2018).

A matriz extracelular é outro exemplo de biomaterial natural, neste caso, complexo. Ela contém sinais bioquímicos e mecânicos capazes de regular o fenótipo celular,

modular o desenvolvimento dos tecidos, homeostase e resposta à lesão, tornando-a uma ferramenta terapêutica em potencial. O uso de materiais baseados em MEC na pesquisa biomédica avançou consideravelmente, podendo ser evidenciada como substrato de revestimentos de placas de cultura celular, além de possível fonte para componentes purificados aplicados em projetos de biomateriais capazes de mimetizar a MEC nativa. Além das possibilidades mencionadas anteriormente, a MEC, em sua forma descelularizada, ou seja, livre de células, pode ser aplicada visando restaurar a dinâmica, composição e estrutura dos tecidos (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

Nas últimas décadas, a partir do uso de MEC acelular foram obtidos com sucesso vasos, pele, ossos e cartilagem, tecidos que notavelmente não requerem um microambiente vascular e estimulatório demasiadamente complexo. Em órgãos dotados de complexidade morfofisiológica como coração, rim, fígado e pulmão são necessárias estudos mais aprofundados para obtenção de substitutos funcionais (ARENAS-HERRERA et al., 2013; GUYETTE et al., 2016; HOGAN et al., 2015; OTT et al., 2008).

Em 2008, foi dado o pontapé inicial no desenvolvimento futuro de tecidos dotados de complexidade vascular e morfofisiológica. Neste referido ano, corações de ratos foram perfundidos com agentes químicos capazes de desestabilizar e romper membranas celulares, dando origem a uma matriz extracelular descelularizada, que mais tarde foi utilizada como arcabouço para reconstrução tecidual utilizando cardiomiócitos. Após a reconstrução, os corações, que foram mantidos em biorreatores, apresentaram repostas elétricas e contráteis promissoras (OTT et al., 2008).

4.3.1 Descelularização

Dada a complexidade e a incompleta compreensão da composição e estrutura da MEC, a fabricação artificial de um arcabouço que mimetize totalmente sua bioquímica e a sua arquitetura ainda não é completamente possível (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). Por este motivo, há um interesse crescente na utilização da própria matriz extracelular natural, capaz de ser obtida através do processo de descelularização em tecidos cadavéricos.

A técnica de descelularizar tecidos tem por finalidade central, retirar da matriz extracelular toda a população celular residente e material genético, mantendo suas características estruturais, biomecânicas e bioativas. A partir dessas características, a MEC descelularizada pode então ser utilizada na biossíntese *in vitro* de tecidos capazes de serem personalizados aplicando na reconstrução células do paciente doente, reduzindo drasticamente a possibilidade de rejeição imunológica e a escassez de órgãos (GILPIN; YANG, 2017; HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018).

Os arcabouços acelulares derivados de MEC são capazes de proporcionar uma combinação complexa de pistas bioquímicas e mecânicas que podem orientar eventos celulares como proliferação, adesão e diferenciação celular durante e após o processo de reconstrução tecidual (GARRETA et al., 2017). A tabela abaixo evidencia outras vantagens no uso de arcabouços descelularizados para reconstrução tecidual:

Tabela 2 – Vantagens no uso de arcabouços descelularizados.

Vantagens
Preservação da ultraestrutura e composição da MEC
Modulação do comportamento celular
Atóxico e não imunogênico
Desempenho biomecânico
Manutenção de fenótipos celulares após recelularização

Fonte: Garreta et. al., (2017).

A descelularização é uma técnica adaptativa capaz de envolver uma mistura de tratamentos físicos, químicos e enzimáticos. Os tratamentos físicos mais utilizados envolvem congelamento-descongelamento e a pressão hidrostática (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Os tratamentos enzimáticos envolvem o uso de enzimas proteases e nucleases (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). No entanto, a perfusão vascular de produtos químicos são a estratégia de escolha por serem mais eficazes. Os reagentes químicos, particularmente detergentes ou ácidos, removem as células nativas ao romperem as membranas celulares (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Como exemplo, ácido acético, ácido peracético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e hidróxido de amônio (NH₄OH), podem romper de maneira eficaz as membranas celulares e organelas intracelulares, entretanto, esses produtos químicos também

dissociam moléculas importantes, como os GAGs dos tecidos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Em relação aos reagentes químicos utilizados na descclularização, os detergentes utilizados são tipicamente não iônicos, iônicos ou zwitteriônicos. Os detergentes não iônicos como o Triton X-100, perturbam as moléculas do DNA, lipídios e proteínas enquanto mantêm as estruturas de proteínas nativas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Os detergentes iônicos como o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o desoxicolato de sódio, solubilizam completamente as membranas celulares e nucleares, além de desnaturarem completamente algumas proteínas (KEANE; SWINEHART; BADYLAK, 2015; WHITE et al., 2017). Os detergentes zwitteriônicos, como o CHAPS, possui boa atividade no que diz respeito a manutenção de moléculas durante a descclularização, além de exibir propriedades iônicas e não-iônicas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Ainda que algum detergente possua reduzida capacidade de lesar a MEC, se espera que possam ter algum efeito disruptivo durante o processo de descclularização (WHITE et al., 2017).

A seleção dos agentes químicos usados na descclularização, tal como a sua aplicação dependem das características do tecido de interesse. Do mesmo modo, como os arcabouços descclularizados podem ser derivados a partir de uma grande variedade de tecidos, também requerem metodologias específicas de descclularização. Por exemplo, vasos, esôfago, tendão, válvulas cardíacas, músculo esquelético e traqueia, são descclularizados através da imersão dos tecidos nos promotores de descclularização. Na contramão, coração, rim, fígado, além de outros órgãos complexos, são descclularizados principalmente através da infusão dos reagentes através de sua rede vascular (HUSSEY; DZIKI; BADYLAK, 2018). O importante no fim é que a metodologia utilizada no processo de descclularização seja a mais eficiente na remoção celular com o menor impacto possível na MEC.

Uma combinação de agentes descclularizantes foram utilizados para obtenção de arcabouços acelulares de múltiplos tecidos e órgãos, incluindo tendão (YOUNGSTROM et al., 2013), esôfago (KEANE et al., 2013), traqueia (BAIGUERA et al., 2010), nervo periférico (KARABEKMEZ; DUYMAZ; MORAN, 2009), medula espinhal (GUO et al., 2010), válvulas cardíacas (CEBOTARI et al., 2010) e derme

(REING et al., 2010). Nos últimos anos, os detergentes foram aplicados para descelularização de órgãos inteiros através de método de perfusão vascular em corações de ratos (OTT et al., 2008), seres humanos (JOHNSON et al., 2016) e porcinos (KITAHARA et al., 2016), pulmões (OTT et al., 2010) e fígado (UYGUN et al., 2010).

4.3.2 Recelularização

A partir de arcabouços descelularizados e de suas propriedades relevantes a reconstrução de tecidos e órgãos complexos por meio de semeadura de células, ou seja, recelularização, tornou-se viável. Após o processo de descelularização de um órgão ou tecido, resta em sua maior parte a MEC, a qual servirá como um suporte para as células, orientando seu rearranjo e maturação. A obtenção de arcabouços com estrutura tridimensional e composição preservadas foi um primeiro passo, mas apesar dos avanços, a tarefa de uma recelularização eficaz permanece, principalmente devido à complexidade e falta de tecnologias eficazes para repovoamento de um órgão inteiro (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015). A recelularização de arcabouço acelulares é considerada etapa crítica no desenvolvimento artificial de órgãos a partir da descelularização, visto que é nesta etapa que as células entram em contato íntimo com a MEC descelularizada.

A recelularização, abordagem com propósito de repovoar o tecido durante sua biossíntese artificial é capaz de utilizar uma ou mais classes celulares com o intuito de reconstituir a micro anatomia tecidual e reestabelecer suas funções mecanofisiológicas específicas (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015). Basicamente, repovoar MEC acelular consiste em injetar populações celulares dentro do arcabouço descelularizado. As metodologias disponíveis para realizar tal procedimento são semeadura por perfusão e injeção intramural (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010; MOSER; OTT, 2014; OTT et al., 2008). Cabe ressaltar que a escolha da abordagem ideal é baseada na anatomia e nas características morfofuncionais de cada órgão (MOSER; OTT, 2014; TAPIAS; OTT, 2014).

A recelularização requer fontes celulares apropriadas, um método ideal de semeadura e um método de cultura que promova principalmente a proliferação e sobrevivência das células. Dentre as várias fontes celulares disponíveis, temos as células fetais,

neonatais e adultas primárias (ambas derivadas do órgão de interesse), células-tronco embrionárias, células tronco-mesenquimais e células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* – iPSCs). A escolha do tipo celular a ser usado no processo de recelularização, além das propriedades do órgão que se objetiva reconstruir, depende de vários fatores tais como a fonte, disponibilidade, custo e facilidade de isolamento, além do número de células necessário para a recelularização (MOSER; OTT, 2014).

Em relação ao uso de células fetais e neonatais, é demonstrado que quando essas células são semeadas em arcabouços descelularizados, elas mantêm seus marcadores fenotípicos, geralmente exibindo funcionalidade e orientação espacial ou compartimental relevante. Apesar de demonstrarem alta capacidade para geração de arcabouços funcionais, não são tipos de células viáveis para uso na bioengenharia de órgãos e tecidos na prática clínica devido a preceitos éticos e regulamentares (SCARRIT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

Outro tipo celular, as células adultas primárias, também foram avaliadas para recelularização, com resultados consideravelmente positivos. No entanto, apesar da possibilidade de obtenção a partir de uma biópsia do órgão ou a partir do órgão de um doador, possuem capacidades proliferativas restritas, podendo ser difícil de expandi-las até o número necessário para o repovoamento de um arcabouço de órgão de tamanho humano (GARRETA et al., 2017).

As células-tronco embrionárias por sua vez, também foram testadas, principalmente devido a sua capacidade de diferenciação em várias linhagens com fácil expansão em cultura e proliferação indefinida. Apesar disso, existem vários desafios que limitam o uso de células embrionárias na bioengenharia de tecidos, tais como as questões éticas, a necessidade de melhor compreensão da biologia das células-tronco, além de questões comerciais relacionadas à viabilidade e preço (HILLEBRANDT et al., 2019).

Ainda não é claramente elucidado os mecanismos pelos quais as células promovem a reconstrução do tecido (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2010). No entanto, para que ocorra a recelularização, é necessário seguir critérios pré-estabelecidos. O primeiro diz respeito a pureza da MEC acelular, que deve conter ínfima quantidade de material

genético e deve ser livre de antígenos, além disso, agentes químicos aplicados na descelularização são um fator agravante, sendo necessário a sua eliminação (MOSER; OTT, 2014). Outro critério essencial refere-se à integridade estrutural e composicional da MEC descelularizada. É sabido que o processo de remoção celular é capaz de degradar componentes essenciais para a homeostase tecidual. Para que ocorra bom repovoamento da MEC, a mesma deve estar estruturalmente viável e deve possuir a maior quantidade possível de moléculas de MEC. Um último critério, mas não menos importante, diz respeito ao suporte nutricional e gasoso para tecidos recelularizados. Para que ocorra a expansão em densidades desejáveis de células, conferir suporte nutricional e gasoso in vitro é essencial (OTT et al., 2008).

Após definição do tipo celular a ser utilizado, é necessário a escolha do método de recelularização, sendo que este depende em grande parte das características do tecido ou órgão de interesse (GILPIN; YANG, 2017). Desse modo, tecidos finos como a pele, podem ser recelularizados através do cultivo direto das células sobre o arcabouço (GUPTA et al., 2013). Entretanto, tecidos espessos e com grande rede vascular, como coração, fígado, rim e pâncreas exigem outras metodologias como a injeção direta de células no parênquima do órgão usando uma pequena seringa com agulha ou infusão de células pela vasculatura e ou outra estrutura oca, como por exemplo, ducto biliar, ureter, lúmen intestinal ou vias aéreas (HILLEBRANDT et al., 2019). Além disso, vários parâmetros devem ser levados em conta durante o processo de recelularização, tais como o número de células e infusões, o tempo de infusão e o número de perfusões.

Após uma recelularização eficaz, os órgãos e tecidos devem permanecer um tempo em cultura para promover a aderência celular na matriz. Como a difusão de gases através de um tecido é limitada a uma espessura aproximada de 200 micrômetros, tecidos de maior espessura exigem vasculatura funcional para fornecer oxigênio e nutrientes às células, além de facilitar a remoção de resíduos metabólicos. Isso geralmente é fornecido por meio de um biorreator, o qual usa uma bomba peristáltica para infundir gases e nutrientes no interior do órgão e assim suprir as necessidades celulares (REMUZZI et al., 2017).

A recelularização de MEC cardiovascular demonstrou-se um desafio à parte para o campo da medicina regenerativa, muito pelas propriedades morfofisiológicas do

coração, que requer a integralização das populações celulares nele residentes, além de um sistema de condução elétrica capaz de difundir um impulso gerado pelo nó sinoatrial para todas as quatro câmaras cardíacas em questão de milissegundos.

Desde o início deste século, inúmeros avanços foram obtidos no contexto da recelularização do tecido cardiovascular. Um desses avanços está relacionado ao estabelecimento da perfusão retrógrada como a abordagem viável e potencial para semeadura de células (OTT et al., 2008). Entretanto, tal forma de entrega celular não é a única capaz de resultar em êxito. Estratégias que consideram um *duo* perfusão e injeção intramural podem ser levadas em conta, neste último pelo fato de que são capazes de atingir regiões menos prelevadas pela perfusão (KITAHARA et al., 2016).

5 METODOLOGIA

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos experimentais com animais foram realizados em conformidade com as diretrizes para pesquisa biomédica de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Biologia Experimental e com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA/UFES nº 42/2016 e 27/2020) (Anexo I e II). Foram utilizados camundongos *swiss* machos saudáveis com idade de 10 semanas, pesando entre 30 e 40 gramas aproximadamente. Os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com regime de ciclo claro/escuro (12h/12h), com temperatura e umidade controladas, água e ração comercial para animais experimentais *ad libitum*. Após os experimentos os animais eutanasiados foram acondicionados em sacola plástica de cor branca com a identificação de risco biológico. Os animais foram conservados em freezer -20°C até a posterior coleta para descarte.

5.2 EUTANÁSIA E PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais de todos os grupos experimentais foram previamente pesados e higienizados em álcool 70%. Para eutanásia, exceto em animais neonatais, foram administrados 100 µl/g via intraperitoneal de solução anestésica contendo 10mg/kg Ketamina (Quetamina®, Vetnil) 90mg/kg e Xilazina (Rompun®, Bayer), e em seguida

foi realizada esternotomia para permitir o acesso a cavidade torácica e conseqüentemente ao coração, que após a remoção foi pesado em balança analítica.

5.3 DESCELULARIZAÇÃO

A descelularização dos corações adultos foi realizada a partir de uma abordagem química composta por solução tampão, detergentes e água destilada. Primeiramente os corações adultos foram perfundidos com PBS pH 7,4 enriquecido com heparina sob concentração de 100 U/mL para a remoção de fluídos e células sanguíneas. Posteriormente o órgão foi perfundido por perfusão retrógrada através do arco aórtico com SDS 1% durante 7 horas. Na sequência, foi perfundido detergente Triton X-100 1% por 1 hora para remoção dos detritos celulares e resíduos de SDS. Por último, perfundimos o arcabouço com PBS pH 7,4 e água ultrapura por 1 hora.

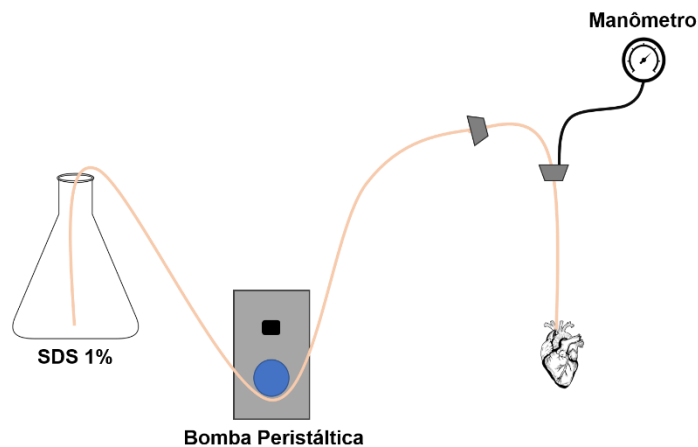


Figura 8 – Esquema representativo do processo de descelularização realizado em corações adultos. Fonte: do autor.

A descelularização de órgãos neonatais foi realizada a partir de uma abordagem química composta por solução tampão, detergente e água destilada. O órgão recém extraído do camundongo após a eutanásia, foi imerso em PBS pH 7,4 enriquecido com heparina sob concentração de 100 U/mL por 30 minutos para remoção de fluídos naturais como sangue e linfa, em seguida incubado em solução detergente SDS 0,2% (Sigma Aldrich®) por 48 horas em temperatura ambiente sob baixa rotação. Após o período de descelularização, o órgão foi imerso em PBS pH 7,4 por 1 hora para remoção de detritos e detergente residual e na sequência água ultrapura por 1 hora, ambos sob baixa rotação.

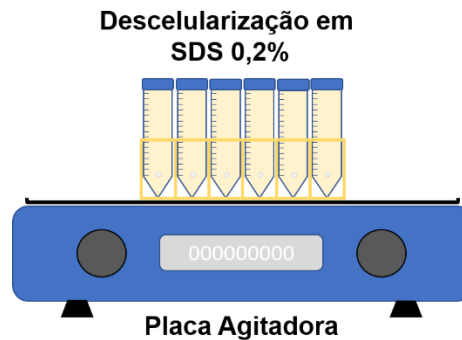


Figura 9 – Esquema representativo do processo de descelularização realizado em corações neonatais. Fonte: do autor.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFO-ESTRUTURAL DE ARCABOUÇO ACELULAR

5.4.1 Análise Histoquímica

Os órgãos adultos e neonatais nativos e descelularizados foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado com PBS por 24h, para então serem processados para a inclusão em Histo-resina Glicol Metacrilato (Leica®) e posteriormente serem seccionados em cortes com 3-5 μm em micrótomo (RM2125, Leica®). Os cortes foram coloridos com Hematoxilina e Eosina para a certificação da ausência de núcleos celulares. Além da coloração por HE, também realizamos a técnica de Picrosirius para evidenciar o conteúdo de colágeno. Após a realização das colorações, com auxílio de um microscópio óptico (Microscópio AX70, Olympus®, Japão) como uma câmera digital (Axiocam ERC5S, Zeiss®) acoplada, foram obtidas fotomicrografias em objetiva de 40x.

5.4.2 Análise Imunohistoquímica de Moléculas da Matriz Extracelular

Para análise imunohistoquímica foram utilizados anticorpos anti-fibronectina (AB2413, Abcam®) e anti-laminina (AB11575, Abcam®) na diluição de 1:100, além de anti-troponina I (ZooMAb®, Sigma-Aldrich) na diluição 1:100 para marcação do perfil fenotípico.

Inicialmente, lâminas de tecido controle e tecido descelularizado foram submetidas a processo de desestabilização da histo-resina a partir de banhos de Tolueno (20min), Xilol (20min) e Acetona (10min). Em seguida foram reidratadas em banhos decrescentes de 5 minutos em álcool 95%, 70%, 50%, 30% e água destilada. As lâminas foram acondicionadas em cuba de plástico contendo tampão citrato pH 6,0

(Spring Bioscience®). O aparato contendo as lâminas foi levado ao micro-ondas em potência máxima por 15 minutos para processo denominado recuperação antigênica. Em seguida, resfriou-se a cuba à temperatura ambiente por 20 minutos e prosseguiu-se com 3 etapas de incubação de 5 minutos em tampão TRIS pH 7,4. As lâminas foram secas individualmente com papel de filtro e em seguida demarcou-se os cortes com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich®). A etapa seguinte, denominada bloqueio de peroxidase endógena, foi realizada utilizando peróxido de hidrogênio em câmara úmida por 20 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se as etapas de incubação em TRIS pH 7,4 e posteriormente, em etapa denominada bloqueio de proteína, foi utilizado sob os cortes demarcados solução bloqueadora de proteínas inespecíficas por 20 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Após a finalização da etapa de bloqueio, escorreu-se o bloqueador das lâminas e adicionou-se sobre os cortes 40 µL dos anticorpos primários. As lâminas com anticorpo foram incubadas *overnight* em câmara úmida. Repetiu-se os banhos em TRIS pH 7,4 e em seguida adicionamos sob os cortes demarcados 50 µL de anticorpo secundário conjugado ao polímero HPR (Nichirei Biosciences®) diluído em concentração 1:100. Para a revelação da reação utilizamos o substrato DAB líquido (Spring Bioscience®). Todas as lâminas foram lavadas em água corrente e desidratadas em álcool para posteriormente serem montadas em meio de montagem DPX.

5.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARCABOUÇO ACELULAR

5.5.1 Determinação Quantitativa de DNA Residual

O conteúdo de remanescente de DNA em arcabouços descelularizados e em seus respectivos controles nativos foram extraídos através de extração salina (BRUFORD et al., 1992)

De maneira resumida, os tecidos foram liofilizados e fragmentados em pequenos pedaços. Aproximadamente 5 miligramas de corações adultos nativos e descelularizados foram destinadas às análises, enquanto para corações neonatais, em ambos os grupos se destinou órgãos inteiros. As amostras foram alocadas individualmente em microtubos, onde foram incubadas *overnight* com tampão de extração (tris 1M, pH 8; NaCl 5M; EDTA 0,5M, pH 8) e tampão de lise (tampão de extração, SDS 10% e proteinase K). Após a completa digestão do tecido, o DNA foi

precipitado com NaCl 5M e o conteúdo proteico foi descartado. O DNA presente nos microtubos foi então ressuspendido em 100 μ L de água destilada e levado à análise quantitativa no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*, EUA).

5.5.2 Determinação Quantitativa de SDS Residual

A determinação de SDS residual foi realizada utilizando uma adaptação do ensaio de azul de metileno descrito anteriormente na literatura (ZVAROVA et al., 2016).

Inicialmente, foi confeccionada curva padrão de detergente a partir de uma solução de SDS a 0,5%. Foram transferidos 1 mL da solução de SDS a 0,5% para um tubo contendo 1 mL de azul de metileno a 0,0125%. A partir dessa solução, agora com concentração de SDS a 0,25%, foram realizadas diluições em 8 pontos distintos (0,0039% a 0,25%) e em seguida prosseguiu-se com a leitura das diluições em triplicata à 650 nm em Espectrofotômetro. Para a mensuração de SDS residual em órgãos neonatais, acondicionamos as amostras individualmente em tubos falcon de 15 mL contendo 1 mL de água ultrapura, em seguida foram desintegradas em um aparelho de ultrassom (Branson®). Em relação a mensuração de SDS residual em órgãos adultos, foram coletados aproximadamente 1 mL de efluente a partir da última etapa de lavagem. As amostras foram transferidas em triplicata de 5 μ L para microtubos de 2 mL, e em seguida foram pipetados igualmente em cada tubo, volume de 495 μ L de solução de azul de metileno à 0,0125%. As amostras foram agitadas e em seguida deixadas em repouso por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mL de clorofórmio (Sigma Aldrich®, USA) em cada microtubo. As amostras foram agitadas e deixadas descansar por 30 minutos. As amostras foram alíquotadas em cubeta de quartzo para prosseguir com leitura de absorbância a 650 nm em espectrofotômetro.

5.5.3 Determinação Quantitativa de Hidroxiprolina

A determinação de hidroxiprolina foi realizada utilizando adaptação de protocolo espectrofotométrico descrito inicialmente na literatura (TORRE; LICHTIG; BERAQUET, 2004).

Para a determinação do aminoácido hidroxiprolina confeccionamos uma curva padrão de 10 pontos, partindo de uma solução contendo 2.600 μ g/ml de hidroxiprolina (Sigma

Aldrich®). As diluições foram realizadas em microtubos de 2ml utilizando água destilada, onde o volume final foi de 100 µL. Os pontos da curva possuíam concentrações entre 2,5 e 1.300 µg de hidroxiprolina. De cada tubo, foram transferidos 50 µL do diluído para novos microtubos. Como branco foi utilizado 50 µL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 450 µL de solução de Cloramina T 0,025M cuja função é oxidar as moléculas de hidroxiprolina da solução. As amostras descansaram por 30 minutos e posteriormente foram adicionados 500 µL de reagente de Erlich 0,5M (de 4-dimetilaminobenzaldeído em uma solução de 2-propanol/ácido perclórico [2:1]). As amostras foram levadas ao banho maria à 60°C durante 15 minutos.

Triplicatas de amostras de tecido inteiro foram inicialmente acondicionadas em tubos de 15 mL contendo 50 µL de NaOH 7N para hidrólise alcalina. Como branco, foi utilizado 50 µL de NaOH 7N que foi submetido a todas as etapas do processamento. Os tubos foram autoclavados à 120°C (p≈98,1kPa) por 40 minutos. Posteriormente, foram adicionados aos tubos, 50 µL de H₂SO₄ 3,5M para neutralizar o hidrolisado. Neste momento, as amostras estavam em volume final de 100 µL. Deste volume, foram transferidos 50 µL para um microtubo. Foram adicionados a estes tubos e ao tubo branco 450 µL de Cloramina T 0,0025M. A solução reagiu por 25 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados aos tubos amostrais e branco, volume de 500 µL de reagente de Erlich 0,5M. A solução foi acondicionada em banho maria à 60°C por 15 minutos. As amostras de tecido e as amostras da curva padrão e seus respectivos brancos foram alíquotadas em microplaca de 96 poços e foram lidas em triplicata à absorbância de 560 nm em Espectrofotômetro leitor de placa (Varioskam Flash®, Thermo Fisher).

5.5.4 Determinação Quantitativa de Glicosaminoglicanos

A determinação de glicosaminoglicanos foi realizada utilizando uma adaptação do ensaio espectrofotométrico de Alcian Blue descrito anteriormente na literatura (KARLSSON; BJÖRNSSON, 2001; ZVAROVA et al., 2016).

Para a determinação de glicosaminoglicanos, foi confeccionada curva padrão de 8 pontos, partindo de solução contendo 800 µg/mL de sulfato de condroitina (Sigma Aldrich®). As diluições foram realizadas em microtubos de 2 mL utilizando água

destilada, onde o volume final foi de 100 μL . Os pontos da curva possuíam concentrações entre 3,1 e 400 μg de sulfato de condroitina. De cada tubo, foram transferidos 50 μL do diluído para novos microtubos. Foram adicionados às alíquotas dos padrões, as amostras em triplicata e ao branco, volume de 50 μL de solução de guanidina-HCl 8M. O volume final após a adição da guanidina-HCl foi de 100 μL . Aos tubos, foram adicionados 50 μL de SAT reagente (0.3% H_2SO_4 /0.75% Triton X-100). Os microtubos descansaram por 15 minutos, e em seguida adicionou-se aos mesmos, 750 μL de reagente de Alcian Blue (Alcian blue 1%; H_2SO_4 0.1%; guanidina – HCl 0.4 M), e posteriormente os tubos ficaram incubados *overnight* à 4°C. Em seguida foram centrifugados à 12.000g por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionamos em cada tubo 500 μL de DMSO para ressuspender o *pellet* e os mantivemos em agitação constante por 15 minutos. Posteriormente, centrifugamos novamente à 12.000g por 15 minutos e descartamos o sobrenadante. Por último, adicionamos 500 μL de reagente Gu-Prop- H_2O (Guanidina-HCl 4M; 1-propanol 33%; Triton 0.25%; Ficoll 0.1%) e ressuspendemos o *pellet*. As amostras foram alíquotadas em placas de 96 poços e prosseguiu-se com leitura em triplicata a 605 nm em Espectrofotômetro leitor de placa (Varioskam Flash®, Thermo Fisher).

5.5.5 Análise Qualitativa e Semi-quantativa da MEC por Espectroscopia Raman

Órgãos nativos e descelularizados foram acondicionados em freezer à temperatura de -80°C por no mínimo 48 horas e posteriormente liofilizados em liofilizador (L101, Liotop®). Para a leitura Raman, posicionaram-se os tecidos sobre papel alumínio, material responsável por reduzir o ruído e intensificar o sinal. A leitura do espalhamento foi realizada em espectrômetro Raman (Metrohm Instant Raman Analyzers – Mira, Metrohm®) ajustado com baixo nível de potência, onde nenhuma degradação da amostra foi notada. O laser de 785nm foi capaz de sensibilizar as biomoléculas matrissomais, que por sua vez foram detectadas investigando as frequências vibracionais entre 400-1800 cm^{-1} , consideradas regiões de impressão digital para materiais orgânicos. Os dados brutos foram analisados no software Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation®, versão trial).

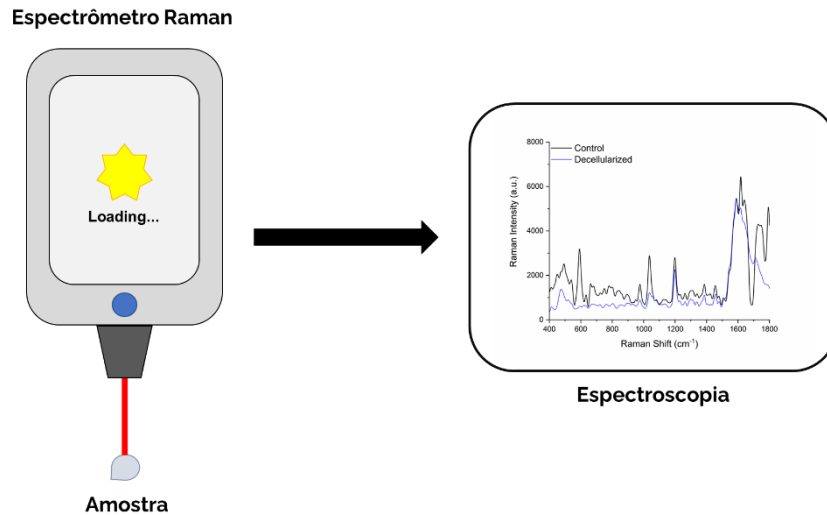


Figura 10 – Esquema representativo da técnica de espectroscopia Raman. Fonte: do autor.

5.6 RECELULARIZAÇÃO

Após o término da descelularização os arcabouços foram perfundidos por 1 hora com solução de ácido peracético 0,1% para remoção de possíveis microrganismos contaminantes. Posteriormente, para remoção do excesso de ácido, realizamos perfusão com água ultrapura por 2 horas. A seguir, os órgãos foram acondicionados em placas de cultura onde foram divididos em dois grupos: [1] não suplementado com fibronectina e [2] suplementado com fibronectina. A suplementação foi realizada a partir de injeção direta de 1mL de solução fibronectina 1 µg/mL em temperatura de 37°C.

Após a suplementação, ambos os grupos foram semeados com a linhagem celular H9c2 em concentração de 5×10^6 células/mL em DMEM High Glucose (SFB 10% e PSA 1%) por protocolo baseado perfusão e injeção direta. Os órgãos foram mantidos em condições de cultura sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Finalizada a recelularização os arcabouços semeados foram acondicionados em 15 mL de fixador paraformaldeído à 4% em PBS e posteriormente processado em parafina para obtenção de cortes histológicos de 3-5 µm que foram destinados à histoquímica por hematoxilina e eosina e à imunohistoquímica por anti-troponina cardíaca I (ZooMAb®, Sigma-Aldrich) para averiguação do perfil fenotípico celular e anti-fibronectina (AB2413, Abcam®) para investigação do processo de recomposição da glicoproteína.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism Versão 7.0.1 (GraphPad, USA, Versão Trial). Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk. Todos os dados apresentaram-se dentro de uma distribuição Gaussiana (comparado ao teste de normalidade com $\alpha=0,05$). Foi aplicado o teste *t* de Student não pareado para comparação entre dois grupos independentes. As amostras entre os grupos foram consideradas significativas quando $*p<0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm EPM.

6 RESULTADOS

6.1 DESCELULARIZAÇÃO

Após a excisão cirúrgica dos corações adultos e neonatais, abordagens metodológicas distintas foram aplicadas para obtenção de arcabouços acelulares nestes estágios de desenvolvimento. Para corações em estágio avançado de desenvolvimento (**Fig. 11a**), utilizou-se o método de perfusão retrógrada, onde o detergente aniônico (SDS), à concentração de 1%, foi perfundido através da rede vascular cardíaca à uma pressão de infusão próxima a 100 ± 10 mmHg com o auxílio de uma bomba peristáltica. Com aproximadamente 7 horas do início do processo, a partir da ação conjunta do detergente e da pressão exercida, o órgão perdeu material celular e tornou-se translúcido, sugerindo que houve sucesso no processo de descelularização (**Fig. 11b**).

Para corações em estágios iniciais de desenvolvimento (**Fig. 11c**), utilizou-se o método de agitação orbital, onde o detergente aniônico (SDS), à concentração de 0,2% foi incubado junto ao órgão e submetido à agitação de aproximadamente 200 RPM. Após 48h do início do processo, o órgão notavelmente perdeu material celular, tornando-se translúcido, sugerindo que a descelularização foi eficaz (**Fig. 11d**).

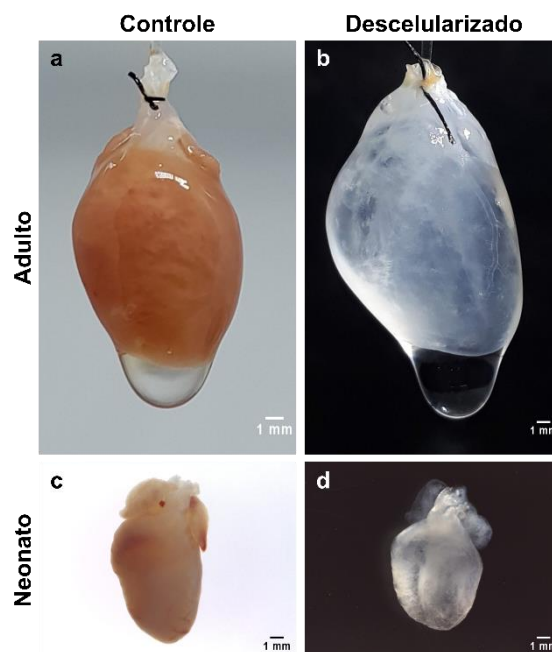


Figura 11 – Aspecto visual dos órgãos nativos e descelularizados durante o processo de descelularização. **(a-b)** Imagens representativas do coração adulto nativo e descelularizado respectivamente. **(c-d)** Imagens representativas dos corações neonatal nativo e descelularizado respectivamente. Barra de escala: 1 mm.

6.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOESTRUTURAL DE ARCABOUÇO ACELULAR

6.2.1 Análise Histoquímica

Para avaliação morfoestrutural dos arcabouços adultos e neonatos descelularizados e seus respectivos controles, foram aplicadas as técnicas histoquímicas de hematoxilina e eosina, além do picrossírius. A coloração histoquímica de hematoxilina e eosina foi capaz de evidenciar a presença de cardiomiócitos e fibroblastos nos controles nativos adultos e neonatais (**Fig. 12a-b**). Como esperado, e já evidenciado pelo aspecto pós-descelularização, o método foi capaz de expor a matriz extracelular dos arcabouços descelularizados adultos e neonatais, confirmando que o processo de descelularização foi notavelmente capaz de remover as populações celulares residentes (**Fig. 12c-d**). Dado o sucesso da descelularização, evidenciada macro e microscopicamente, a coloração histoquímica de picrossírius aplicada na sequência da primeira abordagem, foi capaz de evidenciar a presença de células e colágeno nos órgãos nativos adultos e neonatais (**Fig. 12e-f**), bem como expor a manutenção do conteúdo da referida proteína em materiais descelularizados adultos e neonatais (**Fig. 12g-h**).

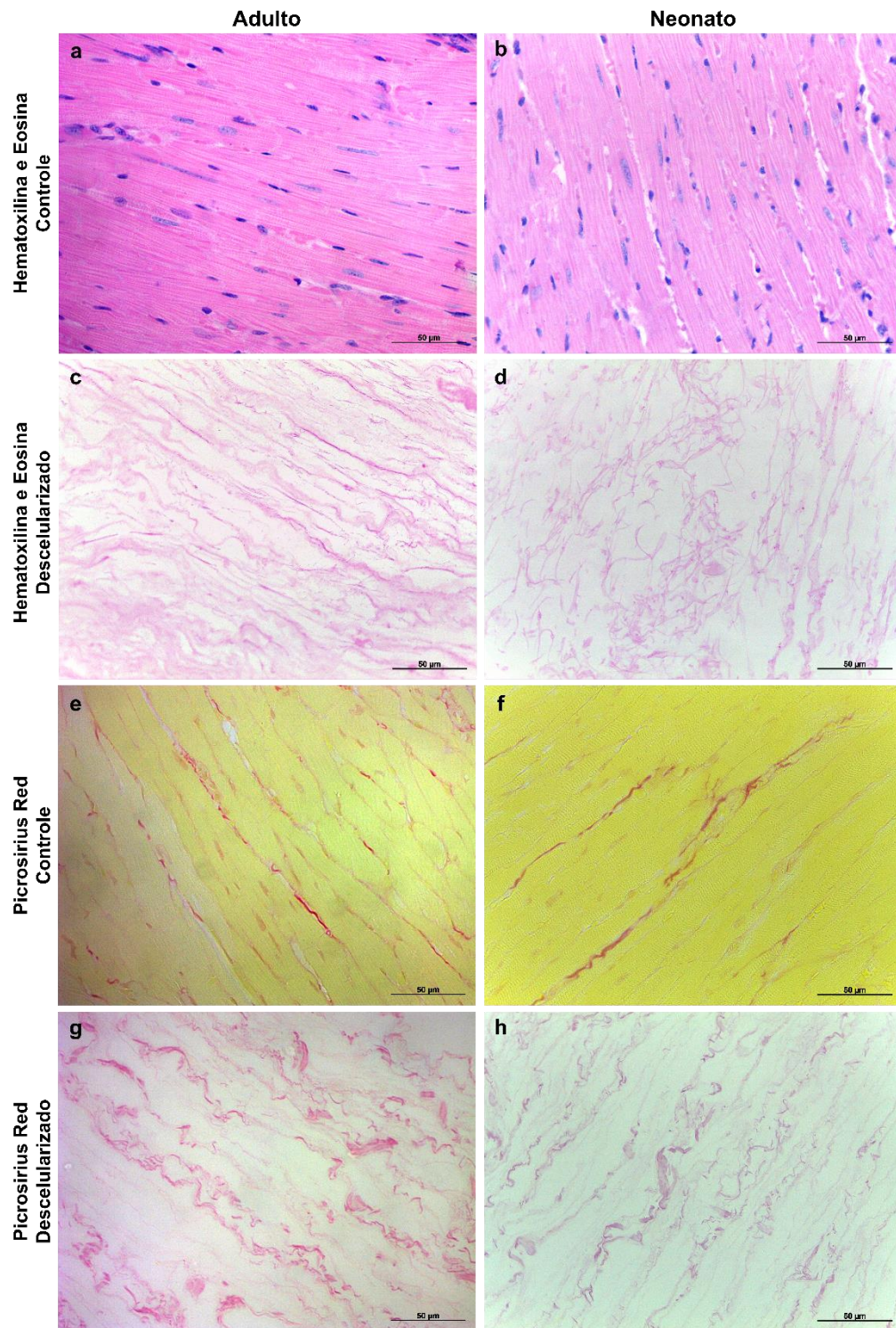


Figura 12 – Aspecto qualitativo da matriz extracelular de arcabouços descelularizados e órgãos nativos (n=5). **(a-b)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal corado por HE, evidenciando os núcleos celulares. **(c-d)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal corado por HE, evidenciando a matriz extracelular preservada. **(e-f)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal corado por picrosirius, evidenciando fibras colágenas por entre as populações celulares. **(g-h)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal corado por picrosirius, evidenciando a integridade da matriz de colágeno após o processo de descelularização. Barra de escala: 50 μm .

6.2.2 Análise Imunohistoquímica

Para avaliação imunohistoquímica de glicoproteínas nos arcabouços adultos e neonatos descelularizados e seus respectivos controles, foram utilizados os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina. A marcação imunohistoquímica com anticorpo anti-fibronectina confirmou a presença da glicoproteína nos órgãos nativos adultos e neonatais (**Fig. 13a-b**). Em arcabouços descelularizados, notavelmente houve a manutenção de fibronectina, entretanto, a disposição organizada da mesma só fora evidenciada no arcabouço obtido a partir órgão descelularizado adulto (**Fig. 13c**), enquanto no arcabouço neonatal a fibronectina apesar de presente, apresenta-se consideravelmente disposta de maneira não organizada (**Fig. 13d**). Para evidenciar a glicoproteína laminina, o anticorpo anti-laminina foi utilizado e confirmou a presença da molécula nos órgãos nativos adultos e neonatais (**Fig. 13e-f**). Nos arcabouços descelularizados, a marcação evidenciou a presença da laminina, entretanto, ela sugestivamente não corresponde ao representado no instante pré-descelularização (**Fig. 13g-h**).

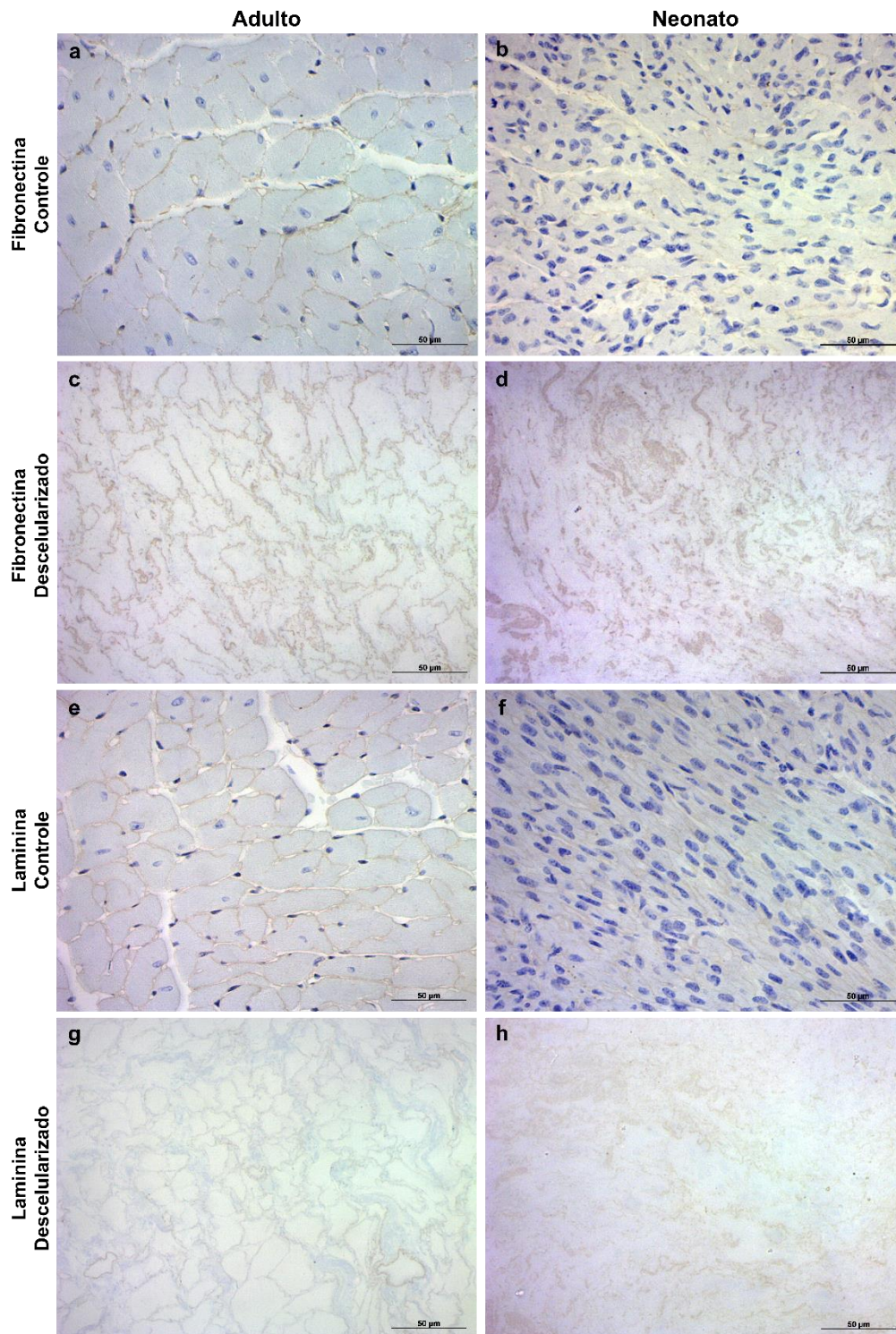


Figura 13 – Aspecto qualitativo das glicoproteínas fibronectina e laminina em arcabouços descelularizados e seus respectivos controles nativos (n=5). **(a-b)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal marcado com anti-fibronectina, evidenciando os núcleos celulares, células e glicoproteínas (marrom). **(c-d)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal marcado com anti-fibronectina, evidenciando a preservação e disposição da referida molécula. **(e-f)** Imagens representativas do controle nativo adulto e neonatal marcado com anti-laminina, evidenciando os núcleos celulares, células e glicoproteínas (marrom). **(g-h)** Imagens do arcabouço descelularizado adulto e neonatal marcado com anti-laminina, evidenciando a disposição e sugestiva perda da referida molécula. Barra de escala: 50 μm .

6.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ARCABOUÇO ACELULAR

6.3.1 Determinação de SDS Residual

Após a descclularização, evidenciamos a redução do conteúdo de SDS a partir da análise dos *scaffolds* descclularizados e efluentes para neonatal e adulto respectivamente. Em relação aos órgãos adultos, que por sua vez foram analisados a partir do efluente, encontramos concentração média de $0,2992 \pm 0,04357\%$ em estágio pré-lavagem e $0,01063 \pm 0,0005180\%$ após a lavagem, representando redução de aproximadamente 96,44% (**Fig. 14a**). Em órgãos descclularizados neonatais, observamos a concentração média de $0,01683 \pm 0,0009213$ em estágio pré-lavagem e $0,01112 \pm 0,0007144\%$ após a lavagem, representando redução de aproximadamente 33,92% (**Fig. 14b**).

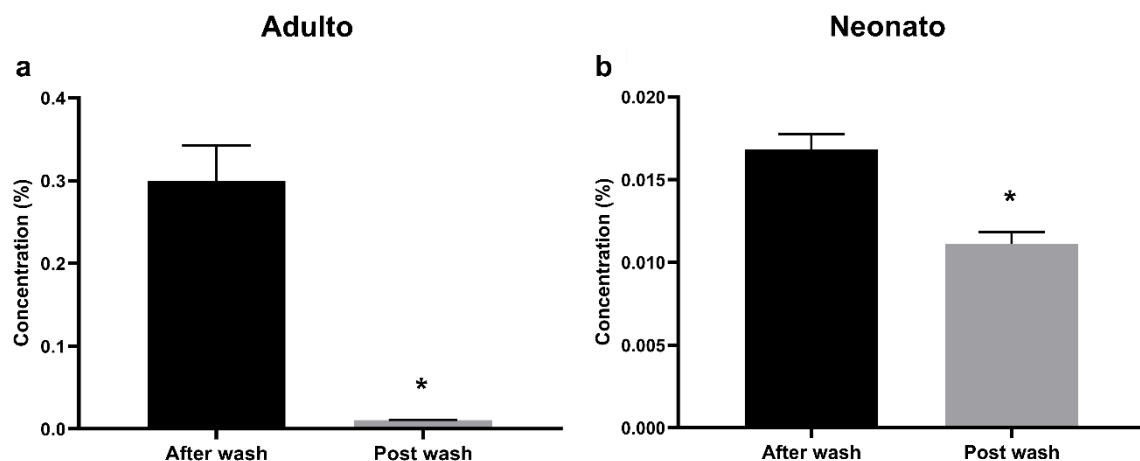


Figura 14 – Análise de SDS residual em arcabouços acelulares pré e pós-lavagem (n=5). **(a)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de SDS no coração descclularizado adulto pós-lavagem. **(b)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de SDS no coração descclularizado neonatal. Todos os valores estão representados com média ± EPM, *p<0,05

6.3.2 Determinação de DNA Residual

Após a caracterização macro e microscópica, observamos redução significativa de material genético em arcabouços descclularizados adultos e neonatais quando comparados ao estágio pré-descclularização. Em arcabouços descclularizados adultos evidenciamos a redução significativa de material genético quando comparado ao seu controle nativo ($58,45 \pm 11,16 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. $357,2 \pm 27,92 \mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) (**Fig. 15a**). Já em relação aos arcabouços neonatais e seus respectivos controles

nativos, evidenciamos redução de aproximadamente 98,5% de ácidos nucleicos ($0,91 \pm 0,06$ vs. $61,19 \pm 7,07$ $\mu\text{g}/\text{peso seco total}$) (**Fig. 15b**).

6.3.3 Determinação Glicosaminoglicanos

Em arcabouços descelularizados adultos evidenciamos a redução do conteúdo de glicosaminoglicanos quando comparado ao seu respectivo controle nativo ($33,18 \pm 3,48$ vs. $109,10 \pm 6,13$ $\mu\text{g}/\text{tecido seco total}$) (**Fig. 15c**), padrão também observado em amostras neonatais ($6,58 \pm 1,06$ vs. $34,13 \pm 1,76$ $\mu\text{g}/\text{tecido seco total}$) (**Fig. 15d**).

6.3.4 Determinação de Hidroxiprolina

O colágeno remanescente evidenciado pela histoquímica de picrosírio pôde ser mensurado indiretamente a partir da dosagem do aminoácido hidroxiprolina. Em arcabouços descelularizados adultos evidenciamos a manutenção do colágeno quando comparado ao seu respectivo controle nativo ($5.509 \pm 818,13$ vs. 4.881 ± 1.487 $\mu\text{g}/\text{peso seco total}$) (**Fig. 15e**). Em relação aos arcabouços descelularizados neonatais, observamos a manutenção do colágeno quando comparado ao seu controle nativo ($330,5 \pm 17,60$ vs. $273,9 \pm 12,30$ $\mu\text{g}/\text{peso seco total}$) (**Fig. 15f**).

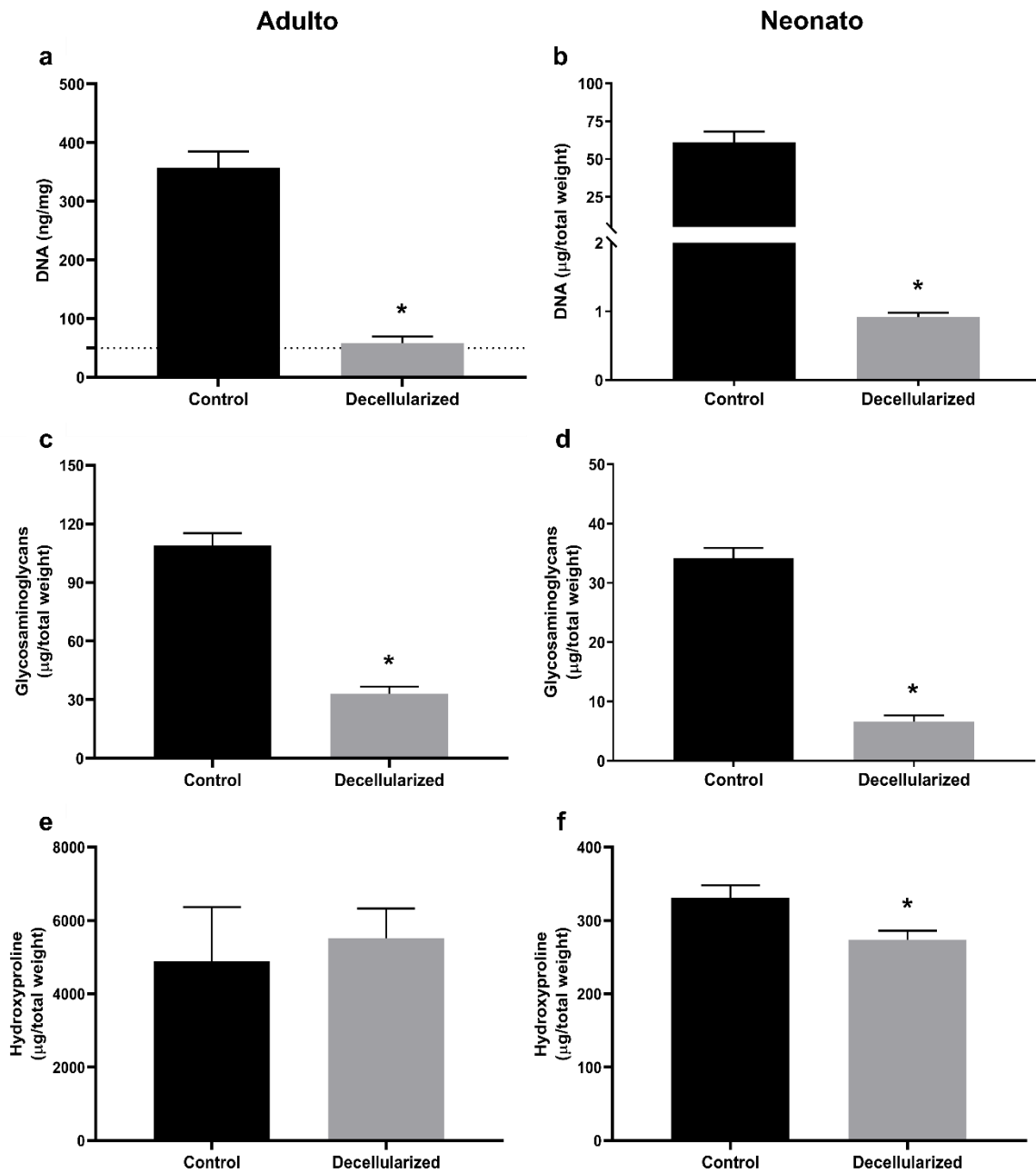


Figura 15 – Análise de material genético e hidroxiprolina remanescentes em arcabouços acelulares e em tecidos nativos (n=5). **(a-b)** Gráfico de barras indicando a redução no conteúdo de DNA nos corações adultos e neonatais nativo e descelularizado. **(c-d)** Gráfico de barras indicando a manutenção no conteúdo do aminoácido hidroxiprolina nos corações adultos e neonatais nativo e descelularizado. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, * $p < 0,05$.

6.3.5 Avaliação Qualitativa da Matriz Extracelular

Os espectros Raman são frequentemente registrados na chamada região de impressão digital (400-1800 cm^{-1}) que contém picos relativamente fracos, mas altamente específicos, permitindo avaliações de matriz extracelular com um grau notável de especificidade das biomoléculas. Em nossas análises, evidenciamos frequências vibracionais nesta região referentes à ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos, colágeno e fibronectina em arcabouços descelularizados adultos e neonatais, além de seus respectivos controles.

Tabela 3 – Frequências vibracionais das principais bandas evidenciadas pela espectroscopia de espalhamento Raman em órgãos adultos. A frequência vibracional em tecidos compactos pode sofrer sobreposição, portanto, considera-se variabilidade de $\pm 1-5 \text{ cm}^{-1}$.

Frequência Vibracional (cm^{-1})		Biomolécula Associada	Referência
Adulto	Neonatal		
661 \pm 5	66 \pm 5	DNA/RNA	Arezoo e colegas (2021)
723 \pm 5	723 \pm 5	DNA/RNA	Hsu e colegas (2020)
975 \pm 5	975 \pm 5	Desoxirribose	Ladiwala e colegas (2014)
1375 \pm 5	1375 \pm 5	Glicosaminoglicanos	Bergholt e colegas (2016)
1198 \pm 5	1198 \pm 5	Hidroxiprolina	Timchenko e colegas (2017)
1458 \pm 5	1458 \pm 5	Fibronectina	Sargazi e colegas (2021)

As frequências vibracionais observadas em torno de 661 cm^{-1} , 723 cm^{-1} e 975 cm^{-1} em órgãos adultos e 662 cm^{-1} , 723 cm^{-1} e 976 cm^{-1} observadas em órgãos neonatais são específicas para ácidos nucleicos e seus derivados. Em relação ao padrão vibracional de glicosaminoglicanos, observamos a acentuação de pico na região 1375 cm^{-1} em ambos os estágios de desenvolvimento. Os picos evidenciados na região 1198 cm^{-1} nos grupos adulto e neonatal correspondem ao padrão vibracional do aminoácido hidroxiprolina, componente estrutural que compõe aproximadamente 14% da molécula de colágeno. Já a frequência vibracional observada na região 1458 cm^{-1} de ambos os estágios de desenvolvimento apresenta especificidade para fibronectina (**Tab. 3**)

Os padrões vibracionais evidenciaram diferenças estruturais na matriz extracelular descelularizada de coração adulto e neonatal quando comparada aos seus

respectivos controles nativos (**Fig. 16a-b**). Observamos considerável redução na intensidade dos picos referentes aos ácidos nucleicos (**Fig. 17a-b**) e ao açúcar desoxirribose (**Fig. 17c-d**) nos espectros descelularizados de órgãos adultos e neonatais. A partir dos espectros também foi possível averiguar de forma semi-quantitativa o conteúdo de material genético e derivados, que por sua vez se apresentaram diferença estatística significativa entre a maioria de seus pares (**Fig. 18a-f**).

Identificamos a vibração característica do colágeno em ambos os estágios de desenvolvimento bem como de seus respectivos grupos, por meio do pico referente ao aminoácido hidroxiprolina (**Fig. 19a-b**). As moléculas de glicosaminoglicanos também puderam ser evidenciadas em ambos os estágios de desenvolvimento (**Fig. 19c-d**). Em relação à fibronectina, órgãos descelularizados e nativos de ambos os grupos apresentam frequência vibracional característica (**Fig. 19e-f**), entretanto, em órgãos descelularizados do grupo neonatal, a intensidade é notavelmente menor quando comparada ao seu controle e aos espectros do grupo adulto (**Fig. 19f**). A partir dos espectros Raman, evidenciamos semi-quantitativamente o conteúdo das biomoléculas hidroxiprolina, glicosaminoglicanos e fibronectina. Para hidroxiprolina em órgãos adultos houve manutenção do conteúdo, na contramão dos órgãos neonatos (**Fig. 20a-b**). Em relação aos glicosaminoglicanos, é possível verificar que houve retenção do conteúdo de glicosaminoglicanos, na contramão dos órgãos neonatos (**Fig. 20c-d**). Quanto ao conteúdo de fibronectina, observamos a retenção em órgãos adultos e redução em órgãos neonatos (**Fig. 20e-f**).

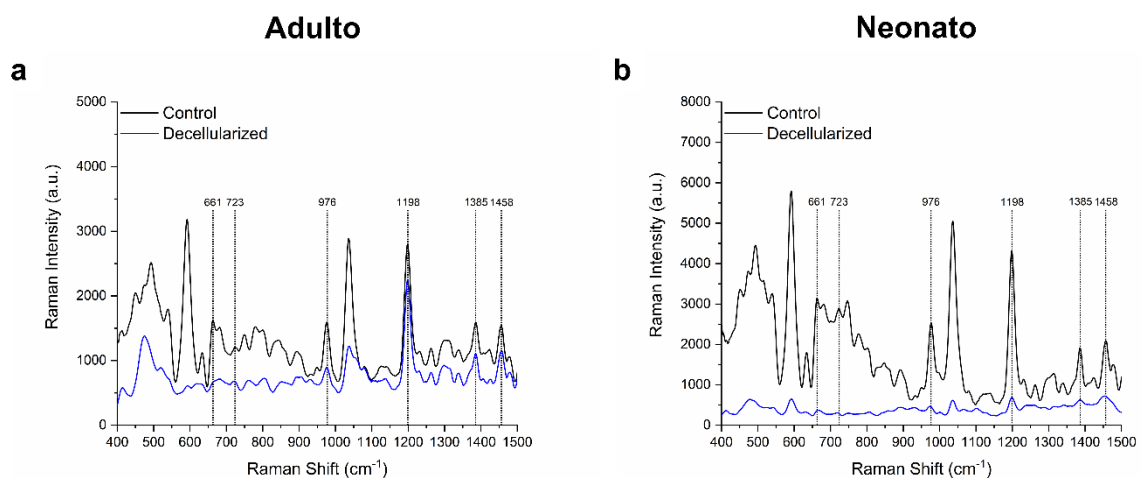


Figura 16 – Frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Sobreposição dos espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal.

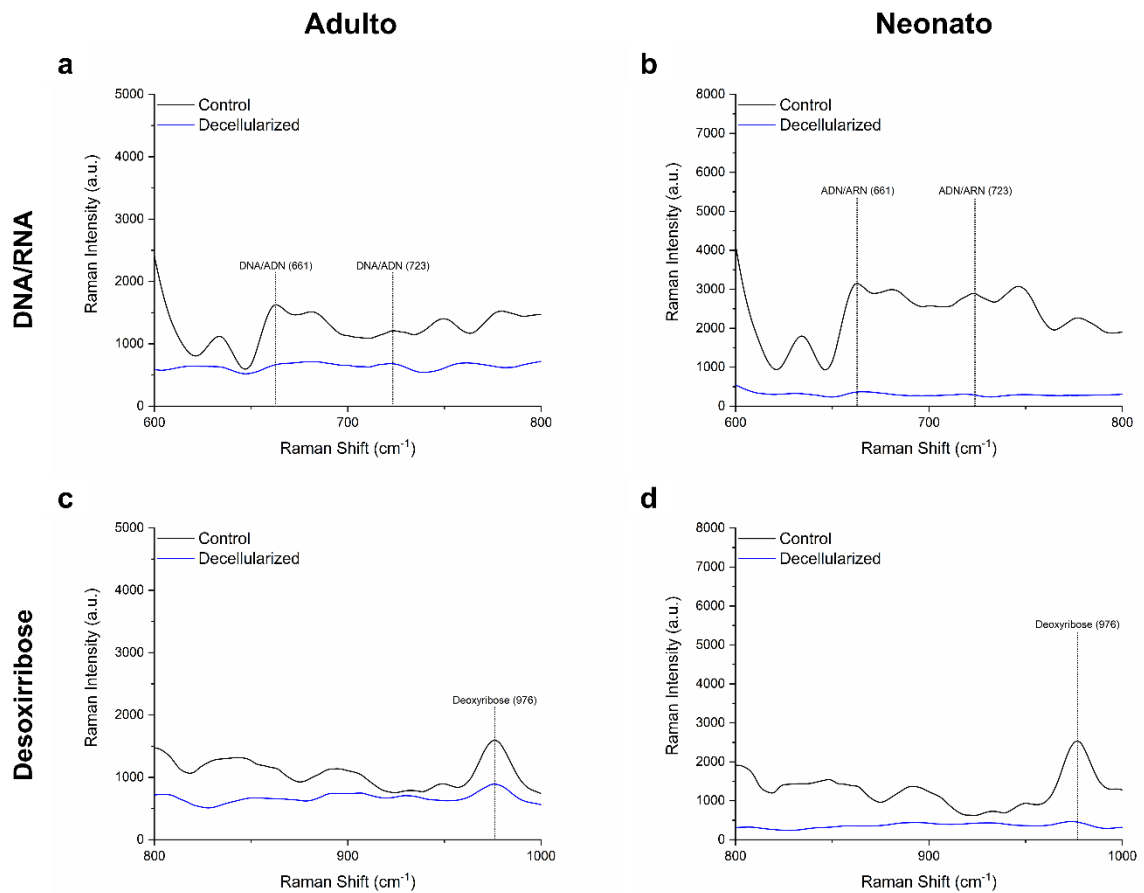


Figura 17 – Frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e desculturizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Picos representativos de ácidos nucleicos em espectros nativos e desculturizados dos grupos adulto e neonatal. **(c-d)** Representação do açúcar desoxirribose em espectros nativos e desculturizados dos grupos adulto e neonatal.

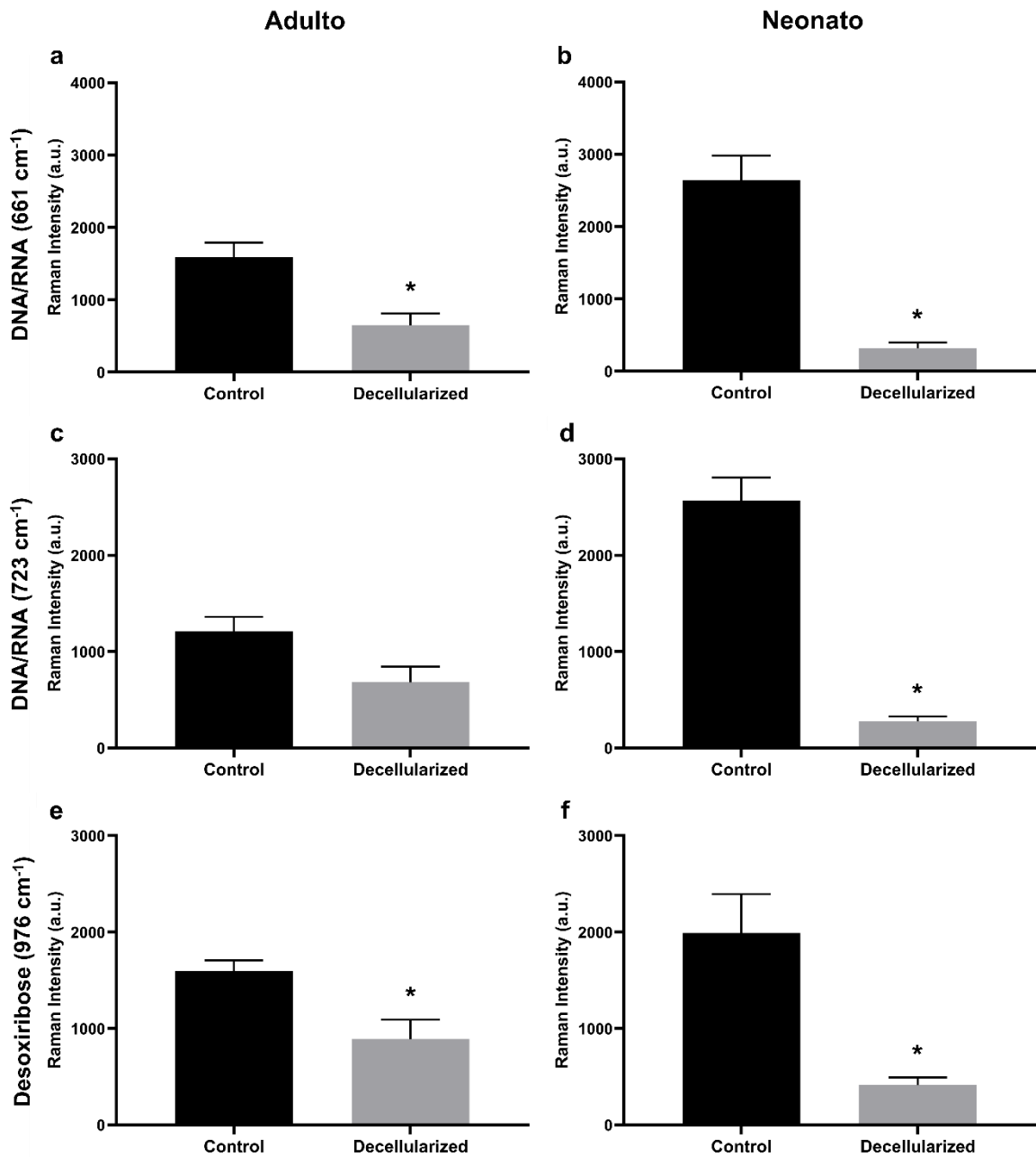


Figura 18 – Investigação semiquantitativa das frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-d)** Representação de ácidos nucleicos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação do açúcar desoxirribose em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. Todos os valores estão representados com média ± EPM, *p<0,05

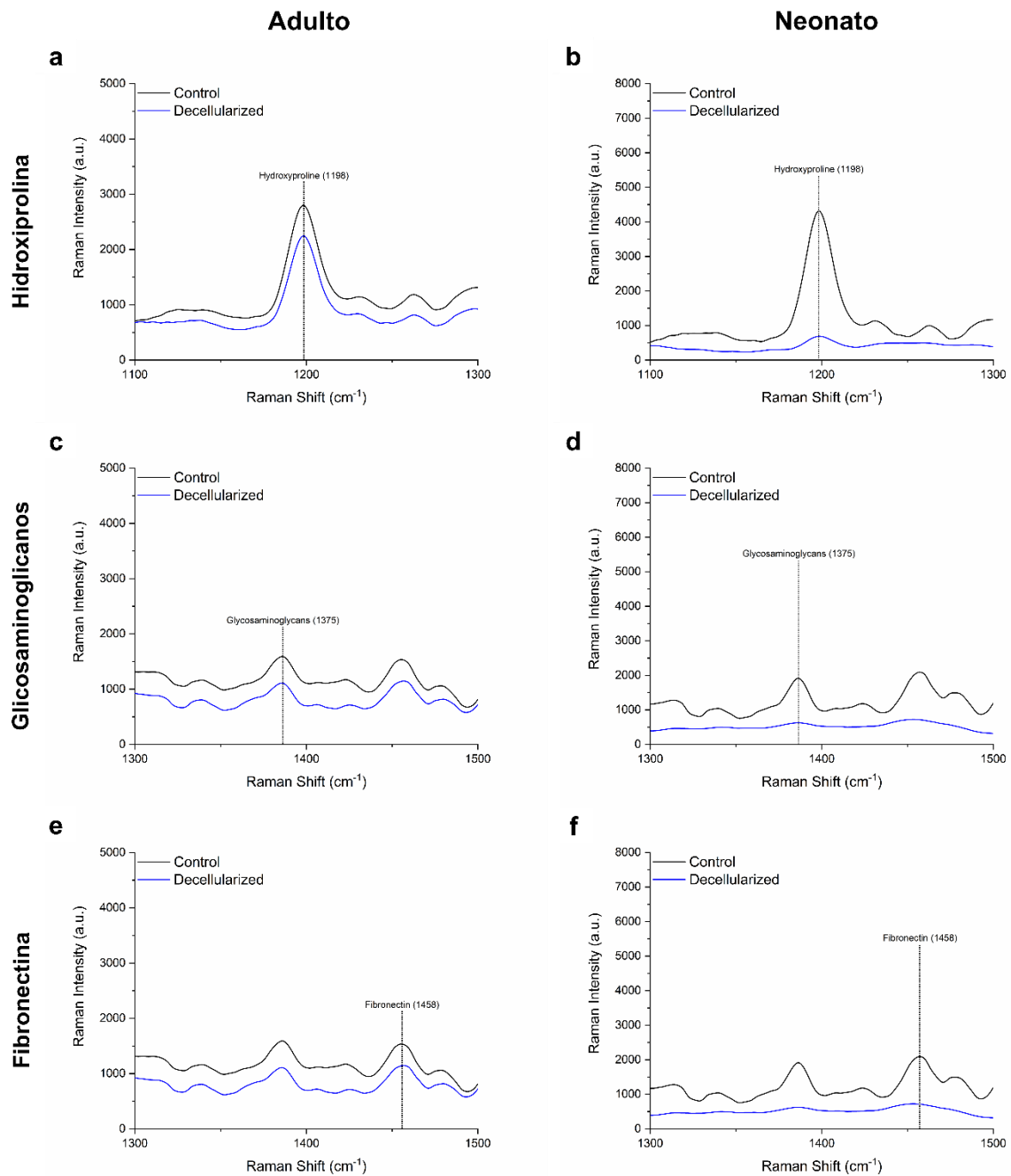


Figura 19 – Frequências vibracionais específicas em órgãos neonatais nativos e decelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Frequências vibracionais representativas do aminoácido hidroxiprolina, diretamente relacionada ao colágeno. **(c-d)** Picos representativos de glicosaminoglicanos em espectros nativos e decelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação da fibronectina em espectros nativos e decelularizados dos grupos adulto e neonatal.

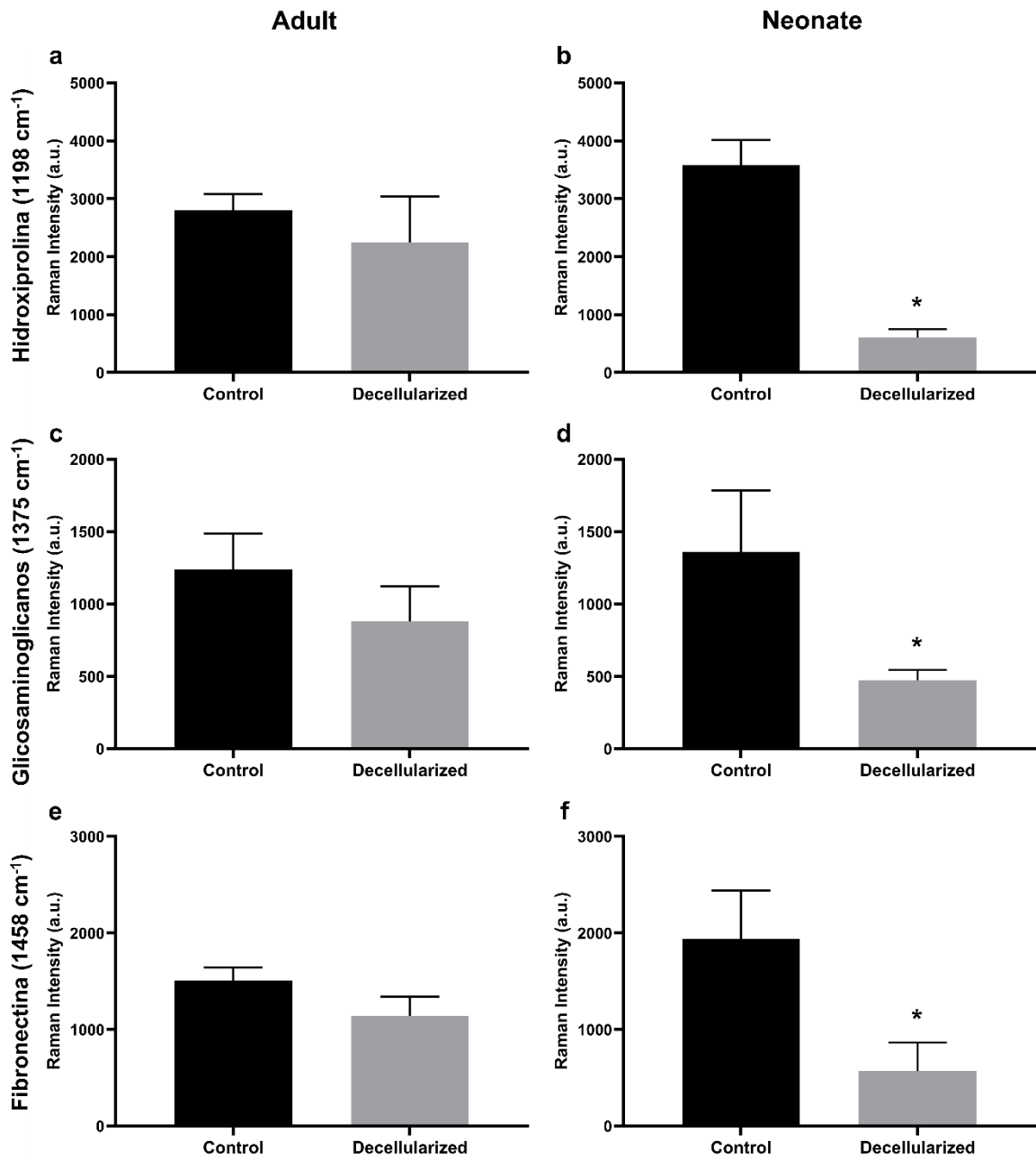


Figura 20 – Investigação semiquantitativa das frequências vibracionais específicas em órgãos adultos nativos e descelularizados obtidas por espectroscopia Raman (n=7). **(a-b)** Representação do aminoácido hidroxiprolina, diretamente relacionada ao colágeno. **(c-d)** Representação de glicosaminoglicanos em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. **(e-f)** Representação da fibronectina em espectros nativos e descelularizados dos grupos adulto e neonatal. Todos os valores estão representados com média ± EPM, *p<0,05

6.4 RECELULARIZAÇÃO

Previamente ao processo de recelularização, observamos que a cultura de células apresentou células com morfologia correspondente à linhagem celular H9c2, além disso, ressalta-se a presença de grupamentos celulares aderentes (**Fig. 21a-d**).

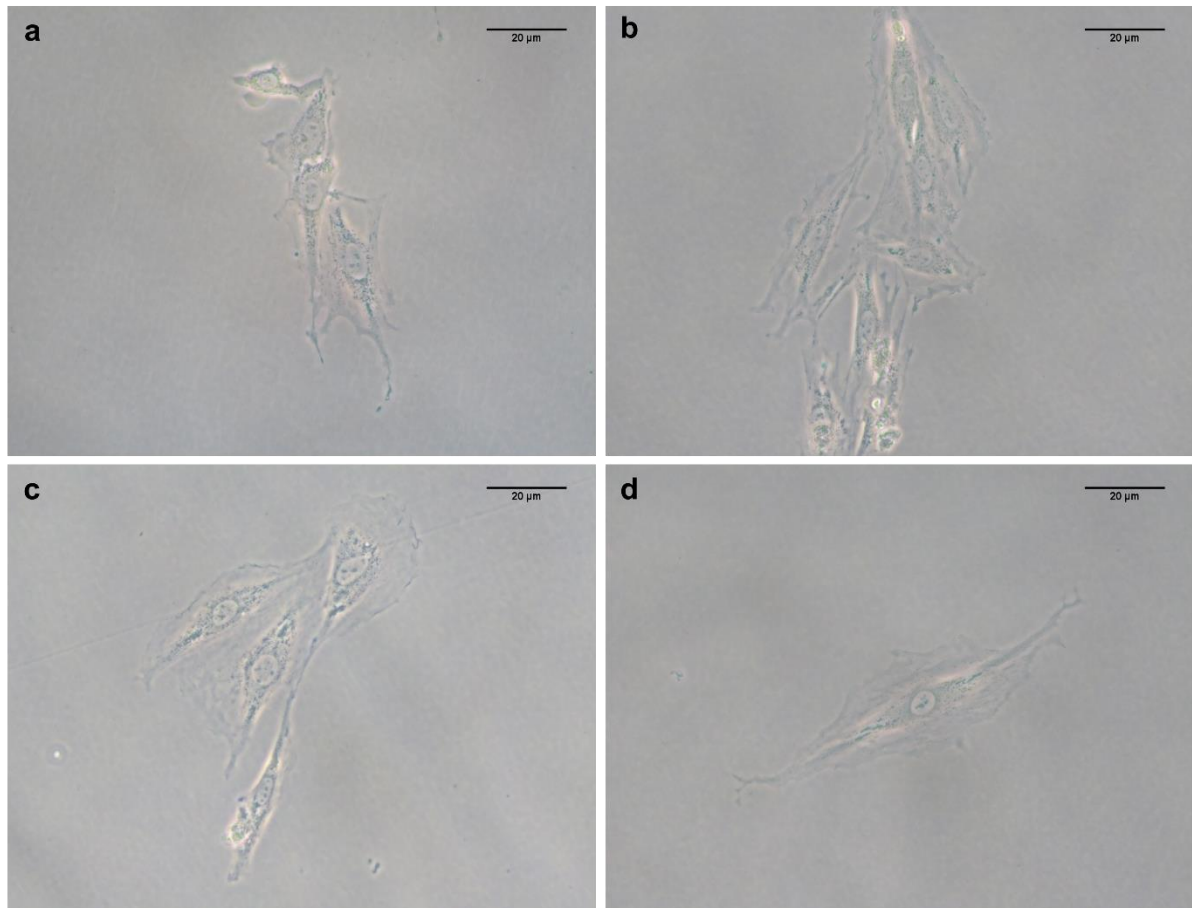


Figura 21 – Fotomicrografias representando a morfologia da linhagem H9c2. **(a-c)** É possível evidenciarmos conjunto de células aderentes e em contato. **(d)** Imagem representativa de uma única célula aderida apresentando aspecto de célula muscular. Barra de escala: 20 µm.

Os corações adultos recelularizados foram mantidos em cultura por aproximadamente 48 horas. Em análise histológica por histoquímica de HE constatamos a presença de núcleos e corpos celulares com morfologia similar a células musculares cardíacas (**Fig.22a-d**). Além disso, observamos que a contagem de células por campo não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos suplementado e não suplementado com fibronectina (**Fig. 23a**).

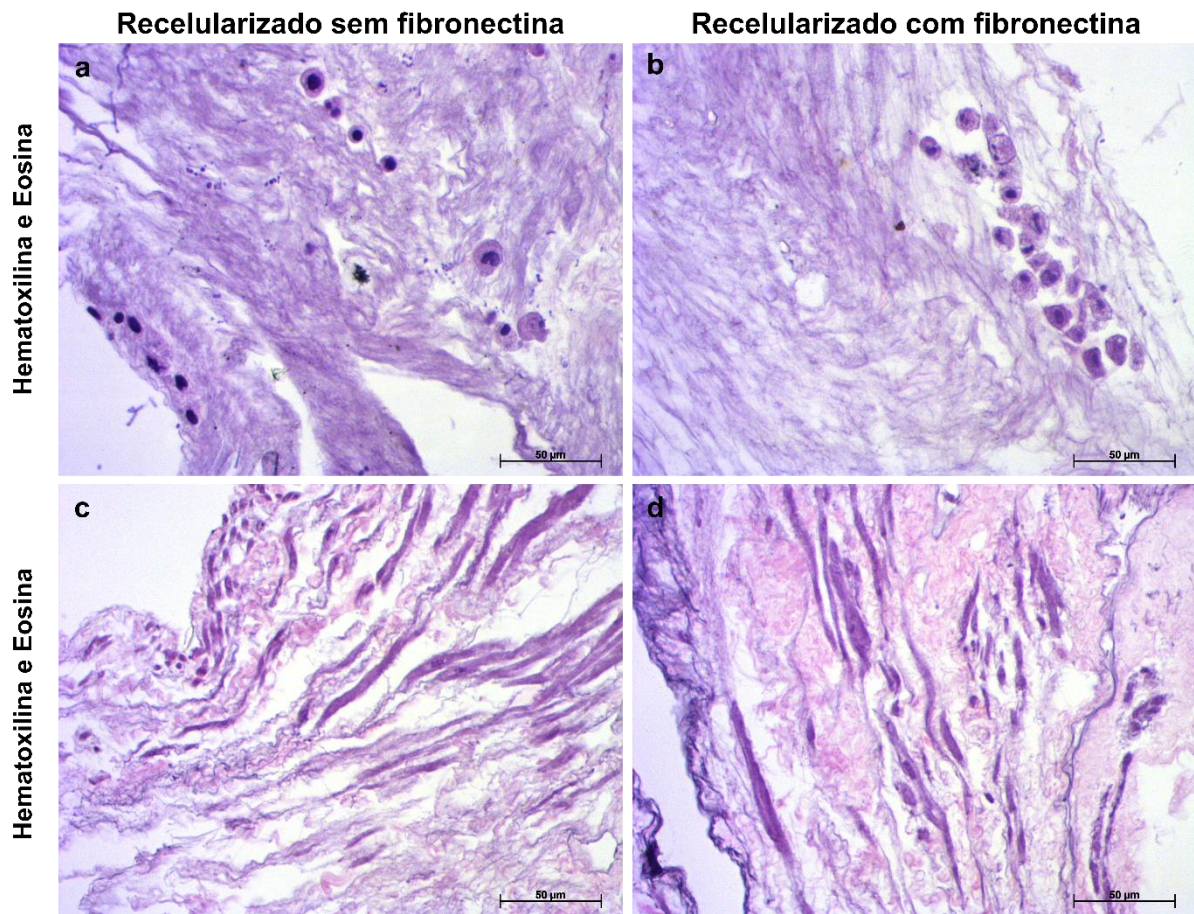


Figura 22 – Aspecto qualitativo de histoquímica dos arcabouços recelularizados enriquecido e não enriquecido com fibronectina (n=3). **(a-b)** Imagens representativas de células aderidas a matriz extracelular com aspecto circular. **(c-d)** Imagens representativas de células aderidas a matriz extracelular apresentando corpo celular com aspecto de aderência. Barra de escala: 50 µm.

Observamos através de imunohistoquímica por anti-troponina cardíaca I o perfil fenotípico da linhagem celular H9c2 (**Fig. 24a-b**). Também pudemos investigar através da marcação por anti-fibronectina a eficiência do protocolo de suplementação da glicoproteína. Constatamos qualitativamente que os *scaffolds* suplementados apresentavam maior intensidade na marcação de fibronectina (**Fig. 24c-d**). Através das fotomicrografias obtidas realizamos análise semi-quantitativa do conteúdo da glicoproteína em arcabouço não suplementados e suplementados e confirmamos a eficiência na recomposição (**Fig. 23a**).

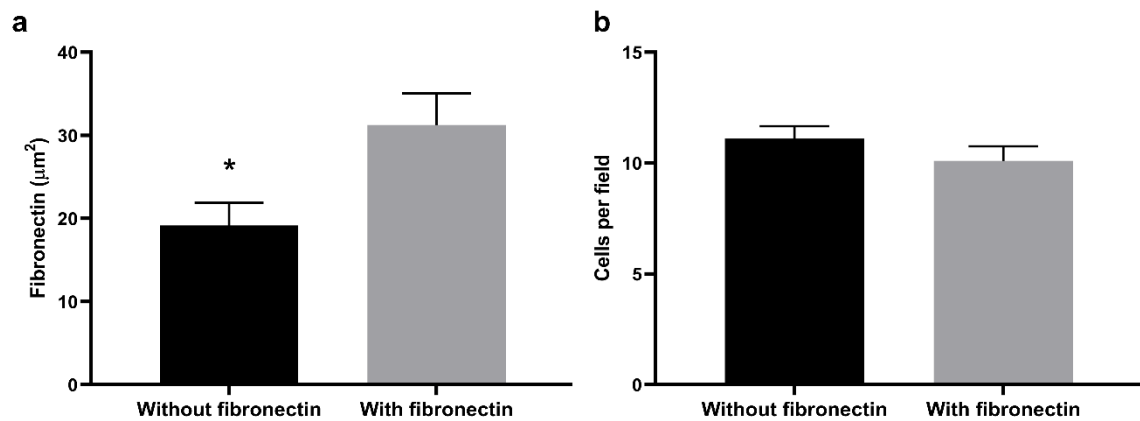


Figura 23 – Gráficos representativos para contagem de células e fibronectina em órgãos suplementados e não suplementados (n=3). **(a)** A contagem de células por campo em *scaffolds* recelularizados (n=3) enriquecidos ou não com fibronectina não apresentou diferença estatística significativa. **(b)** A semi-quantificação de fibronectina por meio de fotomicrografias obtidas após a imunohistoquímica evidenciou que o processo de suplementação foi funcional. Todos os valores estão representados com média \pm EPM, *p<0,05.

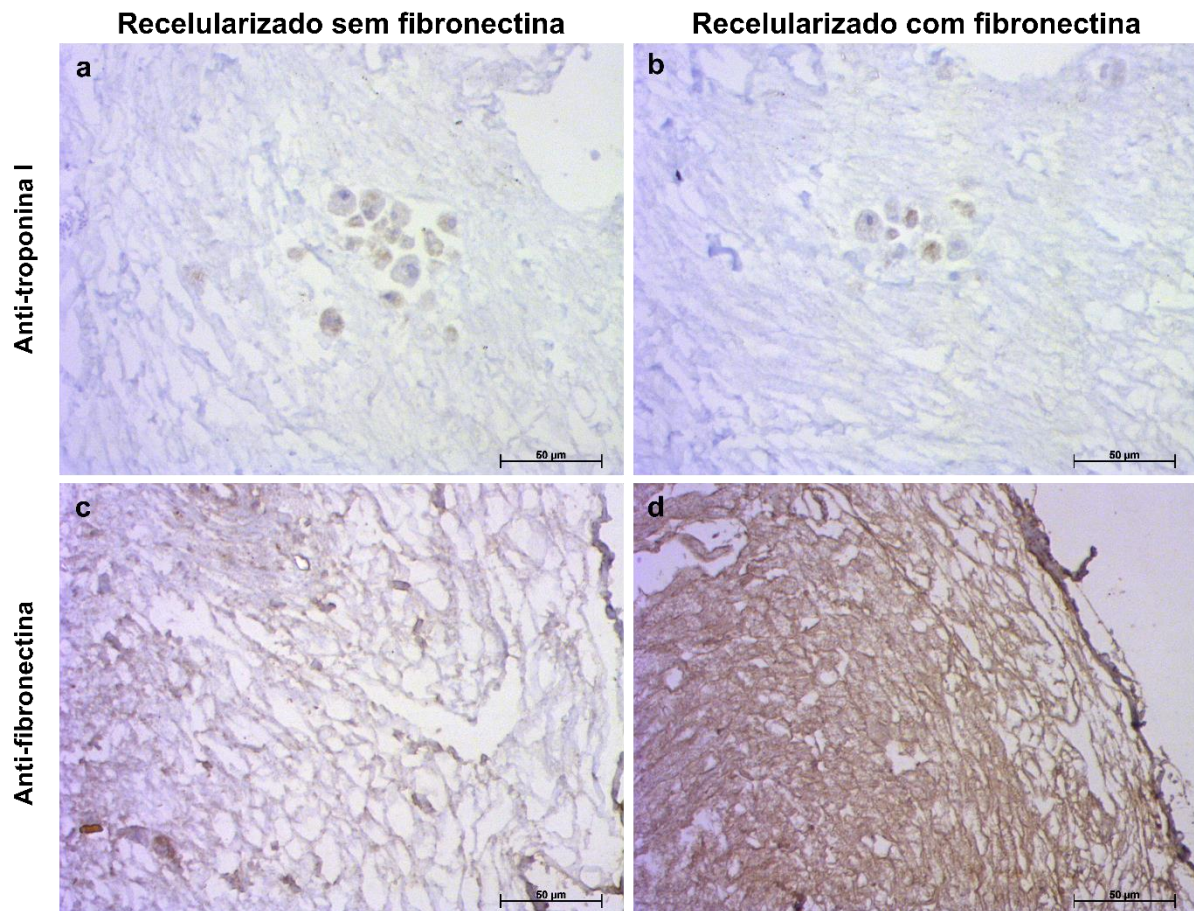


Figura 24 – Marcações imunohistoquímicas por anti-troponina cardíaca I e fibronectina (n=3). **(a-b)** Fotomicrografias evidenciando a marcação em marrom das troponinas cardíacas em células no interior dos *scaffolds*. **(c-d)** Fotomicrografias evidenciando a marcação em marrom da fibronectina em coração não suplementado e suplementado. Barra de escala: Barra de escala: 50 µm.

8 DISCUSSÃO

Neste estudo, arcabouços descelularizados obtidos de camundongos *swiss* adultos foram investigados quanto ao seu potencial de promover eventos celulares capazes de moldar o desenvolvimento bioartificial de coração, além disso, investigamos a influência da fibronectina plasmática humana na reconstrução desses arcabouço a partir de um protocolo de entrega *in situ*. Também buscamos elucidar a composição dos arcabouços adultos, bem como compará-los a arcabouço neonatais através de uma abordagem pouco utilizada junto a bioengenharia tecidual, a espectroscopia Raman.

Williams e colegas (2014), caracterizaram o coração nativo murino identificando as biomoléculas de maior representação em estágios de desenvolvimento embrionário, pós-natal e adulto. A partir desta premissa, obtivemos através da descelularização, arcabouços neonatal e adulto, os caracterizamos com intuito de compará-los e procedemos com a reconstrução de arcabouço adultos *in natura*, bem como suplementados com fibronectina plasmática humana na intenção de mimetizar o microambiente primitivo, encontrado em estágios iniciais de desenvolvimento.

A descelularização dos órgãos neonatais foi obtida através de uma abordagem química, utilizando SDS à 0,2% sob baixa rotação por 48h, na contramão de estudos como o de Garry e colegas (2016), cuja concentração de SDS foi notavelmente superior, atingindo a concentração de 1%. Sabidamente, a exposição de tecidos à concentração elevada de SDS é agressiva à matriz extracelular (ELDER; ELESWARAPU; ATHANASIOU, 2009). Em relação aos órgãos adultos, os arcabouços foram obtidos a partir de uma combinação de SDS e Triton x-100 em concentrações igualitárias de 1% perfundidas com o auxílio de bomba peristáltica através do arco aórtico por 7 horas. Tal estratégia corrobora com os principais estudos cujo objetivo é obter arcabouços descelularizados a partir de coração adulto. Ott e colegas (2008), pioneiros na descelularização de órgãos complexos estabeleceu a perfusão retrógrada de agentes químicos através do arco aórtico como uma abordagem eficaz na obtenção de arcabouços acelulares. Kitahara e colegas (2016), estabeleceram a mesma abordagem como estratégia eficaz na descelularização de coração suíno adulto.

Apesar da relevância do SDS no processo de descclularização, o detergente apresenta elevada toxicidade e possui facilidade em se impregnar na MEC tornando-o difícil de ser removido. Além disso, cabe ressaltar que a presença residual de SDS pode levar a morte celular, além de resposta imunitária do hospedeiro em uma futura aplicação terapêutica dos produtos descclularizados (FRIEDRICH et al., 2017). Para avaliação do detergente residual pós-descclularização de órgãos neonatais e adultos, estabelecemos avaliação do tecido inteiro e efluente respectivamente. Constatamos que o processo de remoção de SDS, realizado a partir de lavagem com Triton-X100, PBS e água ultrapura foi eficaz, reduzindo a concentração de SDS em arcabouço neonatais e adultos em 33,92% e 96,44% respectivamente. Grazter e colegas (2006), estabeleceram que para cultura de fibroblastos, a concentração de 0,0039% a 0,012% se apresentava tolerável às células. Apesar deste achado, Zvarova e colegas (2016) observaram que concentrações superiores a 0,002% podem apresentar algum efeito negativo sobre as populações celulares. Em nosso estudo, encontramos concentração média de 0,011% em arcabouço neonatais e 0,010% em arcabouço adultos.

Em ambos os arcabouços, neonatal e descclularizado, observou-se aspecto translúcido ao final do processo, sugerindo fortemente a perda significativa de matéria celular. Entretanto, a translucidez somente não se apresenta como critério para confirmação da descclularização. Requerendo, para efeito de confiabilidade, a investigação de parâmetros mais específicos capazes de elucidar a composição molecular no instante pós-descclularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Crapo e colegas (2011), estabelecem que a avaliação histológica é capaz de confirmar a ausência de células e, se aplicada a fluorescência por 4-,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) é capaz de demonstrar a ausência de material nuclear, visto que esta molécula é capaz de emitir fluorescência em contato com material genético. Além disso, a mensuração do DNA remanescente, estabelecida pelo autor em 50 ng/mg de tecido seco, é considerada uma abordagem confirmatória eficaz, entretanto, cabe ressaltar que apesar de ser largamente utilizada, não é um parâmetro consensual. Estudos relacionados a descclularização cardíaca não seguiram parâmetro estabelecido, expressando seus achados de diversas formas, como por quantidade de DNA em

tecido inteiro, com base em peso úmido, além de porcentagem (GARRY; KREN; GARRY, 2016; GUYETTE et al., 2014; LU et al., 2013; SILVA et al., 2016).

Em nosso estudo, em ambos os estágios de desenvolvimento observamos significativa redução no conteúdo de material genético nos arcabouços descelularizados. Em órgãos descelularizados adultos, identificamos a presença de 58,45 nanogramas de DNA por miligrama de tecido seco, o que corresponde a redução de aproximadamente 83,63% de material genético nestes arcabouços. Nos órgãos descelularizados neonatais observamos a redução de 93% de material genético, o que corresponde à aproximadamente 0,91 µg ou 910 nanogramas de DNA por órgão descelularizado inteiro. Cabe ressaltar que o parâmetro estabelecido por Crapo e colegas (2011), não se apresenta eficaz na análise deste último arcabouço, tendo em vista que o peso total do órgão não ultrapassa 1 mg.

Os arcabouços descelularizados de ambos os estágios de desenvolvimento apresentaram manutenção de seu microambiente estrutural e ausência de células e núcleos, que pôde ser observado através da coloração histoquímica de hematoxilina e eosina. Além disso, também evidenciamos qualitativamente a manutenção do conteúdo de colágeno por meio da coloração histoquímica de Picrosirius. Cabe ressaltar que a manutenção do microambiente dos arcabouços é essencial para replicar o nicho de estabelecimento celular, além de facilitar a interação e sinalização celular (SACKETT et al., 2018).

O colágeno é o principal componente da MEC e desempenha um papel fundamental na biomecânica, reduzindo consideravelmente o impacto do estiramento tecidual sob as células (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018). Em nosso estudo, a partir da investigação espectrofotométrica de hidroxiprolina, aminoácido que compõe 14% da estrutura de uma molécula de colágeno, pudemos corroborar o que fora sugestivo na avaliação histológica por Picrosirius, a manutenção do conteúdo de colágeno em arcabouços descelularizados adultos e neonatais.

Willians e colegas (2014) identificaram que biomoléculas como fibronectina e laminina são comumente encontradas em órgãos neonatais e adultos, respectivamente. Levando em consideração a influência ímpar das biomoléculas contidas no microambiente do arcabouço, investigamos de maneira qualitativa através da

avaliação imunohistoquímica a presença de ambas as glicoproteínas. Em ambos os estágios, observamos a manutenção do conteúdo de fibronectina, entretanto, é válido ressaltar que a distribuição da referida glicoproteína se difere entre arcabouços adultos e neonatais, muito provavelmente pela influência do estágio de desenvolvimento e estabelecimento fisiológico do órgão (WILLIAMS et al., 2014). Em relação a glicoproteína laminina, em ambos os estágios se apresentou em baixa intensidade e aparente desorganização, sugerindo fortemente que houve o rompimento da membrana basal tecidual em arcabouços adultos, e possivelmente a não completa formação desta estrutura em arcabouços neonatais, que ainda se encontram em desenvolvimento para execução plena de suas funções fisiológicas.

Buscando investigar as biomoléculas remanescentes em arcabouços desculturizados de diferentes estágios de desenvolvimento e confrontar com as dosagens espectrofotométricas, os analisamos através de espalhamento Raman. O espalhamento Raman espontâneo é caracterizado por ser uma interação inelástica entre as moléculas e a luz incidida. Quando a luz interage com uma molécula, ela pode ser excitada, devido a esta interação, uma pequena quantidade de energia é transferida ou removida, contendo assim informações moleculares vibracionais codificadas, ou seja, impressões digitais dos compostos analisados (BERGHOLT; ALBRO; STEVENS, 2017; BERGHOLT; SERIO; ALBRO, 2019). Por este motivo, o espalhamento Raman dos tecidos oferece uma riqueza de informações sobre a estrutura vibracional de suas proteínas, GAGs, lipídeos e DNA.

De acordo com Bergholt e colegas (2017), os picos espectrais são altamente específicos, apresentando ainda intensidades proporcionais ao conteúdo molecular, permitindo avaliações robustas das proporções e concentrações dos constituintes individuais da matriz extracelular em uma amostra. Cabe ressaltar também que, a abordagem analítica não requer marcação molecular ou o emprego de agentes contrastantes.

Os espectros Raman são frequentemente registrados na chamada região de impressão digital, entre $400-1800\text{ cm}^{-1}$, que contém picos relativamente fracos, mas altamente específicos, permitindo avaliações de MEC com um grau notável de especificidade biomolecular. Cabe ressaltar que os picos além de 1800 cm^{-1} , por volta de $2800-3600\text{ cm}^{-1}$ contém bandas menos específicas, porém, exibem um grau mais

alto de intensidade de sinal (BERGHOLT; SERIO; ALBRO, 2019). Apesar da conhecida sensibilidade e especificidade, ressalta-se que em materiais de densidade elevada, a frequência vibracional característica de várias biomoléculas pode ser altamente sobreposta, entretanto, considera-se variabilidade de aproximadamente ± 1 a 5 cm^{-1} .

Em órgãos adultos e neonatais descelularizados pudemos evidenciar a ausência ou baixa intensidade de frequências vibracionais características de ácidos nucleicos em 661 cm^{-1} e 723 cm^{-1} , na contramão dos órgãos adultos e neonatais nativos, que apresentaram considerável intensidade vibracional nas frequências mencionadas. A excitação molecular nessas regiões corrobora com Arezoo e colegas (2021) e Hsu e colegas (2020), que caracterizaram espectros celulares e correlacionaram estes com picos evidenciáveis em 666 cm^{-1} e 720 cm^{-1} respectivamente. Também evidenciamos regiões características da pentose desoxirribose em 976 cm^{-1} , indo de encontro ao relatado por Ladiwala e colegas (2014). A dosagem espectrofotométrica de DNA realizada anteriormente em ambos os grupos corrobora o perfil de excitação molecular para ácidos nucleicos e derivados.

Em relação aos componentes exclusivos da matriz extracelular, ressaltamos que os padrões vibracionais observados em torno de 1198 cm^{-1} em ambos os arcabouços e seus respectivos controles nativos são característicos para hidroxiprolina, aminoácido que compõe cerca de 14% da molécula de colágeno, corroborando com Timchenko e colegas (2017), que estabelecem o pico vibracional deste aminoácido na posição 1202 cm^{-1} . Ao compararmos os espectros com a dosagem espectrofotométrica de hidroxiprolina, evidenciamos, em parte, a manutenção do colágeno, entretanto, ressalta-se que em órgãos neonatais descelularizados a intensidade do sinal é influenciada pela densidade da amostra.

Além do colágeno, buscamos evidenciar a presença de moléculas como glicosaminoglicanos, açúcares sulfatados e não sulfatados de suma importância e com papel ativo na retenção de água nas matrizes extracelulares. Corroborando com Bergholt e colegas (2016) encontramos picos característicos para os glicosaminoglicanos em 1375 cm^{-1} . Cabe ressaltar que o arcabouço descelularizado neonatal não apresentou resultado semelhante ao seu controle nativo e aos grupos descelularizado e nativo adulto, estando possivelmente essa condição relacionada a

densidade da amostra, como também ao tempo de exposição ao detergente SDS durante o processo de descelularização, relatado por Elder e colegas (2009) e Friedrich e colegas (2017) como sendo fator influente na manutenção do conteúdo biomolecular.

De acordo com Sargazi e colegas (2021), a glicoproteína fibronectina apresenta padrão vibracional característico em 1458 cm^{-1} . Em nosso estudo, investigamos as pistas vibracionais da fibronectina e pudemos notar a presença da biomolécula em ambos os arcabouços e em seus respectivos controles nativos na região 1458 cm^{-1} . No entanto, cabe ressaltar que a intensidade demonstrada pelo arcabouço descelularizado neonatal é notavelmente inferior ao seu par nativo, algo justificado também pela densidade amostral.

Após a caracterização qualitativa, quantitativa e semi-quantitativa dos *scaffolds* descelularizados procedemos com o ensaio de reconstrução de arcabouço adultos suplementados e não suplementados com fibronectina a partir da linhagem celular H9c2. Constatamos que a morfologia e perfil fenotípico das células pós-semeadura se apresentava dentro do esperado, com características da linhagem utilizada.

A linhagem H9c2 é originalmente derivada de tecido ventricular embrionário de roedores. Ressalta-se ainda que apresentam morfologia similar aos cardiomiócitos primários, incluindo proteínas de membrana celular e citoplasmáticas, além de propriedades eletrofisiológicas (WATKINS; BORTHWICK; ARTHUR, 2011).

Estabelecemos como estratégia de reconstrução dos arcabouço descelularizados a entrega celular através da perfusão direta pelo arco aórtico, como também por injeção direta, realizadas de forma concomitante e com intuito de aproveitar ao máximo a concentração de células estabelecida para o protocolo. Moser e colegas (2014) e Tapias e colegas (2014) afirmam que a escolha da estratégia de recelularização é órgão-dependente, ou seja, depende de parâmetros inerentes aos tecidos alvo deste estudo. Neste estudo optamos pela junção entre perfusão e injeção pela necessidade de alcançar o estroma tecidual, sem depender apenas da passagem de células pela membrana basal da vasculatura primitiva.

Apesar de verificarmos a presença de células H9c2 no interior dos arcabouço reconstruídos, constatamos que a fibronectina aparentemente não influenciou nos eventos celulares. Todavia, em relação a glicoproteína, investigamos a eficiência de sua recomposição em *scaffolds* descelularizados e pudemos constatar a viabilidade do processo. Por este motivo, sugere-se que a reconstrução dos órgãos descelularizados também foi impactada por outros fatores, tal qual a composição de glicosaminoglicanos, além de resíduos potencialmente letais às células, como é o caso do SDS residual.

Cabe ressaltar que neste estudo estabelecemos como base o potencial da fibronectina relatada por Williams e colegas (2014), que evidenciaram o seu papel na promoção de eventos como migração, adesão, diferenciação e proliferação celular de estroma tecidual e vasos sanguíneos. É sabido que em arcabouços descelularizados, a promoção de determinados eventos pode estar comprometida. White e colegas (2017) afirmam que o processo de descelularização com detergentes como SDS são capazes de solubilizar além de células e glicosaminoglicanos, proteínas elásticas e glicoproteínas, como é o caso da fibronectina.

Por fim, ao investigarmos a influência da glicoproteína fibronectina no processo de reconstrução dos órgãos suplementados, pudemos constatar que apesar de seu potencial, além da eficiência do processo de recomposição, em nosso estudo, não foi possível observar diferença estatística significativa entre arcabouços reconstruídos suplementados e não suplementados. Entretanto, é válido ressaltar que apesar dos vários relatos de que a molécula é promissora, novos estudos devem ser realizados tomando como base principalmente as diferentes classes de fibronectina: plasmática e matrissomal.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em nosso estudo estabelecemos arcabouço descelularizados de diferentes estágios de desenvolvimento cujo microambiente se apresentou consideravelmente preservado através de estratégias analíticas qualitativas, semi-quantitativas e quantitativas. Investigamos a espectroscopia Raman como abordagem analítica não-destrutiva com grande potencial para análise de tecidos descelularizados, contribuindo consideravelmente ao portfólio de técnicas já existentes. Constatamos que a recomposição do conteúdo de fibronectina é uma estratégia viável e acessível, entretanto, pelos resultados obtidos após a reconstrução, arcabouços suplementados não apresentaram diferença estatística quando comparado aos arcabouços não suplementados. Neste contexto, diante deste último achado, sugerimos estudos adicionais capazes de averiguar possíveis fatores interferentes na reconstrução dos órgãos, investigar não somente uma classe de fibronectina, mas todas as outras. Além disso, também é necessário investigar populações celulares além da linhagem H9c2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. [s.l: s.n.]. v. 53

ARENAS-HERRERA, J. E. et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 8, n. 1, p. 014106, 1 fev. 2013.

AREZOO, N.; MOHAMMAD, H.; MALIHEZAMAN, M. Tissue engineering of mouse uterus using menstrual blood stem cells (MenSCs) and decellularized uterine scaffold. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021.

BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds (FALA SOBRE RECELULARIZAÇÃO COM INJEÇÃO DE CÉLULAS). **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, p. 110301095218061, 2010.

BAIGUERA, S. et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8931–8, dez. 2010.

BAKER, S. C.; SOUTHGATE, J. Towards control of smooth muscle cell differentiation in synthetic 3D scaffolds. **Biomaterials**, v. 29, n. 23, p. 3357–3366, ago. 2008.

BERGHOLT, M. S. et al. Raman spectroscopy reveals new insights into the zonal organization of native and tissue-engineered articular cartilage. **ACS Central Science**, v. 2, n. 12, p. 885–895, 2016.

BERGHOLT, M. S.; ALBRO, M. B.; STEVENS, M. M. Online quantitative monitoring of live cell engineered cartilage growth using diffuse fiber-optic Raman spectroscopy. **Biomaterials**, v. 140, p. 128–137, set. 2017.

BERGHOLT, M. S.; SERIO, A.; ALBRO, M. B. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. November, p. 1–16, 2019.

BRAZILIAN ORGAN TRANSPLANT ASSOCIATION. Brazilian registry of transplants: sizing of Transplants in Brazil and in each state (2013-2020). **Brazilian registry of transplants**, v. 26, n. 4, p. 100, 2020.

BROWN, B. N. et al. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 3, p. 428–437, 2010.

- BRUFORD, M. et al. Singlelocus and multilocus DNA fingerprint. In: HOELZEL, A. R. (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: A practical Approach**. 2th^a ed. Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1998, 1992. p. 225–270.
- CALDERWOOD, D. A.; CAMPBELL, I. D.; CRITCHLEY, D. R. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 503–517, 17 ago. 2013.
- CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 3, 1 mar. 2011.
- CEBOTARI, S. et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial organs**, v. 34, n. 3, p. 206–10, mar. 2010.
- COUCHMAN, J. R.; PATAKI, C. A. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 60, n. 12, p. 885–897, 2012.
- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011.
- DE ROBERTIS, E.; HIB, J. **Fundamentos de Biología Celular y Molecular**. 4. ed. [s.l.] El Ateneo, 2004.
- DESTEFANI, A. C.; SIRTOLI, G. M.; NOGUEIRA, B. V. Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. June, 2017.
- DOMOGATSKAYA, A.; RODIN, S.; TRYGGVASON, K. Functional diversity of laminins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 523–553, 2012.
- ELDER, B. D.; ELESWARAPU, S. V.; ATHANASIOU, K. A. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. **Biomaterials**, v. 30, n. 22, p. 3749–3756, ago. 2009.
- FU, R.-H. et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. **Cell transplantation**, v. 23, n. 4–5, p. 621–30, jan. 2014.
- FUNAKOSHI, S. et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential

in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19111, 8 maio 2016.

GARRETA, E. et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. **Materials Today**, v. 20, n. 4, p. 166–178, 2017.

GARRY, M. G.; KREN, S. M.; GARRY, D. J. Neonatal Cardiac Scaffolds: Novel Matrices for Regenerative Studies. **Journal of Visualized Experiments**, v. 1, n. 117, p. 1–8, 5 nov. 2016.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. (FALA SOBRE AGITAÇÃO). **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–83, jul. 2006.

GILLIES, A. R. et al. Method for Decellularizing Skeletal Muscle Without Detergents or Proteolytic Enzymes. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 4, p. 383–389, abr. 2011.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and Tissue Research**, v. 339, n. 1, p. 247–257, 20 jan. 2010.

GUO, S.-Z. et al. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility. **Spinal cord**, v. 48, n. 7, p. 576–81, jul. 2010.

GUPTA, S. K. et al. Modification of decellularized goat-lung scaffold with chitosan/nanohydroxyapatite composite for bone tissue engineering applications. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GUYETTE, J. P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature protocols**, v. 9, n. 6, p. 1451–68, 2014.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. [s.l.] Elsevier, 2006.

- HILLEBRANDT, K. H. et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization. **Transplant International**, p. tri.13462, 17 maio 2019.
- HOGAN, M. et al. Establishing the Framework to Support Bioartificial Heart Fabrication Using Fibrin-Based Three-Dimensional Artificial Heart Muscle. **Artificial Organs**, v. 39, n. 2, p. 165–171, fev. 2015.
- HSIEH, P. C. H. et al. ENDOTHELIAL-CARDIOMYOCYTE INTERACTIONS IN CARDIAC DEVELOPMENT AND REPAIR. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 51–66, jan. 2006.
- HSU, C. C. et al. A single-cell Raman-based platform to identify developmental stages of human pluripotent stem cell-derived neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 31, p. 18412–18423, 2020.
- HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 22 out. 2014.
- HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, v. 3, n. 7, p. 159–173, 2018.
- HUYNH, M. B. et al. Age-related changes in rat myocardium involve altered capacities of glycosaminoglycans to potentiate growth factor functions and heparan sulfate-altered sulfation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 11363–11373, 2012.
- HYNES, R. O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5957, p. 1216–9, 27 nov. 2009.
- HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the matrisome-An inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2012.
- ICARDO, J. M.; COLVEE, E. Atrioventricular valves of the mouse: III. Collagenous skeleton and myotendinous junction. **The Anatomical Record**, v. 243, n. 3, p. 367–375, nov. 1995.
- INAMDAR, A.; INAMDAR, A. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 12, p. 62, 29 jun. 2016.

- JAYADEV, R.; SHERWOOD, D. R. Basement membranes. **Current Biology**, v. 27, n. 6, p. R207–R211, 2017.
- JOHNSON, T. D. et al. Quantification of decellularized human myocardial matrix: A comparison of six patients. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 10, n. 1, p. 75–83, jan. 2016.
- KADLER, K. E. et al. Collagens at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 12, p. 1955–1958, 22 maio 2007.
- KADLER, K. E.; HILL, A.; CANTY-LAIRD, E. G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 5, p. 495–501, 2008.
- KARABEKMEZ, F. E.; DUYZMAZ, A.; MORAN, S. L. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. **Hand (New York, N.Y.)**, v. 4, n. 3, p. 245–9, set. 2009.
- KARLSSON, M.; BJÖRNSSON, S. Quantitation of Proteoglycans in Biological Fluids Using Alcian Blue. In: **Proteoglycan Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2001. p. 159–173.
- KEANE, T. J. et al. Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6729–37, set. 2013.
- KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 84, p. 25–34, ago. 2015.
- KITAHARA, H. et al. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, p. ivw022, 2016.
- KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, 2014.
- LADIWALA, U.; THAKUR, B. L.; CHIDANGIL, S. Raman spectroscopic detection of rapid, reversible, early-stage inflammatory cytokine-induced apoptosis of adult hippocampal progenitors/stem cells. **Centre for Excellence in Basic Sciences**, n. November, p. 2–24, 2014.

- LEONARD, B. L.; SMAILL, B. H.; LEGRICE, I. J. Structural Remodeling and Mechanical Function in Heart Failure. **Microscopy and Microanalysis**, v. 18, n. 01, p. 50–67, 18 fev. 2012.
- LISTER, Z.; RAYNER, K. J.; SUURONEN, E. J. How Biomaterials Can Influence Various Cell Types in the Repair and Regeneration of the Heart after Myocardial Infarction. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 62, 18 jul. 2016.
- LOCKHART, M. et al. Extracellular matrix and heart development. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, v. 91, n. 6, p. 535–50, jun. 2011.
- LONDONO, R.; BADYLAK, S. F. Biologic scaffolds for regenerative medicine: mechanisms of in vivo remodeling. **Annals of biomedical engineering**, v. 43, n. 3, p. 577–92, mar. 2015.
- LU, T.-Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–11, jan. 2013.
- MAURER, L. M.; MA, W.; MOSHER, D. F. Dynamic structure of plasma fibronectin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 51, n. 4, p. 213–227, 3 jul. 2016.
- MECHAM, R. P. Overview of extracellular matrix. **Current Protocols in Cell Biology**, n. SUPPL.57, p. 1–16, 2012.
- MEZZENGA, R.; MITSI, M. The Molecular Dance of Fibronectin: Conformational Flexibility Leads to Functional Versatility. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 1, p. 55–72, 2019.
- MINICUCCI, M. F. et al. Heart Failure After Myocardial Infarction: Clinical Implications and Treatment. **Clinical Cardiology**, v. 34, n. 7, p. 410–414, jul. 2011.
- MOSER, P. T.; OTT, H. C. Recellularization of organs. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 19, n. 6, p. 603–609, 2014.
- MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 771–785, 5 dez. 2014.

MUIZNIEKS, L. D.; KEELEY, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 7, p. 866–875, 2013.

OMS. **Top 10 causes of death worldwide**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. (RECELULARIZAÇÃO). **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–21, fev. 2008.

OTT, H. C. et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. **Nature medicine**, v. 16, n. 8, p. 927–33, ago. 2010.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 221–233, mar. 2007.

PALAZZOLO, G. et al. Cardiac Niche Influences the Direct Reprogramming of Canine Fibroblasts into Cardiomyocyte-Like Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

PORRELLO, E. R. et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. **Science**, v. 331, n. 6020, p. 1078–1080, 25 fev. 2011.

PORRELLO, E. R.; OLSON, E. N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. **Stem Cell Research**, v. 13, n. 3, p. 556–570, 2014.

POSS, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 710–722, 14 out. 2010.

REING, J. E. et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, n. 33, p. 8626–33, nov. 2010.

REMUZZI, A. et al. Experimental Evaluation of Kidney Regeneration by Organ Scaffold Recellularization. **Scientific Reports**, v. 7, n. March 2016, p. 1–13, 2017.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2011.

- SACKETT, S. D. et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.
- SARGAZI, Z. et al. An efficient protocol for decellularization of the human endometrial fragments for clinical usage. **Progress in Biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 119–130, 2021.
- SCARRIT, M. E.; PASHOS, N. C.; BUNNELL, B. A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, p. 43, 2015.
- SCHAEFER, L. Proteoglycans, key regulators of cell-matrix dynamics. **Matrix Biology**, v. 35, p. 1–2, 2014.
- SEKUŁA, M.; ZUBA-SURMA, E. K. Biomaterials and Stem Cells: Promising Tools in Tissue Engineering and Biomedical Applications. In: **Biomaterials in Regenerative Medicine**. [s.l.] InTech, 2018. v. ip. 13.
- SHAFIEE, A.; ATALA, A. Printing Technologies for Medical Applications. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 254–265, 2016.
- SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929–958, 2010.
- SILVA, A. C. et al. Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult. **Biomaterials**, v. 104, p. 52–64, 2016.
- SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, p. 397–419, 2010.
- SKALAK, R.; FOX, C. F. Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, 26-29 Feb. **Alan Liss, New York**, 1988.
- SMITH, R. R. et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. **Circulation**, v. 115, n. 7, p. 896–908, 2007.
- TAPIAS, L. F.; OTT, H. C. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered

organs. **Current opinion in organ transplantation**, v. 19, n. 2, p. 145–52, 2014.

THEOCHARIS, A. D. et al. Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 277, n. 19, p. 3904–3923, out. 2010.

THEOCHARIS, A. D. et al. Cell-matrix interactions: focus on proteoglycan-proteinase interplay and pharmacological targeting in cancer. **FEBS Journal**, v. 281, n. 22, p. 5023–5042, nov. 2014.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, fev. 2016.

TIMCHENKO, E. V. et al. Assessment of decellularization of heart bioimplants using a Raman spectroscopy method. **Journal of Biomedical Optics**, v. 22, n. 9, p. 091511, 2017.

TORRE, J. C. DE M. DELLA; LICHTIG, J.; BERAQUET, N. J. Validação do método espectrofotométrico para quantificação do aminoácido hidroxiprolina em conservas de carne Spectrophotometric method validation for hydroxyproline amino acid determination in canned meat. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 35–42, 2004.

UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–20, 2010.

VALIENTE-ALANDI, I.; SCHAFER, A. E.; BLAXALL, B. C. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Extracellular matrix-mediated cellular communication in the heart. v. 91, p. 228–237, 2016.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, 4 out. 2018.

WATKINS, S. J.; BORTHWICK, G. M.; ARTHUR, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 2, p. 125–131, 2011.

WHITE, L. J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 207–219, 2017.

WICKSTRÖM, S. A.; RADOVANAC, K.; FÄSSLER, R. Genetic analyses of integrin signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 2, p. a005116, 1 fev. 2011.

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, 2014.

WINSLOW, R. L.; WALKER, M. A.; GREENSTEIN, J. L. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37–67, jan. 2016.

WU, L. L. Review of risk factors for cardiovascular diseases. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 29, n. 2, p. 127–33, 1999.

XIN, M.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 529–541, 2013.

YOUNGSTROM, D. W. et al. Functional Characterization of Detergent-Decellularized Equine Tendon Extracellular Matrix for Tissue Engineering Applications. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

YUE, B. Biology of the Extracellular Matrix. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 1, p. S20–S23, 2014.

ZHAO, P. et al. Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. **Frontiers of Mechanical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 107–119, 2018.

ZVAROVA, B. et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 5, p. 418–428, 2016.

ANEXOS

ANEXO I – CERTIFICADO DO CEUA 42/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICATE

We certify that the Protocol **42/2016** related to research project entitled "**Decellularization and recellularization of rodent organs for Development of Functional Bioartificial Organs**", under responsibility of **Breno Valentim Nogueira**, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by this Ethics Committee on Animal Use (CEUA-UFES), being approved at the regular assembly in October 07, 2016.

Vitória (ES), October 07, 2016.



Prof. Roger Lyrio dos Santos
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/CCS/UFES

ANEXO I – CERTIFICADO DO CEUA 27/2020



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **DESENVOLVIMENTO DE CORAÇÃO BIOARTIFICIAL A PARTIR DE ARCABOUÇO DE MATRIZ DESCELULARIZADA ADULTA ENRIQUECIDA COM HIDROGEL NEONATAL** Registrada sob o n.º **27/2020** sob a responsabilidade de **BRENO VALENTIM NOGUEIRA** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **05 de novembro de 2021**.

Vigência da autorização: novembro/2021 a outubro/2025 **Finalidade:** Pesquisa

Espécie(s): Camundongo (Mus musculus)

Linhagem(ns)/raça(s): Swiss

Peso: 30 a 60 gramas - adulto **Idade:** 2 a 4 meses - adulto **Sexo:** Macho
1 a 3 gramas - neonato **3 a 5 dias - neonato**

Número de animais: 160 (80 adultos e 80 neonatos)

Origem: Biotério Central da UFES - CCS

Vitória-ES, 05 de novembro de 2021



Raquel Spinassé Dettogni
Coordenadora da CEUA-UFES

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Encontram-se a seguir os trabalhos científicos publicados em revistas indexadas, frutos de colaborações realizadas durante o período de desenvolvimento desta tese (2018-2021), além de pedidos de patente.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

ZANARDO, T. E. C.; AMORIM, F. G.; TAUFNER, G. H.; PEREIRA, R. H. A.; BAIENSE, I. M.; DESTEFANI, A. C.; IWAI, I. K.; MARANHÃO, R. C.; NOGUEIRA, B. V. Decellularized splenic matrix as a scaffold for spleen bioengineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v.8, p. 573461, 2020.

AIRES, R. et al. Use of kefir peptide (Kef-1) as an emerging approach for the treatment of oxidative stress and inflammation in 2K1C mice. **Food & Function**, v. 13, n. 4, p. 1965–1974, 2022.

DEPÓSITO DE PATENTES

Processo de incorporação de fator de crescimento em matriz de alginato para recelularização de válvula cardíaca (2020). INPI – BR1020200133780.

Sistema de montagem *in situ* de fibronectina em scaffolds descelularizados (2021). INPI – BR1020210165308.