

ANDRESSA DARONCO CERETA

**Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como
constituintes de biomateriais funcionais**

São Paulo

2022

ANDRESSA DARONCO CERETA

**Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como
constituintes de biomateriais funcionais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4279
FMVZ

Cereta, Andressa Daronco
Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como constituintes de biomateriais funcionais / Andressa Daronco Cereta. – 2022.
75 f. : il.

Doutorado (Tese) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Matriz extracelular. 2. Medicina regenerativa. 3. Engenharia tecidual. 4. Biomateriais. I.
Título.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 1st December 2022

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*LARGE-SCALE GENERATION OF PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED CARDIOMYOCYTES FOR APPLICATIONS IN HEART REGENERATIVE MEDICINE*", protocol number CEUAX 4349120520 (ID 001749), under the responsibility Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day February 11, 2021.

Certificamos que a proposta intitulada: "*GERAÇÃO EM LARGA ESCALA DE CARDIOMÍOCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA CARDÍACA*", protocolado sob o CEUAX nº 4349120520, sob a responsabilidade de Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 11 de fevereiro de 2021.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FORMULÁRIO DE ALTERAÇÃO DE DADOS

CPF: [REDACTED] » Característica: **Pesquisa** » Pesquisa

Título da proposta (Português): **GERAÇÃO EM LARGA ESCALA DE CARDIOMÍOCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA CARDÍACA** »
Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como constituinte de biomateriais funcionais

Título (inglês): **LARGE-SCALE GENERATION OF PLURIPOTENT STEM CELL DERIVED CARDIOMYOCYTES FOR APPLICATIONS IN HEART REGENERATIVE MEDICINE** »
Usefulness of decellularized extracellular matrices as a constituent of functional biomaterials

Responsável: **Maria Angélica Miglino** »
Maria Angélica Miglino

Celular: [REDACTED] e-mail: **miglino@usp.br** » miglino@usp.br

CV. Lattes: **http://lattes.cnpq.br/0806064137922471** » http://lattes.cnpq.br/0806064137922471

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres** »
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres Campus: **FMVZ - campus SP**

Vínculo: **Professor titular** » Professor titular

Obj. Acadêmico: **Doutorado** » Doutorado Patente: **Não** » Não

Patrocínio: **Ausente** » Ausente Patrocinador: »

Chefe de Depto: **Luis Cláudio Lopes Correia da Silva** » e-mail: **silvalc@usp.br** » silvalc@usp.br
Luis Cláudio Lopes Correia da Silva

Cronograma: de » 02/2020 a » 12/2022

Resumo: Alteração de título do trabalho para adequação aos resultados finais da tese e título correspondente ao trabalho final a ser depositado. Onde antes no título constava "Geração em Larga escala de cardiomiócitos derivados de Células tronco pluripotentes para aplicação em medicina regenerativa cardíaca/Large-Scale Generation of Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Applications in Heart Regenerative Medicine" favor considerar o que segue: "Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como constituinte de biomateriais funcionais/Usefulness of decellularized extracellular matrices as a constituent of functional biomaterials"

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CERETA, Andressa Daronco

Título: Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como constituintes de biomateriais funcionais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Jaciara e Luís, e ao meu irmão Felipe, pelo apoio incondicional e amor sem importar a distância. Por acreditarem no potencial de uma educação pública e de qualidade, e por tornarem a mesma viável em todas as etapas da minha formação.

À minha orientadora, Maria Angélica Miglino, pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP por proporcionar esta formação, contribuir para meu crescimento acadêmico e pessoal e, pelas oportunidades.

Aos laboratórios e pessoal envolvido da Unidade de Biofísica e Bioengenharia (Universidade de Barcelona, Espanha) e do Programa para o Avanço em Clínica Translacional em Medicina Regenerativa da Catalunha (Instituto de Pesquisa Biomédica de Bellvitge, Espanha) por possibilitarem a realização deste trabalho. Minha gratidão aos professores Ramon Farré e Angel Raya pela acolhida e transmissão de conhecimentos.

À Rê, por estar ao meu lado desde a concepção desta ideia e por dividir os dias. Pelo cuidado, incentivo, paciência, e por trazer leveza e cor para os meus dias, oferecendo um ponto de equilíbrio. Toda a minha gratidão, amor e admiração.

À instituição financiadora deste trabalho, o qual foi realizado parcialmente com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

CERETA, A. D. **Utilização de matrizes extracelulares descelularizadas como constituintes de biomateriais funcionais.** 75p. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As doenças crônicas respiratórias e as doenças cardiovasculares como a insuficiência cardíaca causam danos irreversíveis à estrutura do órgão. A indicação terapêutica preconizada na forma avançada destas doenças é o transplante de órgãos, porém a oferta está longe de suprir a demanda. É crucial o desenvolvimento, além de novas terapias, de novos modelos de doenças pulmonares e cardíaca de modo a estudar sua patofisiologia e mecanismos de reparo e regeneração *in vitro*, e a aplicação da matriz extracelular na geração destes modelos pode proporcionar uma abordagem em potencial. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da utilização da matriz extracelular descelularizada pulmonar e cardíaca na constituição de biomateriais bi- e tridimensionais em diferentes tipos de cultivos celulares. Para isto, pulmões e corações suínos foram descelularizados para a obtenção de um substrato em pó de MEC descelularizada que possibilitou a geração de hidrogéis pulmonares para o cultivo de células tronco mesenquimais pulmonares, pré-géis para revestimentos de placas de cultivos para cultivos bidimensionais, e hidrogéis para cultivos tridimensionais, ambos visando o cultivo de células IPSC e sua diferenciação em cardiomiócitos gerando biomateriais funcionais. O cultivo em hidrogéis pulmonares de células tronco mesenquimais se mostrou viável após 7 e 14 dias. A utilização de um substrato da MEC descelularizada também possibilitou a criação de hidrogéis em diferentes concentrações, em que naqueles mais concentrados houve uma maior interação células-proteínas da matriz. Biomateriais cardíacos elaborados com o substrato da MEC descelularizada cardíaca possibilitaram o cultivo de células pluripotentes induzidas e levaram à sua efetiva diferenciação em cardiomiócitos, com resultados semelhantes ou melhores àqueles cultivos utilizando Matrigel. Cultivos de cardiomiócitos em placas revestidas com pré-gel e em hidrogéis, ambos de MEC cardíaca descelularizada, possibilitaram a maturação destas células e sua viabilidade foi mantida, incluso após seu cultivo em suspensão. A utilização da MEC descelularizada pulmonar e cardíaca para a produção de substrato e sua aplicação em diferentes tipos de cultivos celulares demonstra seu potencial para a bioengenharia e medicina regenerativa, aproveitando suas características estruturais e bioquímicas para a criação de biomateriais funcionais que preservem as condições do tecido nativo, ampliando perspectivas de sua aplicação futura na geração de modelos de doenças *in vitro* ou na busca de alternativas terapêuticas sem abrir mão da manutenção do microambiente tecidual ideal.

Palavras chave: matriz extracelular, medicina regenerativa, engenharia tecidual, biomateriais.

ABSTRACT

CERETA, A. D. **Usefulness of decellularized extracellular matrixes as a component of functional biomaterials.** 75p. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Chronic respiratory diseases and cardiovascular diseases such as heart failure cause irreversible damage to organs' structure. The recommended therapeutic option in the advanced form of these diseases is organ transplantation, but it is far from meeting demand. It is crucial to develop, in addition to new therapies, new models of lung and heart disease in order to study its pathophysiology and *in vitro* repair and regeneration mechanisms, and the application of the extracellular matrix in the generation of these models can provide a potential approach. This study aimed to evaluate the potential of decellularized pulmonary and cardiac extracellular matrix as a constituent of two- and threedimensional biomaterials for different types of cell cultures. For this, porcine lungs and hearts were decellularized to obtain a powdered substrate of decellularized ECM that enabled the generation of pulmonary hydrogels for the cultivation of pulmonary mesenchymal stem cells, pre-gels for coating culture plates for two-dimensional cultures, and hydrogels for three-dimensional cultures, both aiming at the cultivation of iPSC cells and their differentiation into cardiomyocytes, generating functional biomaterials. Cultivation of mesenchymal stem cells in lung hydrogels was feasible after 7 and 14 days. The use of a decellularized ECM substrate also enabled the creation of hydrogels at different concentrations, in which the more concentrated had a greater cell-matrix protein interaction. Cardiac biomaterials made with cardiac decellularized ECM substrate allowed the cultivation of induced pluripotent stem cells and led to their effective differentiation into cardiomyocytes, with similar or better results to those cultivated using Matrigel. Cardiomyocytes seeded in plates coated with pre-gel and in hydrogels, both of decellularized cardiac ECM, allowed the maturation of these cells and their viability was maintained, even after their culture in suspension. The use of pulmonary and cardiac decellularized ECM for substrate production and its application in different types of cell cultures demonstrates its potential for bioengineering and regenerative medicine, taking advantage of its structural and biochemical characteristics to create functional biomaterials that preserve native tissue conditions, broadening prospects for its future application in the generation of *in vitro* disease models or in the search for therapeutic alternatives without giving up the maintenance of the ideal tissue microenvironment.

Keywords: extracellular matrix, regenerative medicine, tissue engineering, , biomaterials.

SUMÁRIO

<u>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</u>	12
1.1. HIPÓTESE	14
1.2. OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
1.3. APROVAÇÃO POR COMITÊ DE ÉTICA	15
<u>CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA</u>	16
2.1 MATRIZ EXTRACELULAR	16
2.2 A MATRIZ EXTRACELULAR E OS PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO	19
2.3 BIOENGENHARIA PULMONAR	22
2.4 HIDROGÉIS E BIOIMPRESSÃO TRIDIMENSIONAL	24
2.5 BIOENGENHARIA CARDÍACA	25
2.6 CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)	25
<u>CAPÍTULO 3: Otimização da descclularização pulmonar e geração de hidrogéis para cultivos tridimensionais</u>	27
3.1. INTRODUÇÃO	27
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.2.1 Otimização do processo de descclularização do pulmão suíno esquerdo para obtenção de substrato de matriz extracelular pulmonar	29
3.2.2 Avaliação do processo de descclularização pulmonar	30
3.2.3 Desenvolvimento de hidrogéis pulmonares derivados da matriz extracelular	31
3.2.4 Elaboração de biomateriais derivados da matriz extracelular pulmonar para o cultivo celular tridimensional	31
3.3. RESULTADOS	34
3.3.1 Descclularização do pulmão suíno esquerdo e obtenção de substrato de matriz extracelular pulmonar	34
3.3.2 Desenvolvimento de hidrogéis pulmonares derivados da matriz extracelular	38
3.4. DISCUSSÃO	43
3.5. CONCLUSÃO	47
<u>CAPÍTULO 4: Utilização da matriz extracelular descclularizada cardíaca na geração de cultivos bidimensionais e biomateriais tridimensionais</u>	48
4.1. INTRODUÇÃO	48
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	50

4.2.1 Descelularização do miocárdio e obtenção de substrato de matriz extracelular cardíaca	50
4.2.2 Cultivo celular de células tronco pluripotentes induzidas humanas e diferenciação em cardiomiócitos	51
4.3. RESULTADOS	54
4.3.1 Descelularização do miocárdio	54
4.3.2 Substrato de matriz extracelular cardíaca e cultivo 2D e 3D de IPSC e cardiomiócitos	57
4.4. DISCUSSÃO	64
4.5. CONCLUSÃO	67
5. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A	77

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

As enfermidades inflamatórias que afetam o sistema respiratório formam um grupo de condições caracterizada por altos níveis de cronicidade e mortalidade. Causando danos irreversíveis ao órgão, a inflamação crônica no pulmão progride ao passo que também causa insuficiência respiratória. Doenças como enfisema, bronquite crônica (ambos quadros da doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC), asma e câncer de pulmão constituem a terceira principal causa de óbito mundialmente, levando à diversas mortes prematuras, as quais não possuem outra indicação terapêutica alternativa ao transplante pulmonar (SHAKIR; HACKETT; MOSTAÇO-GUIDOLIN, 2022).

O sucesso do transplante pulmonar é limitado, principalmente devido à característica mais frágil do órgão se comparado a outros órgãos sólidos, como fígado ou rim. Alguns fatores como trauma torácico, barotrauma pulmonar, pneumonia, entre outros, ainda fazem com que a taxa de sucesso dos transplantes pulmonares fique entre 15% e 25% (CHAN *et al*, 2020).

Além das condições que limitam o número de transplantes realizados, o baixo número de doações requer estratégias para aumentar a disponibilidade de órgãos para transplante. Necessidade esta, reforçada pelo aumento da lista de espera de pacientes com doenças respiratórias graves, incapacitantes e terminais. A doença por coronavírus (COVID-19), por exemplo, não ajuda a diminuir esta lista, de forma que limita a oferta de órgãos adequados para transplantes pulmonares naqueles casos em que houve infecção recorrente por coronavírus tipo 2 (SARS-COV-2) (BHARAT *et al*, 2020).

Do mesmo modo que as doenças crônicas pulmonares causam danos irreversíveis à estrutura dos tecidos e do órgão, as doenças cardiovasculares (DCV) também figuram entre as principais causas de mortalidade mundialmente, e sua incidência tem aumentado em decorrência de associação com outras doenças crônicas. Estima-se que 30% de todas as causas de mortalidade humana nas primeiras décadas do presente século decorreram, ou decorreriam, de problemas cardíacos. No Brasil, as DCV são a principal causa de óbito no país. (OLIVEIRA *et al*, 2021; POLONCHUK; GENTILE, 2021).

Mais de três quartos das mortes globais por DCVs ocorrem em países de baixa e média renda, onde a incidência das mesmas e de fatores de risco está aumentando como resultado de uma transição epidemiológica em andamento, como é o caso do Brasil. Baixo investimento em programas de prevenção, falta de acesso da população à atenção primária em saúde, falha na detecção e tratamento de fatores de risco e o aumento da parcela da população em condição de pobreza são contribuintes para o aumento desta estatística (WHO, 2021).

Uma das principais razões pelas quais as DCVs possuem alto índice de mortalidade e morbidade é a baixa capacidade de autorreparo do coração após uma lesão, e as terapias disponíveis atualmente para insuficiência cardíaca em estágio final são limitadas ou sintomáticas, uma vez que não é possível regenerar o músculo cardíaco afetado (WANG *et al*, 2021).

Atualmente os tratamentos voltados à pacientes com DCVs são baseados em fármacos, intervenção cirúrgica, dispositivos de assistência ventricular esquerda ou transplante de coração. Apesar dos tratamentos farmacológicos retardarem a progressão da doença em estágio final, eles não conseguem prevenir ou reverter a progressão do quadro de insuficiência. Estima-se que menos de 10% dos pacientes com doença cardíaca são transplantados (FUJITA; ZIMMERMANN 2017).

A bioengenharia, especificamente a engenharia de células e tecidos, visa entender a relação estrutura-função do tecido disfuncional fisiológico e fisiopatológico. Com esta abordagem, busca-se o desenvolvimento de substitutos biológicos para manter, restaurar ou melhorar a função do tecido/órgão, o que pode ser uma alternativa promissora para sanar as deficiências no tratamento das DCVs (BROUGHTON; SUSSMAN, 2020).

No contexto da contínua busca por terapias e avanços nos campos da engenharia de tecidos e medicina regenerativa visando doenças crônicas pulmonares e cardíacas, estudos potenciais incluem a matriz extracelular como abordagem promissora neste âmbito (SVYSTONYUK *et al*, 2020; BEJLERI; DAVIS, 2019; PORZIONATO *et al*, 2018). Fato este devido às propriedades da matriz extracelular, além de que a maioria dos biomateriais já utilizados em pesquisa pré-clínica e clínica,

nas áreas citadas, envolvem um ou mais componentes presentes na mesma (YI et al, 2017).

As pesquisas atuais em engenharia tecidual e medicina regenerativa ainda se encontram em estágios preliminares na busca por alternativas para tratamentos e estudos dos mecanismos das doenças crônicas e pulmonares, e esforços científicos mais intensos são necessários para se alcançar uma solução efetiva. Com este trabalho buscamos contribuir para o estudo da potencial aplicação da matriz extracelular descelularizada, pulmonar ou cardíaca, na constituição de biomateriais funcionais.

1.1. HIPÓTESE

A matriz extracelular descelularizada pulmonar e/ou cardíaca possui potencial para sua utilização como constituinte total ou parcial de diferentes biomateriais, gerando plataformas viáveis para cultivos de células favorecendo a proliferação e a diferenciação celulares, considerando diferentes tecidos e tipos de células.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Produzir e avaliar o potencial de utilização da matriz extracelular pulmonar e cardíaca como substrato constituinte de biomateriais, capaz de proporcionar um microambiente tecidual ideal para o crescimento, diferenciação e proliferação celulares.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obter substrato de matriz extracelular derivada de pulmões suínos descelularizados;
- Desenvolver hidrogéis pulmonares derivados do substrato da matriz extracelular suína descelularizada;

- Elaborar biomateriais derivados da matriz extracelular pulmonar suína para o cultivo celular 3D;
- Diferenciar células tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos;
- Obter substrato de matriz extracelular derivada de corações suínos descelularizados;
- Desenvolver hidrogéis cardíacos derivados do substrato da matrix extracelular do miocárdio descelularizado;
- Elaborar biomateriais derivados da matriz extracelular cardíaca suína para o cultivo celular 3D de cardiomiócitos.

1.3. APROVAÇÃO POR COMITÊ DE ÉTICA

Todas as etapas desenvolvidas para realização desta tese foram aprovadas pelos seguintes comitês de ética em pesquisa:

- Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo;
- Comitê em Experimentação Animal da Universidade de Barcelona, (CEEA-UB), sob protocolo 154/19;
- Banco Nacional de Células-tronco, Instituto Nacional Espanhol de Saúde Carlos III : Uso de células pluripotentes humanas provindas do Banco de Células Tronco do Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona aprovado pela Comissão de Garantias relativas à Doação e Uso de Recursos Humanos (ANEXO A).

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura tridimensional não-celular, que circunda as células de todos os tecidos de órgãos sólidos em todos os organismos animais, mas também presente em plantas, compondo o espaço extracelular. A MEC é sintetizada primariamente pelas células embrionárias durante o desenvolvimento intrauterino, e as interações da matriz com as células residentes nos tecidos se dá continuamente, influenciando a expressão gênica e determinante ao comportamento celular (ROSARIO & DESIMONE, 2010, INGBER, 2006).

A MEC é tridimensional, macromolecular, em uma rede de colágeno, proteoglicanos/glicosaminoglicanos, elastina, fibronectina, laminina e outras glicoproteínas (THEOCARIS et al, 2016). Tem função de sinalização inter- e intracelular, contribuindo para a proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular por fatores moleculares bioativos que favorecem a comunicação e interação célula-a-célula e célula-matriz (KARAMANOS et al, 2021, BADYLAK, 2007).

Dois formas básicas formam a matriz extracelular: a membrana basal e a matriz intersticial. Enquanto a primeira se localiza entre as camadas epitelial e estroma, a segunda circunda as células formando uma treliça porosa tridimensional, que faz com que esta estrutura seja denominada “andaime”, comumente encontrada na literatura pelo termo na língua inglesa “*scaffold*” (THEOCARIS et al, 2016; BADYLAK, 2007; INGBER, 2006).

Diferentes tecidos possuem variações na composição e estrutura da MEC (Figura 1), porém suas moléculas funcionais e estruturais são comuns, as quais estão elencadas na Tabela 1:

Tabela 1: Componentes estruturais da matriz extracelular comuns e suas funções:

Componente	Presença na MEC	Função	Referência
Colágenos	80 a 90% do peso seco da MEC. Principal proteína constituinte da matriz	Proporcionam a estrutura tridimensional dos tecidos. Ancoragem e barreira tecidual. Integridade biológica e estrutural da MEC.	AMIRRAH et al, 2022
Fibronectina	Segundo principal componente e proteína mais abundante da MEC.	Se liga à outras proteínas da matriz extracelular. Possui papel crucial na formação da MEC durante o desenvolvimento. Também está presente no processo de progressão de doenças e durante a cura de feridas. Interage com as células levando à efeitos bilaterais célula-matriz que determina a função celular e à modificações celular-dependentes da MEC.	SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010
Laminina	Principal componente não-colagenoso da membrana basal da MEC	Estabiliza as estruturas celulares, serve como barreira física eficaz e, governa o destino celular induzindo cascatas de sinalização intracelular.	SCHÉELE et al, 2007
Glicosaminoglicanos - GAGs	GAGs sulfatados são ligados covalentemente a proteínas formando proteoglicanos.	Interagem com fatores de crescimento e outras moléculas bioativas e impactam a mecânica dos tecidos.	MENEZES et al, 2022
Fatores de crescimento	Presentes na forma de biomoléculas solúveis dispersos na MEC	Regulam o comportamento celular via sinalização intrácrina, parácrina, autócrina e endócrina. Possuem papel no reparo e regeneração tecidual.	PARK et al, 2022

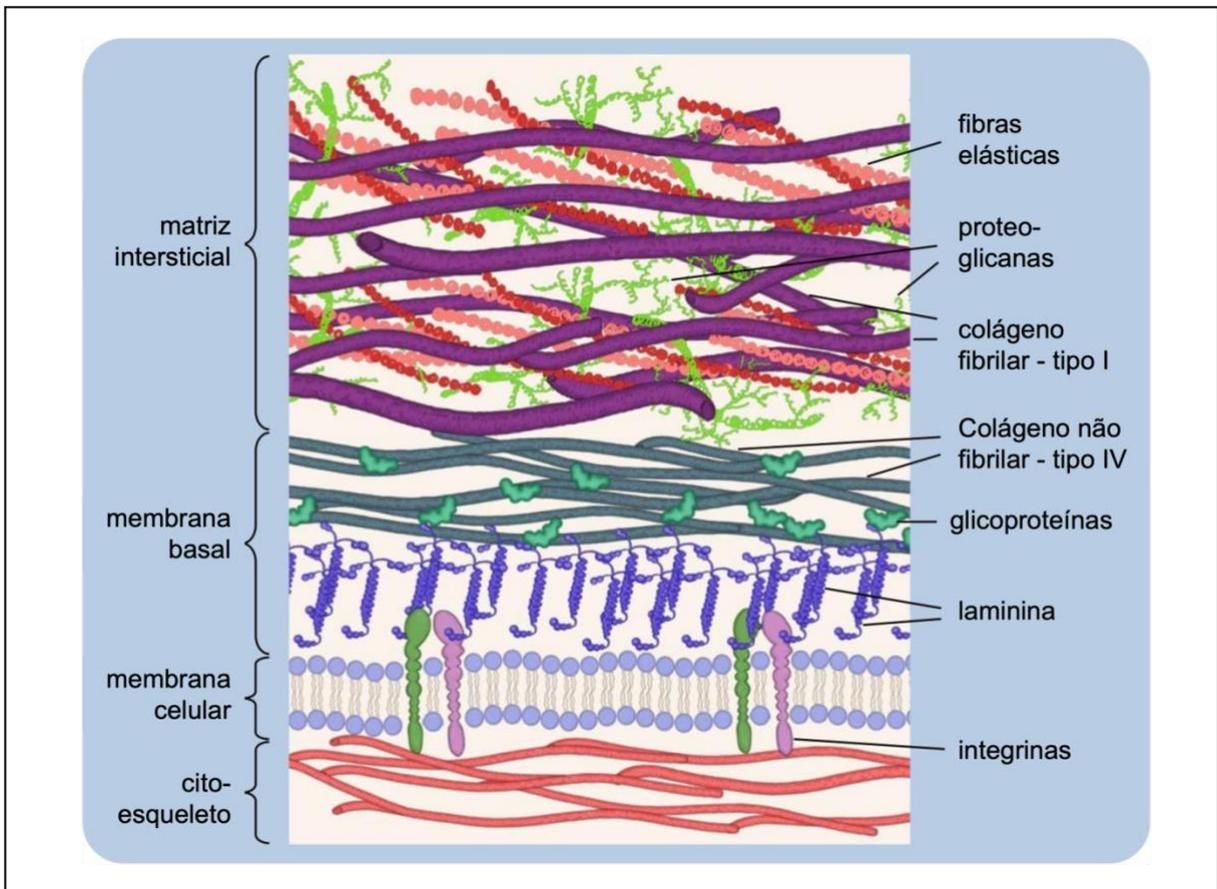


Figura 1: Ilustração esquemática da estrutura simplificada dos componentes comuns da matriz extracelular. A figura ilustra a rede macromolecular tridimensional, formada por proteínas e polissacarídeos. A matriz intersticial forma uma rede porosa de colágenos fibrilares, fibras elásticas e proteoglicanos. Adaptado (BANDZEREWICZ; GADOMSKA-GAJADHUR, 2022).

Estudos utilizando “*scaffolds*” da MEC mostram que as propriedades físicas, como o diâmetro dos poros e fibras da matriz, a interação química, e a rigidez da estrutura também afetam o destino celular (YAHALOM-RONEN *et al*, 2015). As conexões estruturais entre célula e matriz extracelular promovem integridade mecânica e, por meio de mecanosensores, respostas bioquímicas são efetuadas em diferentes tipos e escalas de tempo (ESFAHANI *et al*, 2019).

A mecanotransdução explica o papel da MEC em diferentes tecidos e as influências mecânicas que esta possui sobre as células, dependendo do estímulo durante o desenvolvimento, nos processos fisiológicos ou patológicos, proporcionando entendimento sobre como estas conectam e interagem entre si, crescem e proliferam, e sua contribuição no microambiente tecidual (ESFAHANI *et al*, 2019).

A matriz extracelular descelularizada, ou seja, proveniente do tecido acelular, pode ser considerada um biomaterial ideal para a biomimetização do tecido natural, possuindo estrutura e biomecânica com as mesmas propriedades do órgão de origem. Estas características favorecem a produção de biomateriais compatíveis com a capacidade de proporcionar a sinalização química e física da MEC para as células, sendo uma ótima estratégia para sua utilização em medicina regenerativa e engenharia tecidual (OHATA; OTT, 2020; GRASMAN et al, 2015; JONG et al, 2014).

2.2 A matriz extracelular e os processos de descelularização

Um dos maiores avanços no tratamento de doenças crônicas e de danos irreversíveis em órgãos, e a única opção terapêutica em determinados casos, é o transplante de órgãos. Porém esta é uma demanda excessiva e dificilmente cumprida. As falhas neste sistema fez com que se buscassem estratégias que possibilitem o suprimento de órgãos compatíveis, surgindo assim possíveis alternativas por meio da engenharia tecidual e a medicina regenerativa (HAEUBLEIN *et al*, 2022).

A pesquisa em bioengenharia e medicina regenerativa busca fornecer opções terapêuticas naqueles casos em que o transplante de órgãos não é possível ou o processo é falho, em casos onde há a falência de tecidos e órgãos. Um dos objetos de pesquisa destas áreas tem como abordagem a utilização da matriz extracelular (MEC) como técnica promissora para a criação de diferentes plataformas de cultivo celular (Figura 2) (BALAKRISHNAN-NAIR et al, 2019).

Para a utilização apropriada da MEC em estudos de bioengenharia e medicina regenerativa esta necessita passar por um processo de descelularização, que consiste na remoção do conteúdo celular nativo e potenciais fatores químicos das células que afetem sua biocompatibilidade futuramente. Após este processo, a MEC ainda mantém suas características estruturais, bioquímicas e biomecânicas (SOMUNCU, 2019).

O processo de descelularização pode ser natural, químico, enzimático, físico ou uma combinação de métodos (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Uma compilação destes métodos e seus modos de ação é descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Visão geral dos métodos mais comuns utilizados para descelularização de tecidos (Continua)

Método	Modo de ação	Efeitos na MEC
<i>Físicos</i>		
Congelamento instantâneo	Formação de cristais de gelo intracelular e ruptura da membrana celular.	A MEC pode ser rompida ou sofrer danos por ação do rápido congelamento.
Força mecânica	Pressão pode levar à erupção celular, e a remoção tecidual elimina as células.	As forças mecânicas aplicadas podem danificar a MEC.
Agitação mecânica	Pode causar lise celular, mas é mais comumente utilizada para facilitar a exposição aos reagentes químicos e a remoção de conteúdo celular.	Agitação muito agressiva ou sonicação pode levar a ruptura da MEC enquanto o conteúdo celular é removido.
<i>Químicos</i>		
Alcalino; ácido	Solubiliza os componentes citoplasmáticos da célula e rompe ácidos nucleicos.	Remoção de GAGs
<i>Detergentes não iônicos</i>		
Triton X-100	Rompe as interações lipídio-lipídicas e lipídio-proteicas, enquanto mantém as interações proteína-proteína intactas.	Remoção de GAGs. Possui resultados mistos. Sua eficiência depende do tecido.
<i>Detergentes iônicos</i>		
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Solubiliza membranas citoplasmática e nuclear das células. Possui a tendência de desnaturar as proteínas.	Remove proteínas celular e citoplasmáticas remanescentes. Possui a tendência de romper a estrutura nativa dos tecidos, remove GAGs e danifica o colágeno.
Deoxicolato de Sódio (SDC)	-	Provoca maior rompimento tecidual em comparação ao SDS
Triton X-200	-	Promove remoção celular eficiente quando utilizado com detergentes zwitteriônicos

Tabela 2: Visão geral dos métodos mais comuns utilizados para descclularização de tecidos (Adaptado de GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Conclusão.

Método	Modo de ação	Efeitos na MEC
<i>Detergentes zwitteriônicos</i>		
CHAPS	Possui ambas as propriedades de detergentes não-iônicos e iônicos	Remoção celular eficiente com ruptura de MEC similar à do Triton X-100
Sulfobetaina-10 e -16 (SB-10, SB-16)	-	Promove a remoção celular e leve ruptura da MEC em associação com Triton X-200
Tri(n-butil)fosfato	Solvente orgânico que rompe as interações proteína-proteína	Remoção celular variável. Provoca perda de conteúdo de colágeno, mas o efeito nas propriedades mecânicas é mínimo.
Soluções hipo- e hipertônicas	Lise celular por choque osmótico	Eficiente para a lise celular, mas não é eficiente para remoção de conteúdo celular remanescente
EDTA, EGTA	Agentes quelantes que se ligam à ions metálicos divalentes, rompem as adesões celulares na MEC.	Sem exposição isolada, tipicamente associado à métodos enzimáticos, como tripsina.
<i>Enzimáticos</i>		
Tripsina	Cliva ligações peptídicas na posição C-terminal de Arginina e Lisina	A exposição prolongada leva ao rompimento da estrutura da MEC. Remove laminina, fibronectina, elastina e GAGs.
Endonucleases	Catalisa a hidrólise das ligações interiores de cadeias de ribonucleotídeos e deoxirribonucleotídeos.	Difícil remoção do tecido e pode levar à uma resposta imune.
Exonucleases	Catalisa a hidrólise das ligações terminais de cadeias de ribonucleotídeos e deoxirribonucleotídeos.	-

Adaptado (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

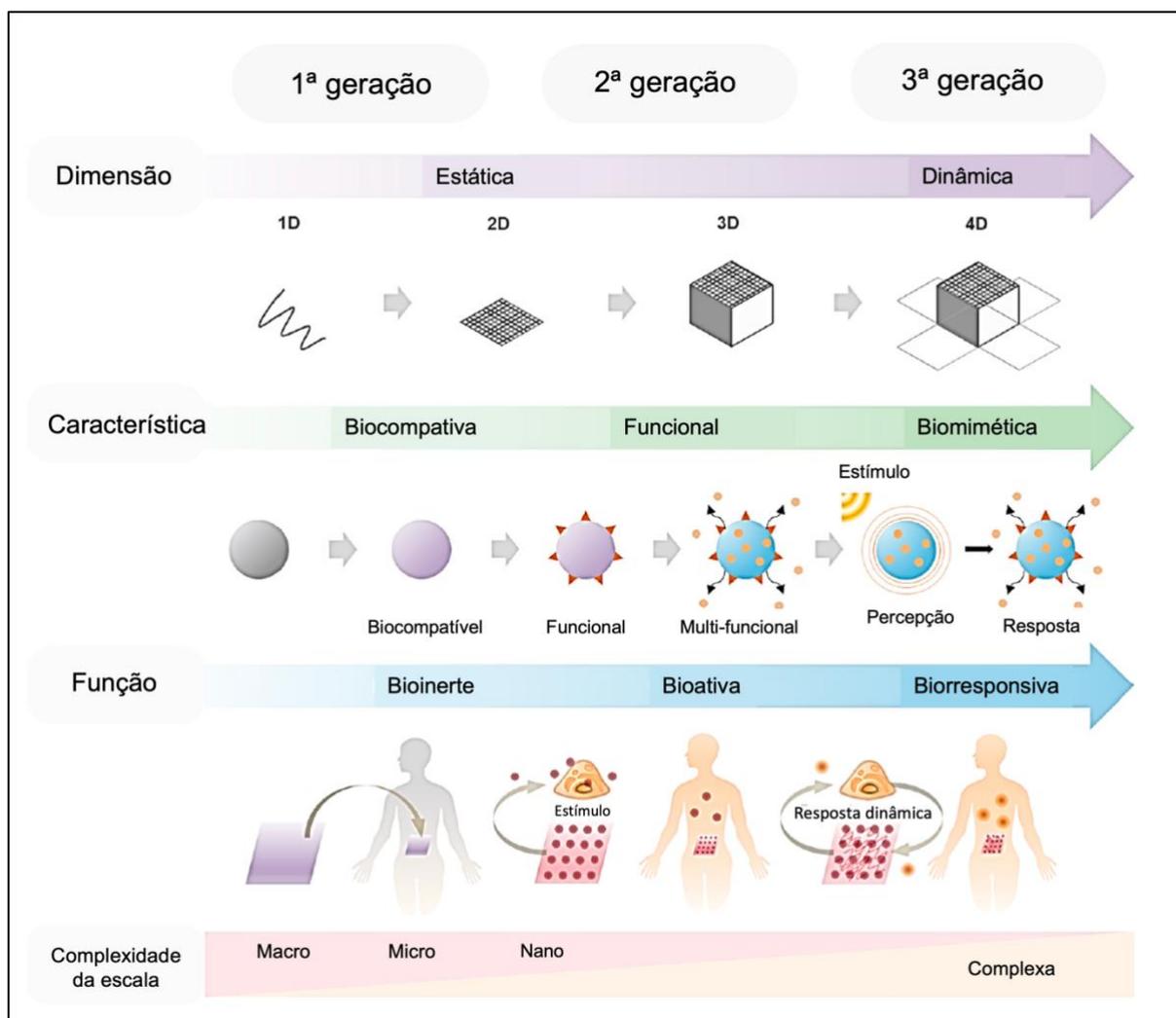


Figura 2: Ilustração esquemática dos diferentes tipos de abordagens para a criação de plataformas de cultivos e elaboração de biomateriais, tendências para aplicação em bioengenharia e medicina regenerativa. Adaptado (PARK et al, 2022).

2.3 Bioengenharia pulmonar

Estudos em modelos experimentais de doenças pulmonares *in vivo* e *in vitro* tem proporcionado um melhor entendimento dos processos de doença e dos mecanismos de reparação pulmonares (SHAH *et al*, 2017; DA FONSECA *et al*, 2017; MOURONTE-ROIBÁS *et al*, 2016; WILLIAMSON, SADOFSKY, HART, 2017; SANTOS *et al*, 2014; NICHOLS *et al*, 2009; HANTOS *et al*, 2008). Entretanto, devido à complexidade estrutural e funcional do pulmão, são necessárias novas abordagens para melhor elucidar o comportamento celular na regeneração tecidual nos modelos de lesões e doenças respiratórias.

A bioengenharia pulmonar tem se baseado na utilização da matriz extracelular (MEC) natural do pulmão descelularizado como partida para a reconstrução do órgão por recelularização. Atualmente, o desenvolvimento de hidrogéis a fim de estudar as interações entre a matriz extracelular (MEC) pulmonar e células-tronco tem sido a opção mais viável e efetiva para o estudo dos mecanismos teciduais (POULIOT *et al*, 2016). Além disto, a utilização de uma MEC natural para recelularização pulmonar poderia sanar a escassez de doadores, reduzir as rejeições aos aloenxertos e melhorar a taxa de sobrevivência de pacientes transplantados (URIARTE *et al*, 2018).

A matriz de órgãos descelularizados potencialmente mantém a arquitetura tridimensional e a composição bioquímica, bem como a microvascularização do tecido original. Estas propriedades únicas tornam o pulmão descelularizado muito promissor para a fabricação bioartificial de pulmões funcionais, uma vez que proporciona uma melhor recriação do microambiente *in vivo*. A técnica de descelularização já foi utilizada para a engenharia de uma diversidade de tecidos, incluindo ossos, esôfago, artérias, bexiga, traqueia e coração (PRICE *et al*, 2010; OTT *et al*, 2008; BADYLAK, 2002; GILBERT *et al*, 2006; BADYLAK *et al*, 2009; GILBERT *et al*, 2008; MACCHIARINI *et al*, 2008).

Em comparação a outros órgãos, a estrutura do pulmão é particularmente complexa, dificultando o processo de bioengenharia. Apesar dessa complexidade, tem sido demonstrado que, com a utilização de protocolos adequados, o pulmão pode ser completamente descelularizado para obter uma estrutura acelular preservada (BUSCH *et al*, 2021; GUYETTE *et al*, 2014; CORTIELLA *et al*, 2010).

A preservação das redes vasculares intactas e outras arquiteturas essenciais dos órgãos após o processo de descelularização provê uma base ideal para a recelularização (MELO *et al*, 2014). O pulmão descelularizado pode ser recelularizado com células fetais pulmonares submetidas à ventilação simulada (PRICE *et al*, 2020) ou células epiteliais e alveolares para obter um pulmão com funcionalidade das trocas gasosas a curto prazo, após a implantação *in vivo* (OTT *et al*, 2010; PETERSEN *et al*, 2010). Embora todos esses trabalhos representem um marco no progresso da bioengenharia pulmonar, qualquer aplicação futura poderia estar prejudicada pela dificuldade em utilizar células diferenciadas, dada a sua limitada disponibilidade ou capacidade de proliferação.

Metodologias emergentes para o estudo dos modelos de lesões pulmonares têm apresentado a utilização de hidrogéis que mimetizam a MEC nativa e demonstram sua interação com as células tronco mesenquimais. Estes hidrogéis podem ser compostos derivados de materiais naturais e/ou sintéticos, sendo que os naturais podem ser originários de tecidos como coração, epiderme, vesícula urinária, cartilagem articular, tecido nervoso e adiposo (SINGELYN *et al*, 2012; KWON *et al*, 2012; YOUNG *et al*, 2011; FREYTES *et al*, 2008; MEDBERRY *et al*, 2013).

A utilização de hidrogéis para a engenharia de tecidos tem avançado com sua aplicação em conjunto ou não com células em biomateriais, utilizando a tecnologia de bioimpressão 3D, principalmente para estudos na área de bioengenharia pulmonar (HUANG *et al*, 2017). Com as técnicas convencionais de engenharia de tecidos, apenas as propriedades mais grosseiras podem ser adquiridas, o que faz com que a tecnologia de bioimpressão seja uma opção mais viável e eficiente, além de mais precisa e econômica (HUANG *et al*, 2017; JANA, LERMAN, 2015).

2.4 Hidrogéis e Bioimpressão tridimensional

Atualmente, bioimpressoras vem sendo aplicadas à medicina translacional e à pesquisa básica, revolucionando a obtenção de tecidos funcionais. Seu principal potencial de utilização é a fabricação de tecidos mais elaborados, o que permite o estudo de mecanismos mais complexos de doença e regeneração tecidual (HUANG *et al*, 2017; JANA, LERMAN, 2015).

Cultivos bidimensionais, apesar de possibilitarem o estudo de comportamentos celulares complexos, não atendem a demanda por entendimento de padrões mecânicos e bioquímicos da funcionalidade dos tecidos. Quando utilizado um hidrogel derivado da MEC, este proporciona a manutenção das proteínas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas para a criação do microambiente tecidual necessário para as células quando o processo de recelularização ocorra. Isto é importante pelo fato de que a matriz extracelular que compõe o hidrogel pode apresentar moléculas bioativas e fatores de crescimento específicos, relevantes para direcionar o comportamento celular incluindo a migração, proliferação, diferenciação, adesão e sinalização celular (PARK *et al*, 2022).

2.5 Bioengenharia cardíaca

A bioengenharia cardíaca é uma alternativa terapêutica potencial, mas a pesquisa atual está em fase preliminar e, portanto, são necessários intensos esforços científicos. Os estudos neste campo visam produzir construtos com propriedades estruturais, fisiológicas e funcionais semelhantes ao tecido cardíaco humano nativo. Os modelos *in vitro* podem ser aplicados em modelos de doenças, testes de fármacos e toxicologia, e na substituição ou regeneração de tecidos cardíacos danificados (CHIEN *et al*, 2008).

A geração de biomateriais cardíacos fisiologicamente semelhantes ao tecido nativo é atualmente frustrada por dificuldades em alcançar uma maturação eficiente no nível celular e/ou tecidual devido à alta dependência entre a organização estrutural do músculo cardíaco e sua função (FLEISCHER *et al*, 2017). Porém, nos últimos anos, os métodos de engenharia de tecidos avançaram significativamente na geração de biomateriais cardíacos tridimensionais funcionais, com a utilização de cultivos celulares em larga escala para o desenvolvimento de um biomaterial otimizado (BARBULESCU *et al*, 2022).

2.6 Células tronco pluripotentes induzidas (IPSC)

A utilização de células tronco para pesquisa foi revolucionada a partir do estudo de Takahashi e Yamanaka (2006). Até então, dois tipos de células tronco de fontes animais e humanas eram utilizadas: células-tronco embrionárias e células tronco somáticas não embrionárias/adultas, e acreditava-se que o processo de diferenciação das células não era reversível. Sua descoberta envolveu a indução de pluripotência a partir de células somáticas murinas, utilizando um conjunto de quatro fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-MYC) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), obtendo pela primeira vez células-tronco reprogramadas a partir de células adultas especializadas. A denominação para as células obtidas foi: células-tronco pluripotentes induzidas, por sua capacidade de indução por meio dos fatores de transcrição de Takahashi, ou por sua sigla de denominação provindo do inglês "*induced pluripotent stem cells* (IPSC)".

A geração de IPSC humanas se deu pela transdução de fibroblastos de derme humana, pela utilização de retrovírus com os fatores de Yamanaka (TAKAHASHI;

YAMANAKA, 2006). Os fatores de transcrição Oct3/4, Sox2, KLF4 e c-MYC são expressos em intensidade em células tronco embrionárias e regulam a rede de sinalização do desenvolvimento necessária para a condição de pluripotência das células.

Com a utilização de IPSC muitas pesquisas focaram em sua caracterização transcricional e epigenética em comparação com as ESC. Atualmente é aceito que ESC e IPSC são análogas. A utilização de IPSC é condicionada desde a escolha do método de reprogramação, considerando que o melhor método é aquele que não induza mutagene interna e formação de tumores, sendo favorecidos os métodos não integrativos. Sendo assim, uma boa opção é a utilização do método de Sendai Virus (SeV) (MIYAMOTO *et al*, 2018).

As IPSCs têm sido exploradas para a medicina regenerativa e engenharia tecidual cardíaca por sua capacidade de criação de modelos de doenças *in vitro* e sua capacidade em diferenciação em cardiomiócitos para aplicações *in vivo*. As IPSCs possuem potencial em desenvolver-se em qualquer tipo celular derivado das três camadas germinativas: endoderma, mesoderma e ectoderma. Todas as células-tronco possuem três características pontuais, independentemente de sua fonte: capacidade de proliferação e autorrenovação; são células indiferenciadas; possuem a capacidade de originar células diferenciadas. Em suma, possuem a capacidade de serem induzidas a gerarem tecidos ou órgão com funções específicas.

CAPÍTULO 3: Otimização da descélularização pulmonar e geração de hidrogéis para cultivos tridimensionais

3.1. INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) pulmonar fornece suporte estrutural para as células e o órgão, assim como regula fatores para sua organogênese, homeostase e respostas frente a lesões. No contexto da progressão de doenças, especialmente as que provocam danos irreversíveis ao órgão, ocorre uma alteração da composição bioquímica e estrutural da MEC ao longo do tempo (ZHOU *et al*, 2019).

Estudos em modelos de doenças pulmonares *in vivo* e *in vitro* têm proporcionado melhor compreensão dos processos patológicos e dos mecanismos de reparo pulmonar. No entanto, devido à complexidade estrutural e funcional do pulmão, novas abordagens são necessárias para melhor elucidar o comportamento celular na regeneração tecidual em modelos de lesões e doenças respiratórias. (HACKETT; OSEI, 2021).

O uso de células indiferenciadas para cultivo na MEC pode ser uma estratégia mais prática para a bioengenharia pulmonar. Isso possibilita a expansão dessas células e possui a vantagem de diferenciação em diferentes fenótipos. Essa abordagem, no entanto, requer que essas células-tronco sejam diferenciadas em fenótipos pulmonares, que são específicos dependendo de sua localização no órgão (NICHOLLS *et al*, 2022).

O potencial das células-tronco mesenquimais para seu uso com outros tipos de células vem sendo explorado na bioengenharia pulmonar. Sua capacidade de autorrenovação, diferenciação e de interação com os *scaffolds* ocorre pela interação de integrinas com diferentes proteínas da MEC (MOHGAN *et al*, 2022).

A utilização de células-tronco mesenquimais (MSCs), extraídas do pulmão de ratos Sprague-Dawley, combinadas com o substrato de MEC descélularizada pulmonar suína pode servir como uma boa alternativa ao elaborar biomateriais funcionais.

Dito isto, nesta etapa do trabalho, pulmões suínos foram descelularizados para obtenção de substrato de MEC. Utilizando este substrato como base, foram desenvolvidos cultivos tridimensionais em hidrogéis, utilizando diferentes concentrações de substrato da MEC descelularizada, e MSCs pulmonares.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Otimização do processo de descélularização do pulmão suíno esquerdo para obtenção de substrato de matriz extracelular pulmonar

Pulmões suínos, provenientes do Biotério do Centro de Medicina Comparativa e Bioimagem da Catalunha (CMCiB) e armazenados na Unidade de Biofísica e Bioengenharia da Universidade de Barcelona (n=3), foram descélularizados a partir da otimização de um protocolo já descrito (P1) (POULIOT *et al*, 2016). Este protocolo otimizado (P2) consistiu na descélularização do pulmão inteiro. Toda a perfusão de reagentes foi realizada utilizando uma bomba de perfusão com um volume constante recirculante de 3,4L/min, com a entrada de reagentes realizada pela artéria pulmonar e a vazão dada pela traquéia.

O protocolo P1 foi realizado após uma lavagem inicial de 4L com água deionizada adicionada de antibiótico (penicilina/estreptomicina 1%) por 1 hora, armazenando o pulmão submerso em uma nova solução limpa, em condição refrigerada a 4° por 12 horas.

O protocolo teve início com o pulmão passando por uma lavagem com PBS 1x (Thermo Fischer Scientific), utilizando bomba de perfusão por um período de 3 horas, por três lavagens (trocando o reagente a cada hora) utilizando 4 L por lavagem, e novamente perfundido com Triton X-100 0,1% (Sigma Aldrich), perfundindo 4 L a serem recirculados por 3 horas, e incubados em 4L de solução limpa de Triton X-100 0,1% durante 24 horas a 4°. No dia seguinte realizou-se a perfusão de 4L recirculados por 3 horas por dodecilsulfato de sódio (SDC) a 2% (Sigma Aldrich). O pulmão foi então perfundido com 4L de cloreto de sódio (NaCl 1M - Sigma Aldrich) e incubado durante 1h a 4°, seguido por perfusão na mesma quantidade de DNase (Sigma Aldrich) por 1h. O pulmão inteiro foi seccionado em pequenos pedaços e, congelado e armazenado a -80°.

Após realizado o processo de descélularização pulmonar, o pulmão esquerdo suíno foi dividido em três regiões: cranial (CR), medial (M) e caudal (CA), e armazenado a -80. Cada região foi amostrada aleatoriamente para caracterização da eficiência e homogeneidade do processo de descélularização por histologia,

utilizando as colorações de Hematoxilina & eosina, Picrosirius Red e Tricromo de Massom, e também foram quantificados o DNA para determinação do DNA residual na MEC descelularizada em cada região, assim como a quantificação da porcentagem de colágeno por área descelularizada. Uma vez verificado que as três regiões não apresentavam diferença significativa, iniciou-se o processo de preparação de um hidrogel da matriz extracelular descelularizada.

As amostras de pulmão descelularizado pelo método otimizado (P2) foram comparadas com outras amostras de pulmão descelularizadas pelo método já estabelecido previamente (P1) (POULIOT *et al*, 2016), sem alterações.

Os resultados foram demonstrados via comparação visual macroscópica, quantificação da área homogênea e área de colágeno por software de imagem (imunocoloração para Picrosirius Red *threshold*) ImageJ), e quantificação de DNA utilizando Mini Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™).

3.2.2 Avaliação do processo de descelularização pulmonar

Foram realizadas análises histológicas para o pulmão nativo e descelularizado, de modo a avaliar sua estrutura e o processo de descelularização. As colorações utilizadas foram Hematoxilina & eosina, Picrosirius Red e Tricromo de Massom. Foram quantificados o DNA para determinar o DNA residual na MEC descelularizada, assim como quantificação de colágeno para avaliar a perda de colágeno após o processo de descelularização.

A análise de DNA foi feita em pulmões nativos e após o processo de descelularização, levando em conta as regiões caudal, medial e cranial do pulmão esquerdo. Três fragmentos de cada uma das regiões foram analisados para determinação do DNA genômico total, usando o Mini Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™), de acordo com as especificações do fabricante, e foi medido usando espectrofotometria (NanoDrop 1000; Thermo Fischer Scientific) e normalizado para amostrar o peso do tecido.

3.2.3 Desenvolvimento de hidrogéis pulmonares derivados da matriz extracelular

Fragmentos descelularizados de pulmão suíno mantidos a -80° foram liofilizados (TELSTAR, S.L. Cryodos-50) e moídos para obtenção de pó fino homogêneo (6775 Freezer / Mill). O pó de matriz extracelular pulmonar foi diferido a uma proporção de 20 mg de MEC por 1ml de solução de digestão, durante 12h (pepsina 10% p/p [Sigma Aldrich] e HCl 0,01 M [Sigma Aldrich]). Após a digestão, foram adicionados PBS 10x a 1/9 do volume (Thermo Fischer Scientific) e NaOH 0,1 M 1/10 do volume (Sigma Aldrich) para ajuste e estabilização do pH. Foram feitas alíquotas de 1mL para armazenagem a -20° C.

Após obtenção do pó como substrato de MEC descelularizada de pulmão suíno, foram formuladas duas condições para estudo:

(a) um hidrogel de alta concentração (AC) utilizando 20mg/mL de MEC da solução pré-gel base;

(b) um hidrogel de baixa concentração (BC), diluído com PBS 1x até metade da concentração anterior (10 mg/mL de MEC).

A solução pre-gel ajustada ao pH 7,0 a 7,5 foi armazenada a 4° C por um período não superior a sete dias. Para o processo de gelificação a solução é incubada a 37° C, a um tempo estimado de 30' para cada 50uL de solução pré-gel. Uma vez gelificado, o gel pôde ser armazenado por um período de até 6 meses em PBS 1x a 4° C, sem sofrer influência da temperatura sobre suas propriedades físicoquímicas.

3.2.4 Elaboração de biomateriais derivados da matriz extracelular pulmonar para o cultivo celular tridimensional

Células-tronco mesenquimais pulmonares (L-MSCs) foram isoladas de ratos machos Sprague-Dawley de 350 gr. Os animais foram anestesiados com isoflurano, e eutanasiados por exsanguinação da aorta. O pulmão foi perfundido com 50 mL de PBS 1X através do ventrículo direito para limpeza da vasculatura pulmonar, logo, foram excisados e cortados em pequenos fragmentos antes de realizar a lise do parênquima com solução de colagenase a 5 mg/mL (colagenase I [Thermo Fisher Scientific] e 10% de HEPES em DMEM sem soro [Thermo Fisher Scientific]). A

filtragem foi feita em malha de 250 μm e a suspensão foi centrifugada a 400G por 10 minutos para ressuspensão celular.

As L-MSCs foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com soro fetal bovino 10% e 1% de penicilina/estreptomicina, e mantidas a 37° C em incubadora a 5% de CO₂. A troca de meio de cultivo foi realizada a cada 2 dias até o momento da passagem em que as células atingiram confluência de 85-90%, utilizando TrypLE (tripsina com EDTA; Thermo Fisher Scientific) com o número mínimo de três e máximo de seis passagens.

A fim de reduzir os efeitos das forças de adesão entre o cultivo tridimensional e a placa de cultivo, o hidrogel foi solidificado em um andaime externo feito de plurônico bioimpresso em forma cilíndrica.

O plurônico é um composto que permanece em estado líquido a baixas temperaturas e pode ser diluído em outro líquido. Também é inofensivo para as células e não interage com elas, tornando-o um andaime adequado para o hidrogel. O hidrogel gelifica a 37 ° C, e o plurônico permanece sólido e preserva a forma do molde. Após adição de meio de cultivo frio o molde dissolveu, deixando o hidrogel flutuando na placa de Petri.

As células foram cultivadas nos hidrogéis a uma densidade de $5 \times 10^5/\text{ml}$ e mantidas por sete dias com meio DMEM.

Para avaliação do potencial regenerativo das células, os hidrogéis aos sete dias de cultivo foram incubados em placa oscilatória por 20 minutos em uma solução de DMEM, HEPES 10% e colagenase para sua digestão e recuperação celular. As células foram ressuspensas e cultivadas em uma placa de 12 poços. Quando as células atingiram confluência, foi feito o teste de ranhura para determinar o potencial de regeneração celular. Como controle, foram utilizadas LMSCs previamente cultivadas em placa de 12 poços, em meio DMEM, por sete dias. O potencial regenerativo das células foi avaliado no ponto 0 e às 24 horas pós ranhura. As imagens foram obtidas em microscópio de luz em campo branco, e analisadas com software ImageJ, utilizando a extensão WoundHealing_2.0.ijm para estudar a migração celular ao longo do tempo.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Descelularização do pulmão suíno esquerdo e obtenção de substrato de matriz extracelular pulmonar

O protocolo utilizado para a descelularização pulmonar se mostrou efetivo, e possibilitou uma redução na quantidade reagentes e tempo, consequentemente diminuindo custos para todo o processo.

O processo (P1) que antes levava o mínimo de 95 horas entre preparação, contato dos reagentes com o tecido e limpeza dos reagentes remanescentes. A otimização do protocolo (P2) foi diminuído para cerca de um terço do tempo, sendo realizado em 36 horas, com também uma redução significativa na quantidade de reagentes utilizados. Os reagentes, tempo e quantidade de reagentes em cada etapa do processo dos dois protocolos está resumida na tabela (Tabela 3) abaixo.

Tabela 3: Protocolos de descelularização pulmonar por perfusão manual (P1) e utilizando bomba automática (P2), elencando as etapas e reagentes utilizados, com respectivos tempo e quantidade.

Protocolo	P1 (POULIOT et al, 2016)	P2 - otimizado/bomba de perfusão
Reagentes	PBS1X 2,5L x 5 lavagens	PBS1X 4L x 3lavagens
	Triton X-100 2,5L + 4L	Triton X-100 0,1% x 4L
	água deionizada x 2,5L x 3 lavagens	Triton X-100 0,1% + 4L a 4º
	SDC x 2,5L	SDC 2% 4L
	NaCl 2,5L	NaCl 4L
	Dnase 2,5L	Dnase 4L
	agua deionizada 2,5L x3 lavagens	PBS1X 4L
	PBS1X 2,5L x 5 lavagens	
Total	51,5 L em 95 horas	36L em 36 horas

Ficou evidente a remoção das células pulmonares além da eliminação de conteúdo de DNA, manutenção da estrutura tecidual (Figura 3) e possibilitou uma total descelularização do tecido pulmonar e de forma mais homogênea em comparação com o protocolo utilizado anteriormente, já estabelecido na literatura.

Na comparação visual macroscópica das amostras de pulmão descelularizadas, ficam evidentes as áreas em que o processo de descelularização não foi eficiente.

Áreas vermelhas ou rosadas são visualizadas nas bordas das regiões amostradas, do pulmão descelularizado, para comparação entre protocolos P1 (adaptado) e P2 (já estabelecido): cranial (CR), medial (M) e caudal (CA). Na figura podem-se observar estes pontos indicados com ponta de flecha (Figura 3).

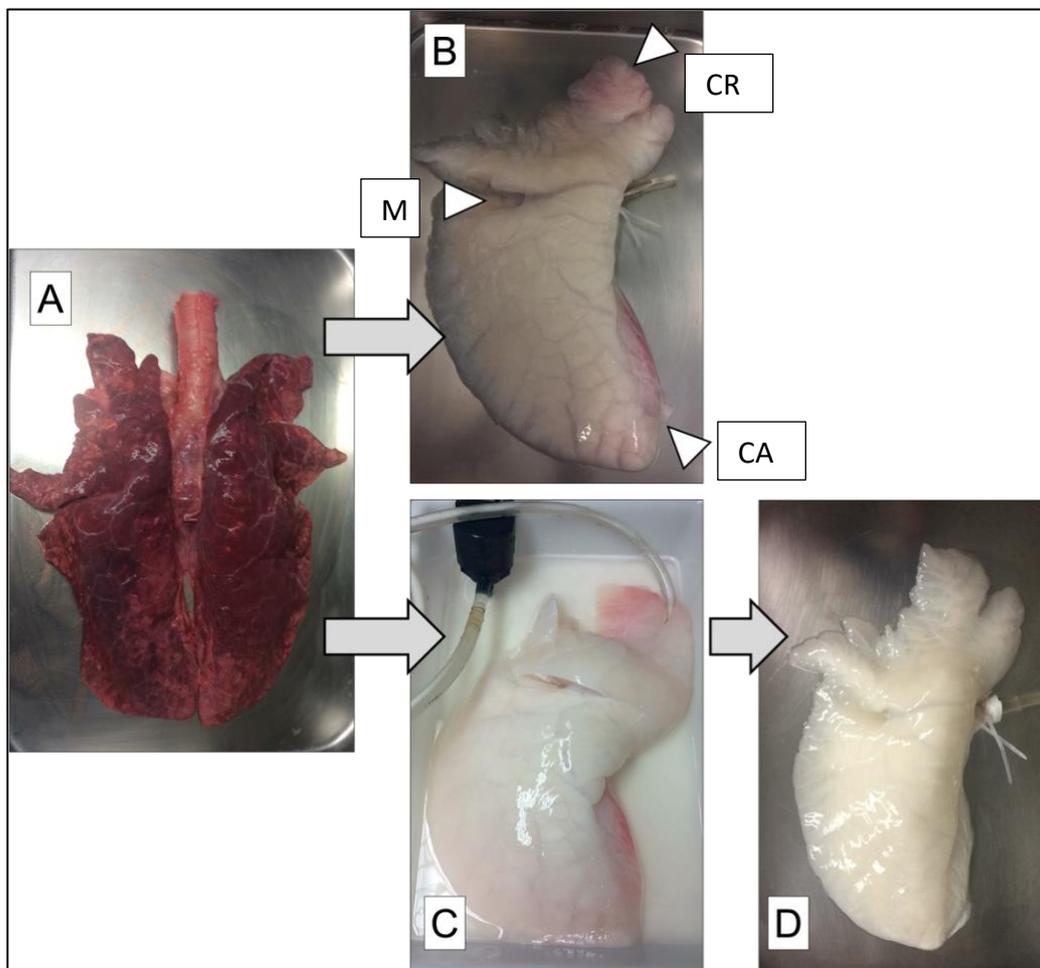


Figura 3: Comparação dos métodos de descelularização pulmonar, P1 (B: ao final do processo) e P2 (C: após 24 horas, e D: após 36 horas). A figura mostra o pulmão nativo (A) destacando as áreas cranial (CR), medial (M) e caudal (CA).

A diminuição da área de colágeno foi mais evidente no protocolo otimizado (P2) em comparação ao protocolo P1. A porcentagem de área de colágeno das amostras controle foi 32,33% (± 3.621 n=6), e demais protocolos foram P1 25.50% (± 2.335 N=6) e P2 21.38% (± 1.187 n=6") (Figura 4).

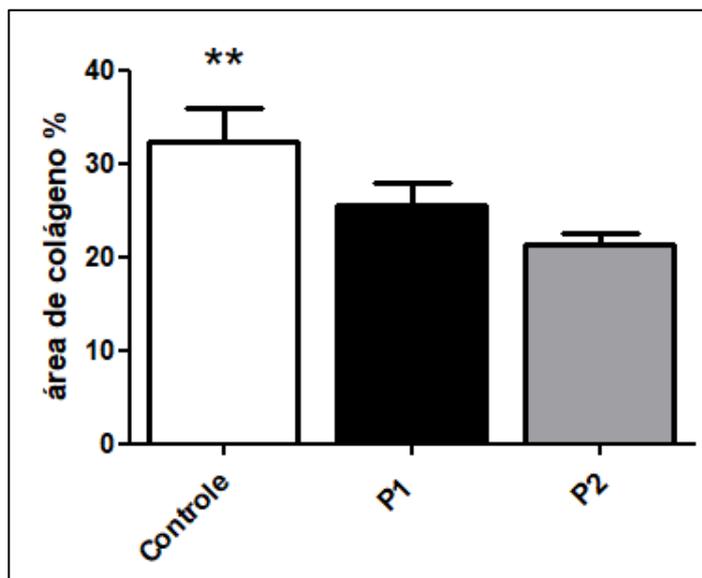


Figura 4: Quantificação da área de colágeno (%). Comparação entre tecido nativo (controle), protocolo de descelularização por perfusão manual da artéria pulmonar P1 (Pouliot et al, 2016) e protocolo otimizado de descelularização por perfusão automatizada da artéria pulmonar P2.

O conteúdo celular remanescente também foi eliminado satisfatoriamente (conteúdo de DNA abaixo de 50ng/mg de tecido), determinando a efetividade do processo de descelularização (Figura 5^a).

Ao analisar apenas as amostras descelularizadas pelo protocolo otimizado neste estudo, utilizando bomba de perfusão (3,4 L/minuto) para recirculação, as proteínas de interesse da matriz extracelular, como colágeno (Figura 5B), foram mantidas evidenciado pela quantificação do percentual de perda de área por meio de análise por Picrosirius e utilização do software ImageJ.

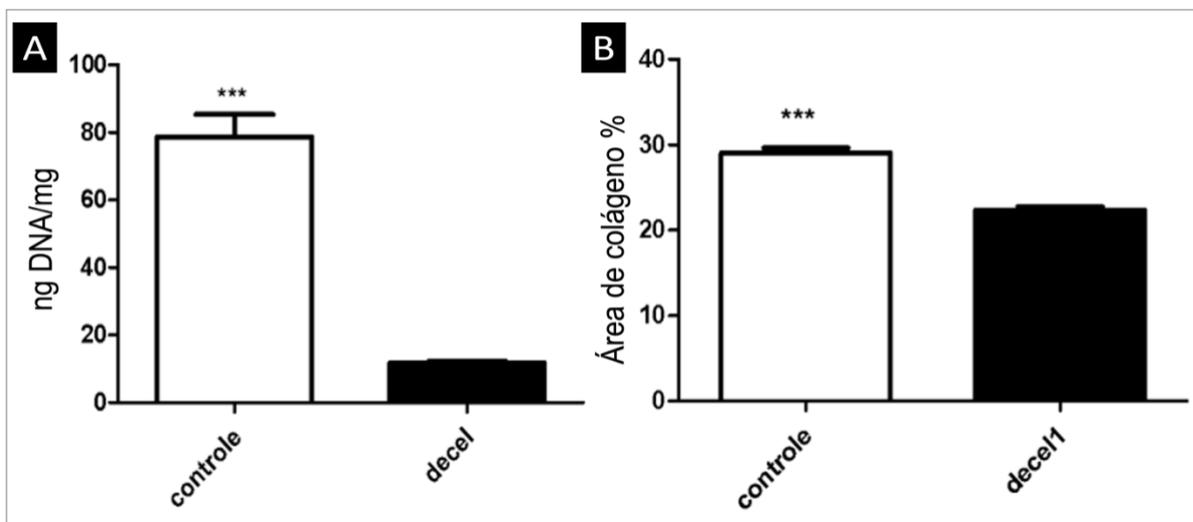


Figura 5: Quantificação do pulmão nativo e descclularizado referente a: (a) DNA, amostras controle e tecido descclularizado, abaixo do valor de referência de 50ng/mg e (b) porcentagem de colágeno por área, amostras controle e descclularizadas.

Seções histológicas coradas para hematoxilina e eosina, Picrosirius Red e Tricromo de Masson demonstraram a homogeneidade do processo de descclularização a eliminação de conteúdo celular e indicação de manutenção das proteínas da MEC (Figura 6).

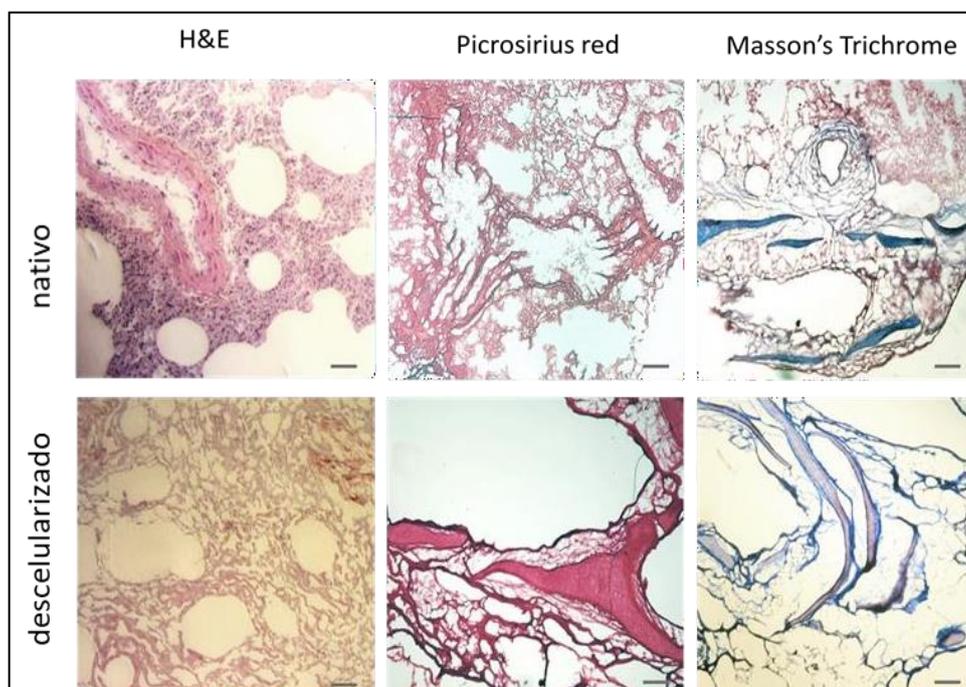


Figura 6: Histologia, amostras pulmonares controle e descclularizado. Colorações Hematoxilina e Eosina (H&E), Picrosirius Red e Tricromo de Masson. 20x.

3.3.2 Desenvolvimento de hidrogéis pulmonares derivados da matriz extracelular

Os hidrogéis produzidos a partir da matriz extracelular pulmonar foram analisados para avaliar a viabilidade celular e sua capacidade em manterem-se estáveis ao longo do tempo.

A análise com o microscópio invertido foi realizada depois de 7 dias e comparando células cultivadas em placa de cultivo de 60mm e no hidrogel. A viabilidade das células-tronco mesenquimais pulmonares em cultivo tridimensional no hidrogel por Live/Dead está ilustrado na seguinte figura (Figura 7).

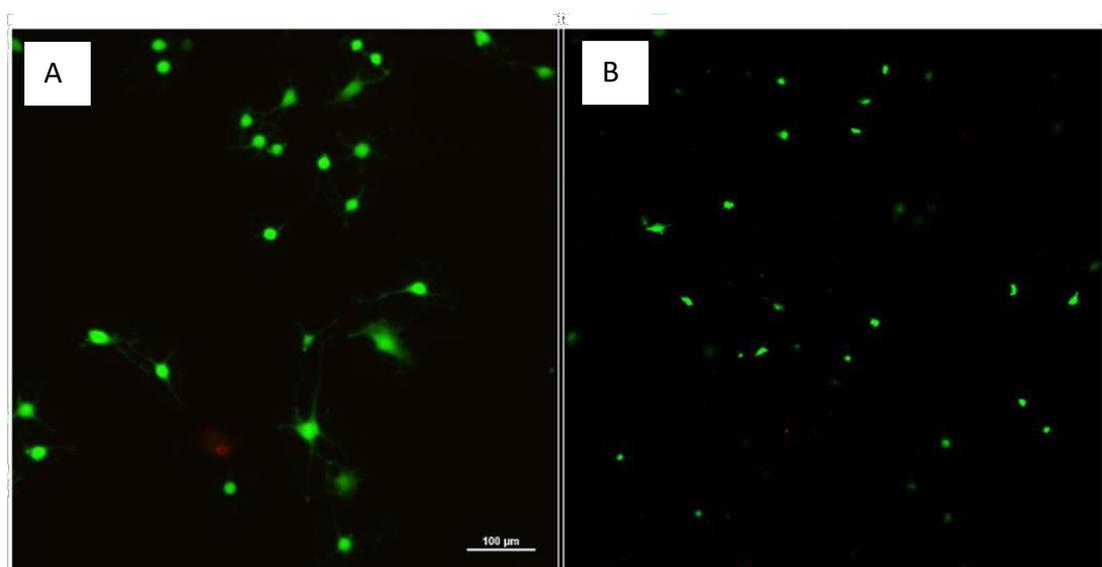


Figura 7. Sobrevivência celular (células vivas coradas em verde) de células tronco mesenquimais de pulmão em cultivo em placa (A) e após uma semana de cultivo em hidrogel (B).

A distribuição das células através do hidrogel foi analisada para se o cultivo foi homogêneo tridimensionalmente em hidrogel (Figura 8).

Foi possível visualizar a distribuição homogênea ao longo de todo o volume do hidrogel. As células estavam amplamente localizadas em toda a estrutura e em todo o seu eixo. O volume total do hidrogel foi reduzido para cerca de $\sim 600 \mu\text{m}$, devido à perda da sua parte aquosa, aliado ou não à interação das células, levando ao encolhimento. Apesar disto, a distribuição e viabilidade celular não foram alteradas.

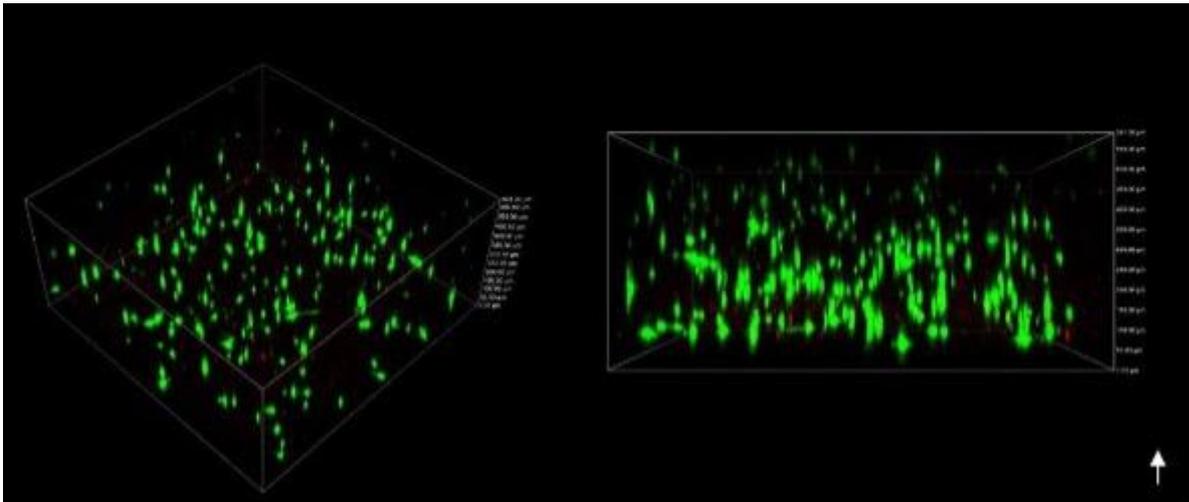


Figura 8. Distribuição tridimensional celular de células tronco mesenquimais pulmonares no hidrogel de MEC pulmonar descelularizada.

Para análise da sobrevivência celular, foi observada a deformação do hidrogel em placa de cultivo, que causou uma diminuição na altura total da estrutura.

O valor inicial da altura do hidrogel foi de 1,5 mm, mas após analisar o mesmo com o microscópio, o valor do mesmo diminuiu para $\pm 600 \mu\text{m}$.

Foram cultivadas 720.000 células/ml nos hidrogéis de alta concentração (AC) de MEC/mL e baixa concentração (BC), ambas as condições foram repetidas por 1,5 e 3 mm. Após uma semana de incubação, fotos dos discos flutuantes foram tiradas da vista superior e sua área de superfície medida com o programa ImageJ (Figura 9).

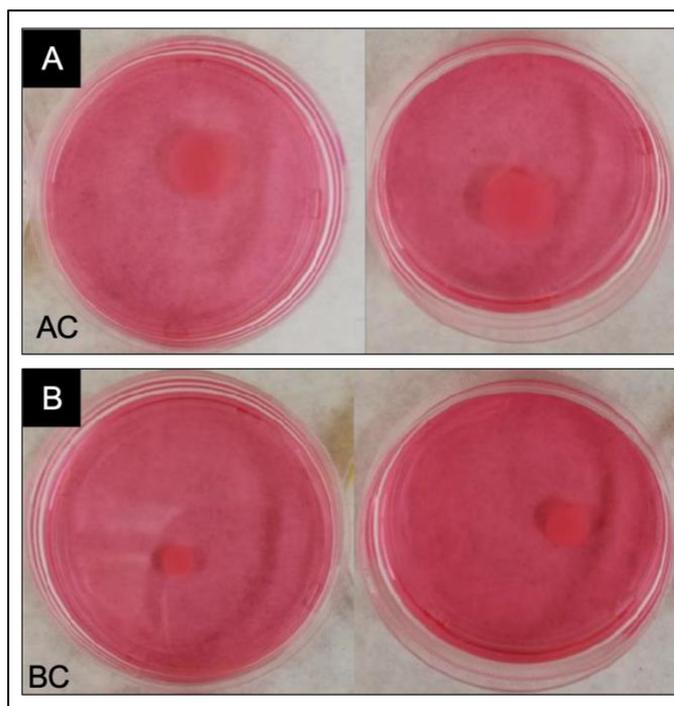


Figura 9: Hidrogéis de MEC descclularizada suína em teste de contração. (A) Hidrogel de alta concentração (“AC”) de substrato de MEC descclularizada e (B) Hidrogel de baixa concentração de substrato de MEC descclularizada (BC). Ambos hidrogéis após 7 dias. Diâmetros dos hidrogéis: (A) 1,5 mm à esquerda, 3 mm à direita, (B) 1,5 mm à esquerda e 3 mm à direita.

A contração no hidrogel a baixa concentração foi mais perceptível do que no hidrogel de alta concentração de matriz extracelular. A área original era de 188,7 mm² para todos os géis. O percentual de contração, mostrado na Tabela 3, dos hidrogéis mais concentrados não atingiram 20% após 7 dias, enquanto os de baixa concentração tiveram uma redução de cerca de 75%.

Tabela 4: Valores da contração dos hidrogéis após 7 dias de cultivo.

	Área final (mm ²)	Contração do hidrogel (%)
Hidrogel AC: 3mm	163	13
Hidrogel AC: 1.5mm	156	17
Hidrogel BC: 3mm	48	74
Hidrogel BC: 1.5mm	35	81

A confirmação da manutenção de potencial regenerativo das células tronco mesenquimais pulmonares cultivadas em hidrogel da MEC descclularizada pulmonar, e recuperadas após digestão deste, foi dada pelo teste de ranhura em placa de cultivo

celular. A área inicial foi de 52% pós ranhura, passando por uma recuperação desta área a uma parcela de 29% (Figura 10). Após 24 horas a ranhura estava completamente regenerada (Figura 11)

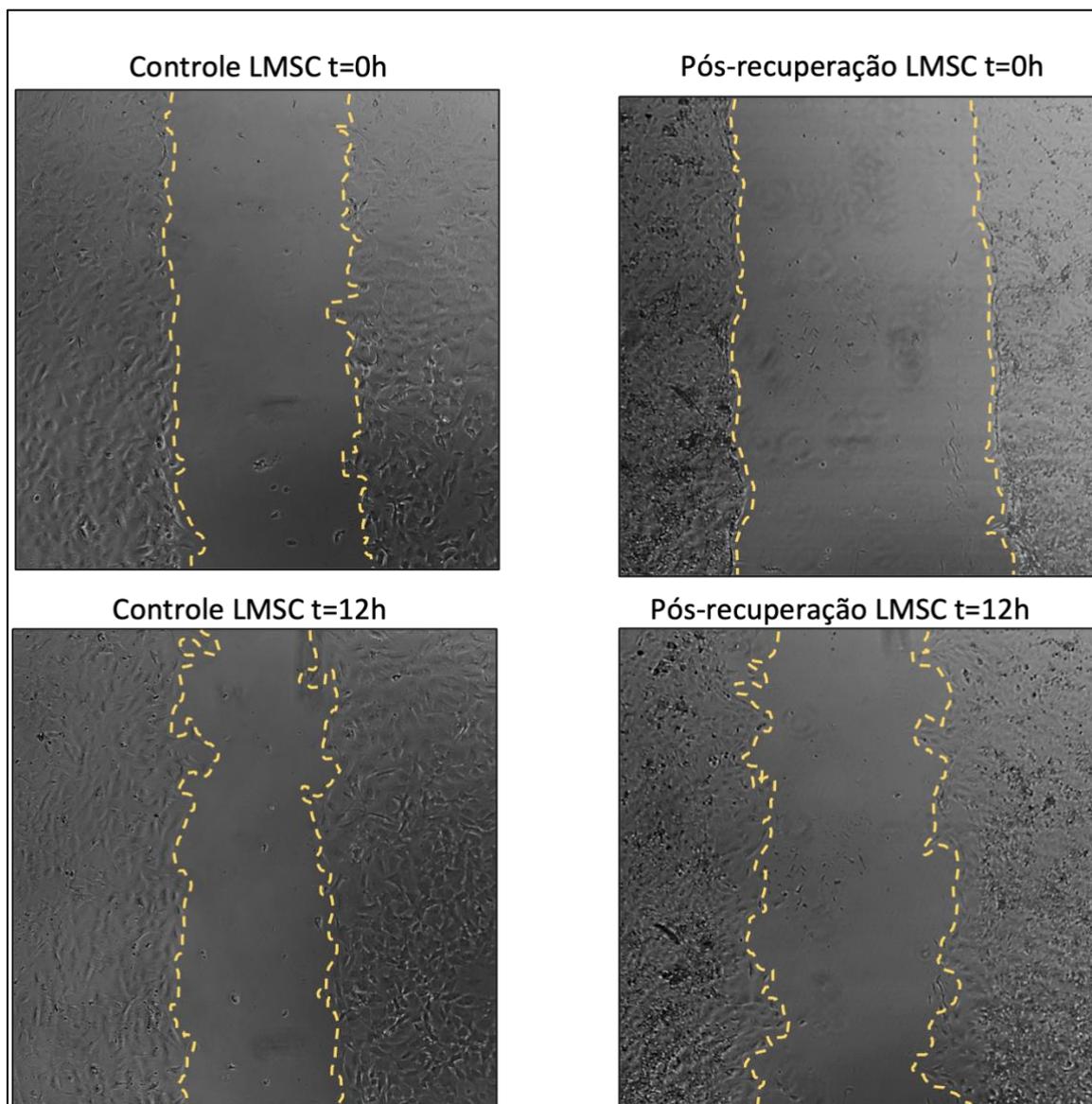


Figura 10: Teste de ranhura em placa de cultivo celular demonstrando o potencial regenerativo de células tronco mesenquimais pulmonares controle e pós-recuperação de cultivo em hidrogel de MEC descelularizada pulmonar aos tempos 0 e após 12 horas.

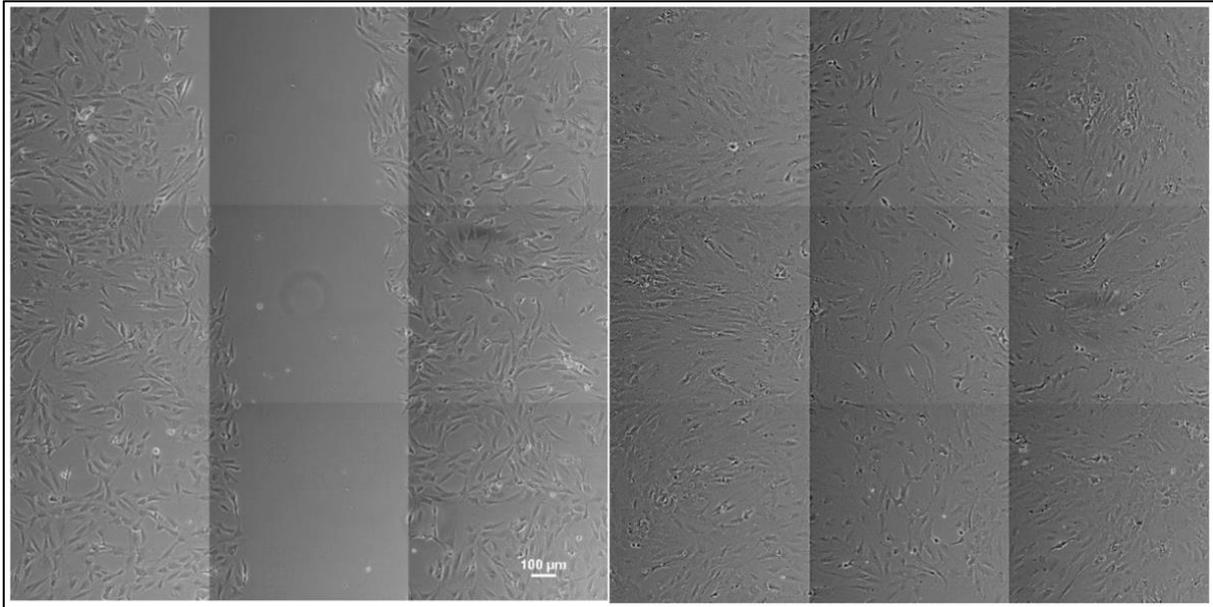


Figura 11: Teste de ranhura em placa de cultivo demonstrando o potencial regenerativo de células tronco mesenquimais pulmonares pós-recuperação de cultivo em hidrogel de MEC descelularizada pulmonar aos tempos 0 (direita) e após 24 horas (esquerda).

3.4. DISCUSSÃO

Nesta etapa de utilização da matriz extracelular pulmonar suína para elaboração de substratos para aplicação em cultivos tridimensionais, foram desenvolvidos hidrogéis para o cultivo tridimensional de células-tronco mesenquimais. A escolha da MEC nativa descelularizada se dá pela sua capacidade de mimetizar as características do tecido desejado podendo ser aplicada a diferentes plataformas de cultivo: bi-, tridimensional, estático ou dinâmico (NICHOLLS *et al*, 2022).

A matriz extracelular possui um grande papel no microambiente tecidual, de modo que influencia o comportamento celular. Respostas desencadeadas por seus estímulos físicos e químicos se relacionam diretamente com os processos fundamentais fisiológicos dos tecidos, mas também tem papel extremamente importante nos processos de doença, tanto naqueles casos de doenças crônicas respiratórias (HACKETT; OSEI, 2021; CHANDA *et al*, 2019; RICHELDI; COLLARD; JONES, 2017)

Biomateriais desenvolvidos com base na matriz extracelular descelularizada começaram a ser estudados na última década e triplicaram em tipo ao longo deste período, comprovando seu potencial. Porém suas limitações existem até que sua aplicação seja tecido-específica e seu potencial regenerativo totalmente aproveitado (BROWN *et al*, 2022).

Verificamos nos resultados apresentados que foi possível realizar o processo de descelularização de maneira efetiva fazendo uso de um protocolo otimizado. O processo de descelularização de órgãos e tecidos é uma técnica que apresenta vasto potencial para possibilitar a utilização da matriz extracelular descelularizada para fornecer substratos visando diversas aplicações. Isto devido às características e vantagens que a MEC proporciona, físicas e químicas, a nível molecular ou tridimensional, condicionando ou interagindo com o conteúdo celular (KYRIAKOPOULOU *et al*, 2022).

O protocolo P1 (POULIOT *et al*, 2016) apresentou, ao final de 72 horas de descelularização áreas em que a limpeza de material celular não foi efetiva (B). A otimização do protocolo por perfusão da artéria pulmonar (C e D) demonstrou ser

um processo mais homogêneo e adequado, após 12 (C) e 36 horas (D) com uma limpeza total do tecido pulmonar.

Os resultados pós processo de descelularização das matrizes pulmonares apresentados neste trabalho vão ao encontro ao proposto na literatura para a eficiente remoção de material que cause a não compatibilidade do biomaterial (CRAPO *et al*, 2011).

Materiais celulares residuais estão diretamente ligados à incompatibilidade de biomateriais elaborados a partir da MEC, assim o desejável é a eliminação ao máximo dos mesmos. Nos presentes resultados foi possível uma eliminação a níveis abaixo de 50ng de DNA/mg de tecido na MEC descelularizada pulmonar e não foi possível visualizar conteúdo nuclear à imunocoloração por DAPI ou por hematoxilina-eosina.

O protocolo de descelularização de pulmão utilizado neste estudo já era estabelecido (POULIOT *et al*, 2016), no entanto algumas falhas foram identificadas como a descelularização não homogênea e que não atingia a totalidade do órgão, a realização de perfusão manual com alta variação entre pessoal realizador do processo de descelularização, e a alta demanda por reagentes uma vez que o protocolo era demasiado longo (95 horas) e muito dispendioso economicamente.

Otimizamos este protocolo de modo que a quantidade de reagente utilizada foi diminuída, o período de descelularização passou de 95 a 36 horas, e o resultado final proporcionou uma descelularização muito mais homogênea do órgão e a total remoção aparente e comprovada nas análises histológicas e de DNA sob amostragem, corroborando também com os requisitos para uma descelularização efetiva (CRAPO *et al*, 2011).

O colágeno é a proteína mais abundante na MEC, e também desempenha um dos mais importantes papéis em sua estrutura, pois é o que proporciona, em especial, sua estabilidade e forma (HUANG *et al*, 2022). Tendo isto em vista, métodos de descelularização empregados em bioengenharia ou medicina regenerativa os quais consistam na elaboração de biomateriais, sempre objetivam a menor degradação ou alteração do conteúdo de colágeno da MEC. Apesar dos resultados obtidos aqui

demonstrarem diminuição no conteúdo de colágeno na MEC após descclularização pulmonar esta foi ligeira e sem significância ao comparado com o tecido nativo.

Ao quantificar a percentagem de áreas de colágeno para comparação entre protocolos, a diminuição na área de colágeno foi mais evidente no protocolo otimizado (P2), porém não foi evidenciada diferença significativa se comparado ao protocolo (P1) (POULIOT *et al*, 2016).

A quantificação de área de colágeno teve diferença significativa entre o tecido nativo, controle (32,33%, ± 3.621 n=6), e demais protocolos (P1 "25.50 ± 2.335 N=6" e P2 "21.38 ± 1.187 n=6"). A importância em manter o colágeno preservado após o processo de descclularização se dá por sua capacidade de manutenção da estrutura tridimensional. Uma vez utilizado em hidrogéis, a MEC descclularizada, rica em colágeno, será responsável também pela sustentação para o leito de cultivo celular. Além disto, o colágeno também proporciona vantagens referentes à biocompatibilidade do biomaterial, baixa imunogenicidade, aumento da área porosa em hidrogéis e biodegradabilidade (AMIRRAH *et al*, 2022).

A capacidade de remodelamento da MEC no tecido fisiologicamente normal, ou nos processos de doença, também está ligado à quantidade de colágeno, além de outras proteínas. Isto faz com que a MEC promova juntamente à sua interação com as células a regulação de suas funções, como visto neste trabalho, por meio da proliferação e viabilidade celulares (BONNANS; CHOU; WERB, 2014).

A utilização da MEC descclularizada pulmonar funcionou como substrato para a confecção de pré-géis e posterior elaboração de hidrogéis para o cultivo de células-tronco mesenquimais. A possibilidade de alterar a concentração da matriz extracelular presente no pré-gel a partir da diluição do substrato em pó de matriz extracelular descclularizada suína faz com que esta seja uma opção na regulação da rigidez do hidrogel e, em consequência, do biomaterial tridimensional, o qual terá importante influência sobre as células cultivadas (MENEZES *et al*, 2022).

A rigidez do hidrogel, influenciado pela quantidade de proteínas da MEC descclularizadas presentes em sua estrutura influenciam a dinâmica celular ao longo do tempo, mesmo em condições estáticas (PARK *et al*, 2022). Os hidrogéis produzidos a partir da matriz extracelular pulmonar foram analisados para avaliar a

viabilidade celular e sua capacidade em manterem-se estáveis ao longo do tempo. A análise da altura ótima do hidrogel para análise óptica foi realizada para células tronco mesenquimais de pulmão em três alturas: 0,5, 1,5 e 3 mm. Posteriormente, as células foram marcadas com calceína e homodímero de etídio para avaliação da viabilidade celular. A análise com o microscópio invertido foi realizada depois de 7 dias e comparando células cultivadas em placa de cultivo de 60mm e no hidrogel. Também, as L-MSCs cultivadas nos hidrogéis migraram da superfície do biomaterial, infiltrando-se homogêneoamente no seu interior, além de proliferarem e se manterem viáveis após 7 e 14 dias.

Aqui, foram testadas duas concentrações para a elaboração dos hidrogéis para cultivo celular tridimensional: alta concentração de MEC descelularizada, utilizando 20mg de substrato de MEC por mL de solução pré-gel, e outra a baixa concentração, sendo utilizada metade da concentração, 10 mg de substrato de MEC por mL de solução pré-gel. Porções mais concentradas de MEC na elaboração de biomateriais são um indicativo da presença de mais fibras, colágenas por exemplo, na sua constituição. Isto, juntamente com a interação das proteínas mantidas da MEC descelularizada e a interação com as células alteram a rigidez do biomaterial e determinam suas características biofísicas (COSTA *et al*, 2017).

Poder determinar a concentração da MEC em biomateriais, alterar sua rigidez e o tipo de células para o cultivo tridimensional, sendo este estático ou dinâmico, possibilitam a criação de diferentes modelos de doença pela mimetização do microambiente tecidual em diferentes condições (BEJLERI; DAVIS, 2019). A utilização da matriz extracelular para cultivos com células tronco também faz possível explorar os sinais biofísicos e biomoleculares da MEC descelularizada.

Por meio da aplicação da MEC descelularizada pulmonar em biomateriais é possível utilizar suas características com o papel fundamental para guiar linhagens celulares órgão-específicas para sua diferenciação e proliferação (BUSCH *et al*, 2021). Assim sendo, uma boa alternativa para modelar os biomateriais para diferentes modelos pulmonares *in vitro* e *in vivo* de organogênese, desenvolvimento e do processo de diferentes doenças, incluindo as doenças crônicas pulmonares (CORTIELLA *et al*, 2010).

3.5. CONCLUSÃO

Na primeira etapa deste trabalho, pulmões suínos foram descelularizados para obtenção de substrato para constituição de biomateriais para cultivo tridimensional de células tronco mesenquimais.

Foi possível a obtenção de um substrato em pó de matriz extracelular descelularizada pulmonar que permitiu o desenvolvimento de hidrogéis que se adequaram a diferentes concentrações deste substrato de MEC descelularizada. Hidrogéis com maior concentração de matriz extracelular possuem maior conteúdo proteico e possuem maior tensão de tração com o cultivo celular de L-MSCs.

Os hidrogéis pulmonares derivados da MEC suína descelularizada permitiram o cultivo celular tridimensional de células-tronco mesenquimais. O biomaterial final possibilitou a migração e proliferação celular após 7 e 14 dias, mantendo também sua viabilidade e o potencial regenerativo das células-tronco mesenquimais pulmonares.

CAPÍTULO 4: Utilização da matriz extracelular descelularizada cardíaca na geração de cultivos bidimensionais e biomateriais tridimensionais

4.1. INTRODUÇÃO

Existe uma clara necessidade do desenvolvimento de alternativas para o estudo da regeneração e/ou reparação cardíaca utilizando biomateriais. Desenvolver novos métodos para o estudo da fisiopatologia cardíaca *in vitro*, de modo que, com a disponibilidade de tecidos cardíacos análogos com as mesmas propriedades do tecido *in vivo*, possibilitaria, por meio da criação de modelos de cardiopatia, o desenvolvimento de terapias para sua prevenção ou cura e aplicações em medicina regenerativa. A bioengenharia cardíaca torna essa possibilidade possível por meio da utilização da matriz extracelular cardíaca descelularizada (GOLDFRACHT *et al*, 2019).

Os estudos nesta área visam produzir construtos com propriedades estruturais, fisiológicas e funcionais semelhantes ao tecido cardíaco nativo. Os modelos *in vitro* podem ser aplicados a estudos de doenças, testes de drogas e toxicologia, e para substituir ou regenerar tecidos danificados. A utilização da MEC descelularizada é uma alternativa atrativa pois não está limitada por fatores como incompatibilidade, dificuldade em alcançar sua composição proteica ou em mimetizar o tecido nativo (WHITEHEAD *et al*, 2022).

Fatores como a dificuldade em atingir a maturação adequada a nível celular e à alta dependência da organização estrutural do tecido cardíaco tornam a elaboração de abordagens em bioengenharia cardíaca muitas vezes frustrada. Porém, a utilização da MEC descelularizada aliada a cultivos tridimensionais de células altamente específicas pode gerar biomateriais que mimetizam o tecido cardíaco, não só estruturalmente, mas também de forma funcional permitindo a condução do estímulo elétrico ao longo do biomaterial (CHEN *et al*, 2022).

Um avanço promissor na bioengenharia cardíaca é a utilização de células-tronco pluripotentes induzidas para aplicações em medicina regenerativa cardíaca. Essas células têm a capacidade de diferenciarem-se em cardiomiócitos que podem

ser cultivados em construtos tridimensionais, visando a criação de modelos de doenças cardíacas e o estudo da sua interação com a matriz extracelular cardíaca saudável ou doente, em todos os estágios de desenvolvimento do organismo humano ou animal (FREYTES *et al*, 2014).

Por meio da utilização de células tronco pluripotentes induzidas para posterior diferenciação em cardiomiócitos, esta etapa de pesquisa buscou elaborar cultivos bi e tridimensionais que explorassem a capacidade de substratos de matriz extracelular cardíaca descelularizada em proporcionar um ambiente de diferenciação, proliferação e maturação celular, gerando biomateriais funcionais para uma aplicação futura em medicina regenerativa cardíaca.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Descelularização do miocárdio e obtenção de substrato de matriz extracelular cardíaca

Corações suínos, provenientes de abatedouro local e armazenados na Unidade de Biofísica e Bioengenharia da Universidade de Barcelona (n=3), passaram por um processo de congelamento e descongelamento, para então terem seu ventrículo esquerdo isolado para dissecação do miocárdio e sua descelularização em pequenos fragmentos (BECKER et al, 2017; PATI; CHO, 2017).

Os fragmentos de miocárdio obtidos foram lavados em solução de penicilina/estreptomicina 1% por 12h em agitação, e postos em duas soluções de detergente para descelularização distintas: (a) SDS1%; (b) SDC2%. Ambos os processos com o detergente levaram 72 horas, seguido por 3 lavagens com água deionizada por 5 minutos, Triton X-100 0,1% por 1 hora, e 3 lavagens finais com PBS 1x por 15 minutos cada. Os fragmentos descelularizados passaram por etapa de esterilização utilizando ácido peracético em etanol a 4% e foram congelados para armazenamento a -80°C.

Os fragmentos de MEC cardíaca foram liofilizados (TELSTAR, S.L. Cryodos-50) e reduzidos para obtenção de um pó grosso com pequenos fragmentos, de modo a manter mais bem preservadas as proteínas da MEC. O pó de matriz extracelular descelularizada cardíaca foi digerido a diferentes concentrações de MEC: 10 mg/mL; 15mg/mL; 20mg/mL e, 30mg/mL. A digestão foi feita de 24 a 48horas a 27°C (pepsina 10% p/p [Sigma Aldrich] e HCl 0,01 M [Sigma Aldrich]. Após a digestão, foram adicionados PBS 10x a 1/9 do volume (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) e NaOH 0,1 M 1/10 do volume (Sigma Aldrich) para ajuste e estabilização do pH. Foram feitas alíquotas de 1mL para armazenagem a - 20° C.

O hidrogel para cultivo tridimensional foi obtido por meio do processo de gelificação por regulação do pH da solução pré-gel de matriz extracelular descelularizada e posterior ação térmica, com a manutenção dos pré-géis em incubadora a 37°C por no mínimo 60 minutos, e avaliando-se a posterior estabilidade de consistência do hidrogel em tempos superiores com armazenagem em incubadora a 37°C.

4.2.2 Cultivo celular de células tronco pluripotentes induzidas humanas e diferenciação em cardiomiócitos

Células tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC), derivadas de queratinócitos humanos, geradas, armazenadas e aprovadas para uso pelo Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (IDIBELL, Espanha), foram cultivadas em placas de cultivo revestidas com Matrigel® (10 cm de diâmetro, Corning) com meio de cultivo mTeSR1 (Stem Cell Technologies), com trocas de meio diárias, com exceção do primeiro dia pós passagem celular. As passagens celulares foram feitas a 1:6 e 1:10 com EDTA 0,5mM (Invitrogen). As células adicionadas de EDTA 0,5mM foram incubadas por 2min a 37°C e os agregados celulares semeados em placas revestidas com Matrigel® e mantidas em cultivo para passagens subsequentes.

As iPSC foram diferenciadas em cardiomiócitos em cultivo de monocamada com moduladores de sinalização Wnt canônico (LIAN *et al*, 2013) em cultivos em placas revestidas com revestimento comercial, Matrigel®, ou com o pré-gel derivado do substrato de matriz extracelular descelularizada cardíaca. Ambos os cultivos foram mantidos nas mesmas condições e passaram pelos mesmos processos.

Células iPSC foram mantidas no cultivo revestido com Matrigel® ou MEC descelularizada em meio mTeSR™1 e dissociadas em células isoladas utilizando Accutase (Labclinics). Para a dissociação das células com Accutase os cultivos foram levados à incubadora com esta solução, a 37°C por 8 minutos. Uma vez dissociadas as iPSC foram cultivadas novamente em placas de 12 poços, contendo as duas opções de revestimento a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células por poços, e suplementadas com 10uM de inibidor ROCK (Sigma-Aldrich, Espanha). O meio de cultivo mTeSR1 passava por trocas diárias, durante 3 dias e ao atingir confluência, o cultivo foi suplementado com 10uM de inibidor GSK3 (Stemgent, USA) e o meio utilizado passou a ser RPMI (Invitrogen, Espanha). Este meio também passou por suplementação com B27 (Life Technologies, ThermoFischer Scientific), sem adição de insulina, 1% Glutamax (Gibco, Thermo Fischer Scientific), antibiótico penicilina/estreptomicina 0,5%, aminoácidos não-essenciais 1% (Lonza) e 0,1mM 2-mercaptoetanol (Gibco, Thermo Fischer Scientific). Este meio RPMI suplementado

permaneceu no cultivo por 24 horas. Após este período foi realizada uma troca de meio e adicionado novamente o meio RPMI nas mesmas condições e mantido por dois dias. No terceiro dia de diferenciação, foi utilizada a suplementação com 5uM de inibidor do Wnt IWP4 (Stemgent) no meio RPMI sem adição de insulina. Este meio foi substituído após dois dias.

A partir do quinto dia de diferenciação, o cultivo celular foi mantido com meio RPMI suplementado com B27, L-glutamina 1%, penicilina/estreptomicina 0,5%, aminoácidos não essenciais 1% e 0,1mM 2-mercaptoetanol. As trocas de meio foram realizadas a cada dois dias.

Entre o oitavo e décimo segundo dia, cardiomiócitos contráteis foram presentes. Agregados de cardiomiócitos que apresentaram batimentos espontâneos foram desagregados por volta do 20º dia de cultivo e do 35º dia e incubados com tripsina-EDTA 0,25%, por 5-8min a 37°C para caracterização e cultivos tridimensionais e em suspensão.

Após estabelecimento e manutenção dos cultivos 2D de células tronco pluripotentes humanas e da sua diferenciação em cardiomiócitos, ambos tipos celulares foram transferidos para o cultivo em suspensão dinâmica.

As iPSC foram passadas para o cultivo em suspensão em densidade de 1×10^6 células para cada 100 mL na presença de inibidor ROCK 10uM Y-27632 (Stemgent) para manutenção. Este cultivo foi realizado utilizando placa de agitação orbital (Celltron) em incubadora a 37°C, e as células mantidas placas de cultivo de 6 poços de baixa aderência, a rotação de 85 rotações por minuto (rpm).

O protocolo de passagem de cardiomiócitos foi padronizado para definir a densidades adequadas de células/100mL que permitiram a manutenção de um cultivo em suspensão viável.

A manutenção dos cultivos se deu pela passagem das células, realizada transferindo-se os agregados celulares para tubos cônicos de 15 mL seguido de centrifugação a 800x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado para adição de Accutase para incubação a 37°C, em 5% CO₂ até que se observasse dissociação dos agregados de células (checagem a cada 3 minutos, a partir dos 7 min).

A manutenção do cultivo celular teve continuidade e as células foram contabilizadas para posterior avaliação de produção em larga escala de cardiomiócitos em biorreator de perfusão.

Uma ilustração esquemática do processo de diferenciação de células tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos derivados de IPSC é apresentada na Figura 12.

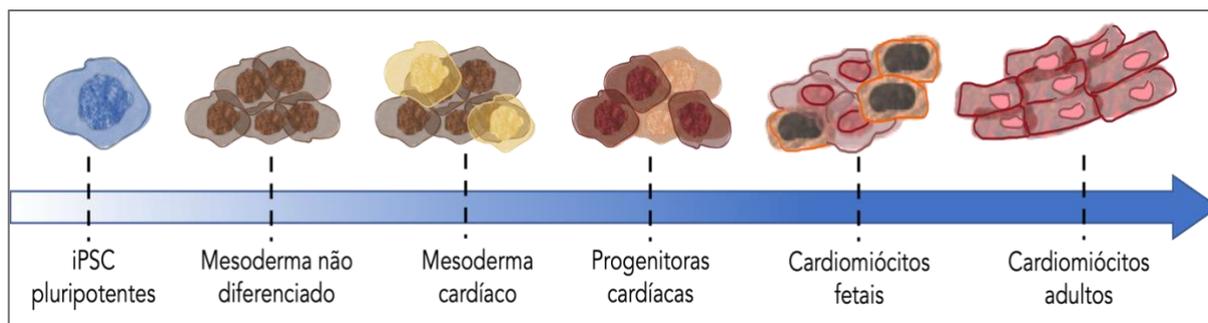


Figura 12: Ilustração esquemática do processo de diferenciação de células tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos derivados de IPSC, apresentando os tipos celulares presentes ao longo do processo até que se obtenham cardiomiócitos maduros.

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio da contagem de células, número total e de células viáveis em cultivo estático e em suspensão (Live/Dead Kit, Thermofisher). Foram utilizados Trypan Blue (Bio-Rad) e um contador de células automático (Bio-Rad) para amostragem com objetivo da estimativa da contagem de células viáveis entre as passagens de cultivos.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Descelularização do miocárdio

O processo de descelularização do tecido cardíaco resultou em fragmentos descelularizados de maneira homogênea (Figura 13), de aspecto limpo e sem evidência de conteúdo celular remanescente, como também demonstrado em coloração de Hematoxilina e Eosina e imunocoloração DAPI (Figura 14).

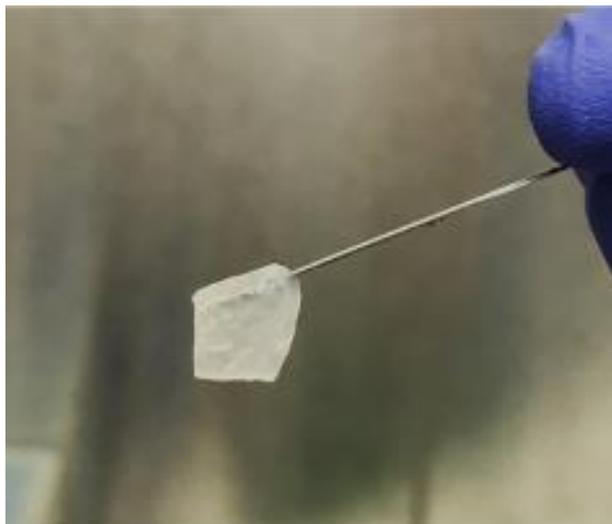


Figura 13: Imagem de um fragmento de miocárdio de 1cm² após processo de descelularização, demonstrando a limpeza de conteúdo celular de forma homogênea e caracterizado pela aparência translúcida da MEC descelularizada.

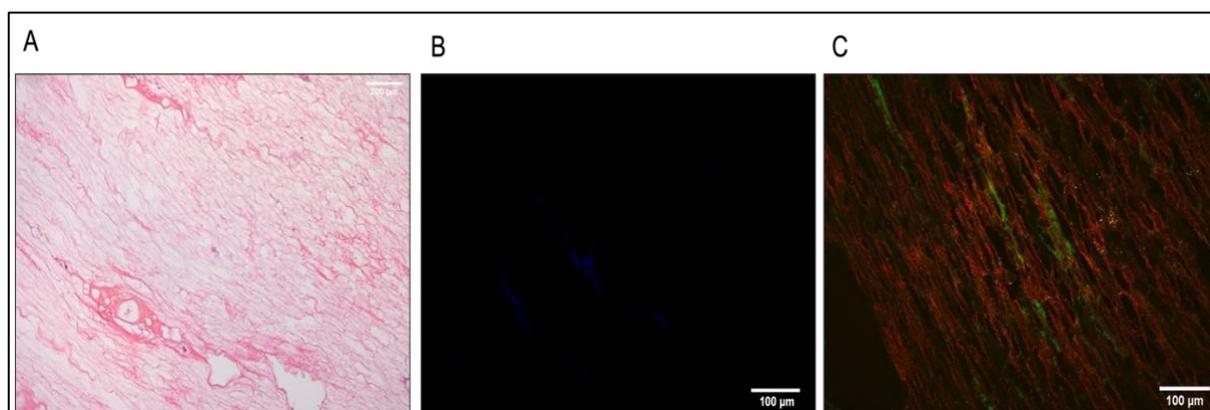


Figura 14: Imagem de microscopia óptica e confocal. (A) Histologia com coloração para Hematoxilina & eosina; (B) Imunohistoquímica com marcação para DAPI; (C) Imunohistoquímica com marcação para DAPI, fibronectina e colágeno I e III. 20x

A estrutura do tecido e sua composição proteica foram mantidos, com a utilização de ambos os detergentes, SDS 1% e SDC2% (Figura 15).

A eliminação de conteúdo celular também foi comprovada pela quantificação de DNA no tecido após o processo de descclularização, mostrando-se eficiente e abaixo dos níveis preconizados de 50 ng de DNA por mg de tecido (Figura 16A).

Apesar da utilização de detergente SDS reduzir a quantidade de colágeno na matriz extracelular do tecido descclularizado, esta redução não foi significativa (Figura 16B).

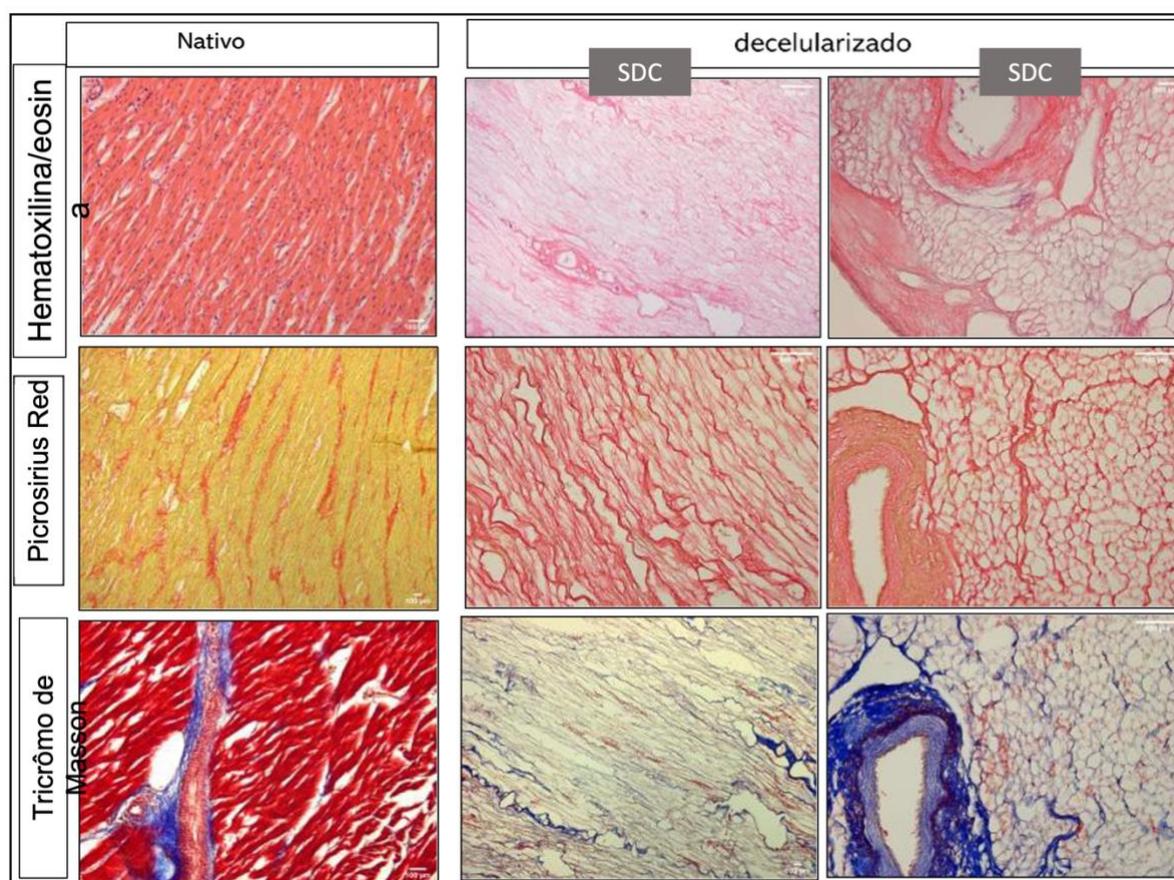


Figura 15: Colorações de Hematoxilina e Eosina, Picrosirius Red e Tricromo de Masson, para os tecidos cardíacos nativos e descclularizado, utilizando protocolos SDS e SDC. Imagem de microscopia óptica, 40x.

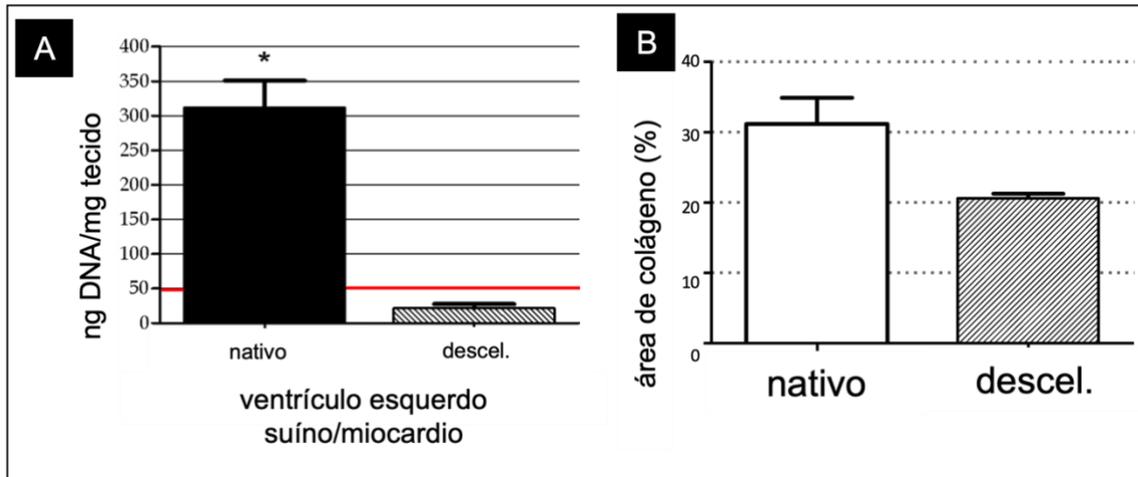


Figura 16: Quantificação do tecido cardíaco nativo e descelularizado referente a: (A) DNA, abaixo do valor de referência de 50ng/mg (Crapo *et al*, 2011), e (B) porcentagem de colágeno por área.

As proteínas de interesse da matriz extracelular, colágenos I e III, fibronectina, e laminina se mantiveram preservadas, como mostrado na análise imunohistoquímica (Figura 17).

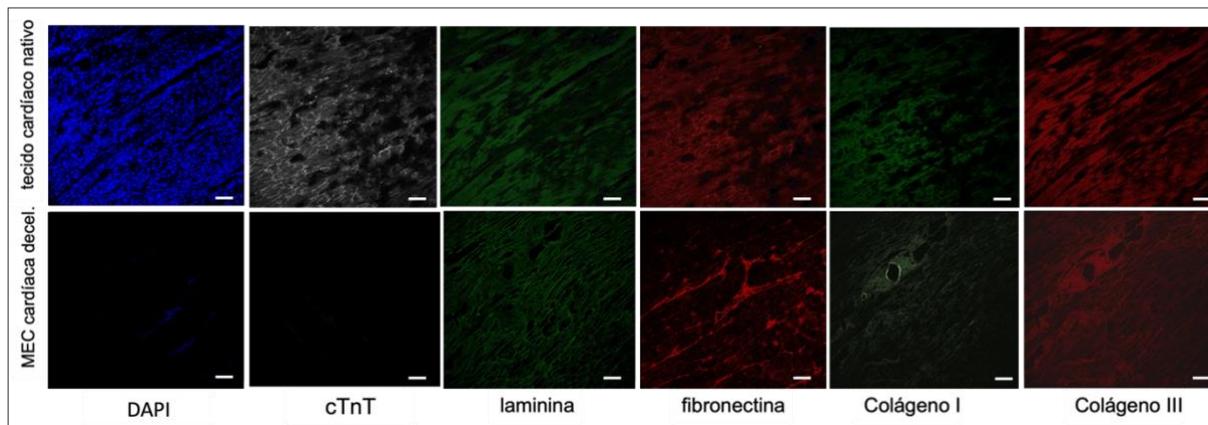


Figura 17: Imagem de microscopia confocal. Imunohistoquímica do tecido cardíaco nativo e descelularizado. Marcações para DAPI, cTnT, laminina, fibronectina, colágeno I e III. 20x.

4.3.2 Substrato de matriz extracelular cardíaca e cultivo 2D e 3D de IPSC e cardiomiócitos

Após a formulação de um pré-gel de matriz extracelular cardíaca descclularizada foram elaborados um substrato para o revestimento de placas de cultivo e outro para formulação de um construto com e sem adição de células (fibroblastos e IPSC derivadas de cardiomiócitos) tridimensional.

As placas de cultivo celular foram revestidas com o pré-gel elaborado a partir do pó de matriz extracelular descclularizada cardíaca, após digestão o a diferentes concentrações de MEC: 10 mg/mL; 15mg/mL; 20mg/mL e, 30mg/mL.

Após 48horas de digestão da MEC descclularizada a 37°C utilizando pepsina 10% p/p [Sigma Aldrich, Missouri, EUA] e HCl 0,01 M [Sigma Aldrich, Missouri, EUA], foram adicionados PBS 10x a 1/9 do volume e NaOH 0,1 M 1/10 do volume de modo que foi possível ajustar o pH da solução nas quatro diferentes concentrações de maneira estável (Figura 18).

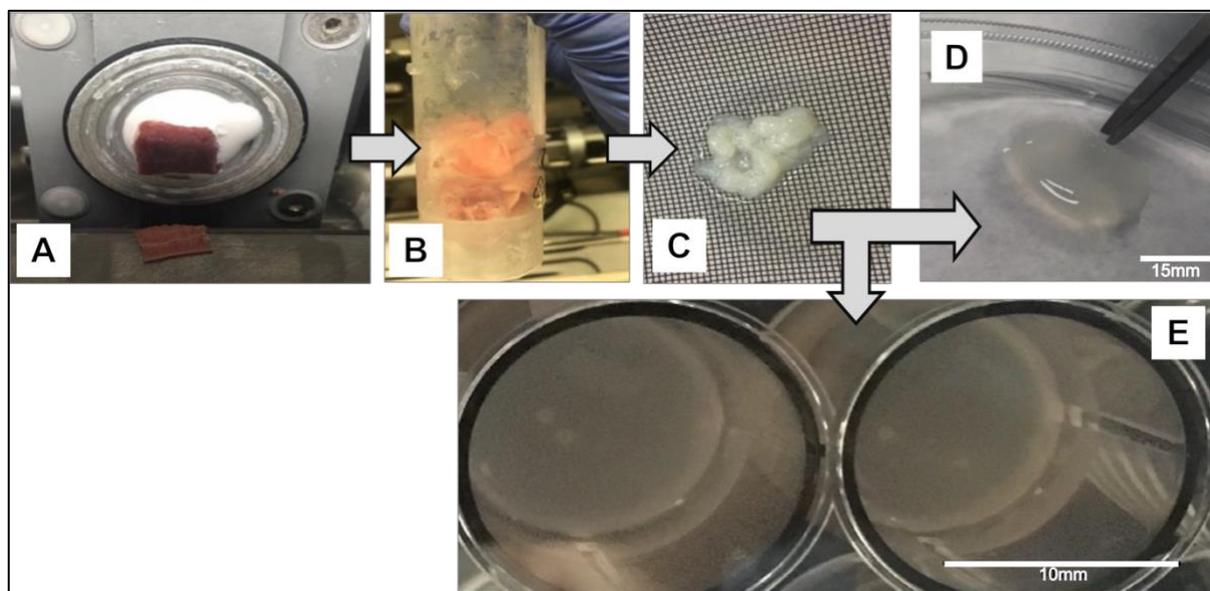


Figura 18: Processo de confecção de substrato de matriz extracelular cardíaca descclularizada para formação de um pré-gel para gelificação e formação de um hidrogel ou para o revestimento de placas de cultivo 2D. O fluxo do processo se deu pela fragmentação de miocárdio suíno esquerdo (A e B), descclularização (C) e liofilização, obtenção do gel e gelificação para obtenção do construto para cultivo 3D (D) e/ou para obtenção do gel para revestimento de placas de cultivo 2D (E).

Células iPSC foram efetivamente diferenciadas em cardiomiócitos derivados de iPSC utilizando a diferenciação por modulação do Wnt (LIAN *et al*, 2012). As células progenitoras cardíacas foram observadas em média ao redor dos dias 5 e 8 de cultivo, e a função contrátil celular observada em total evidência entre os dias 8 e 12 (Figura 19).

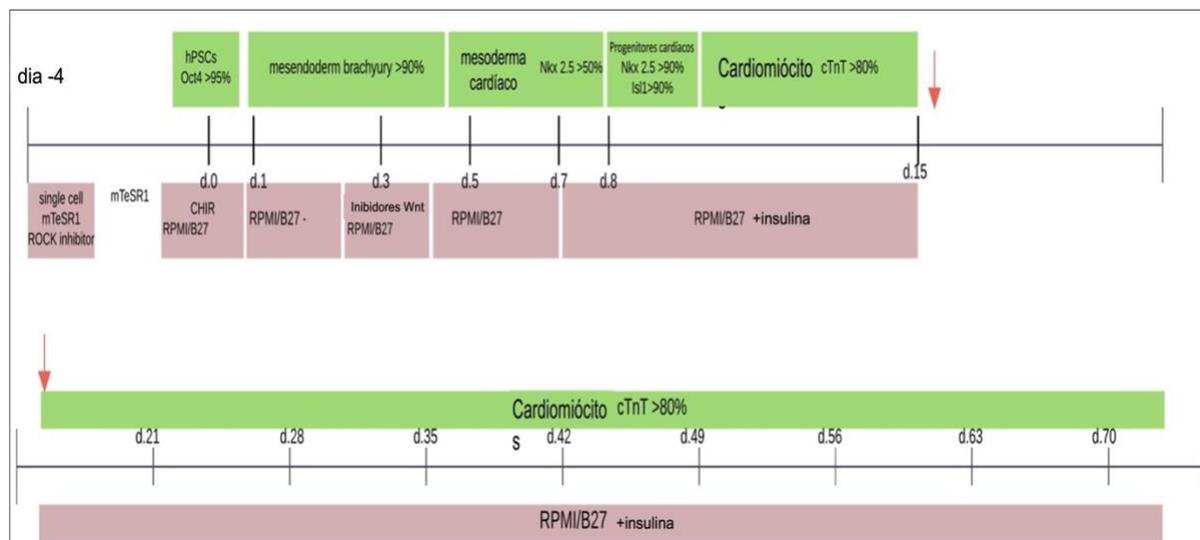


Figura 19: Esquema representativo dos tempos e diferentes etapas do processo de diferenciação de iPSC em cardiomiócitos.

As células diferenciadas em cardiomiócitos apresentando batimento espontâneo foram isoladas das células que voltaram a apresentar fenótipo fibroblastóide, e expandidas para maturação. Neste período os cardiomiócitos apresentando características fenotípicas adequadas foram levados ao cultivo bi- ou tridimensional em suspensão.

Além da visualização de batimento espontâneo nos cultivos celulares, a expressão de troponina cardíaca T (cTnT) evidenciou a efetiva diferenciação de células iPSC em cardiomiócitos após o oitavo dia de diferenciação.

A expressão de cTnT foi mantida nos cultivos bidimensionais utilizando o revestimento de MEC, em comparação ao cultivo em placas revestidas com Matrigel, assim como o mesmo foi observado em cultivos tridimensionais.

A viabilidade dos cardiomiócitos cultivados em substrato de MEC 2D e 3D (Figura 20) foi confirmada por imunofluorescência utilizando marcação DAPI e cTnT,

em ambos cultivos bi- e tridimensionais. A expressão de cTnT foi semelhante ao do cultivo celular utilizando como plataforma de cultivo o Matrigel®.

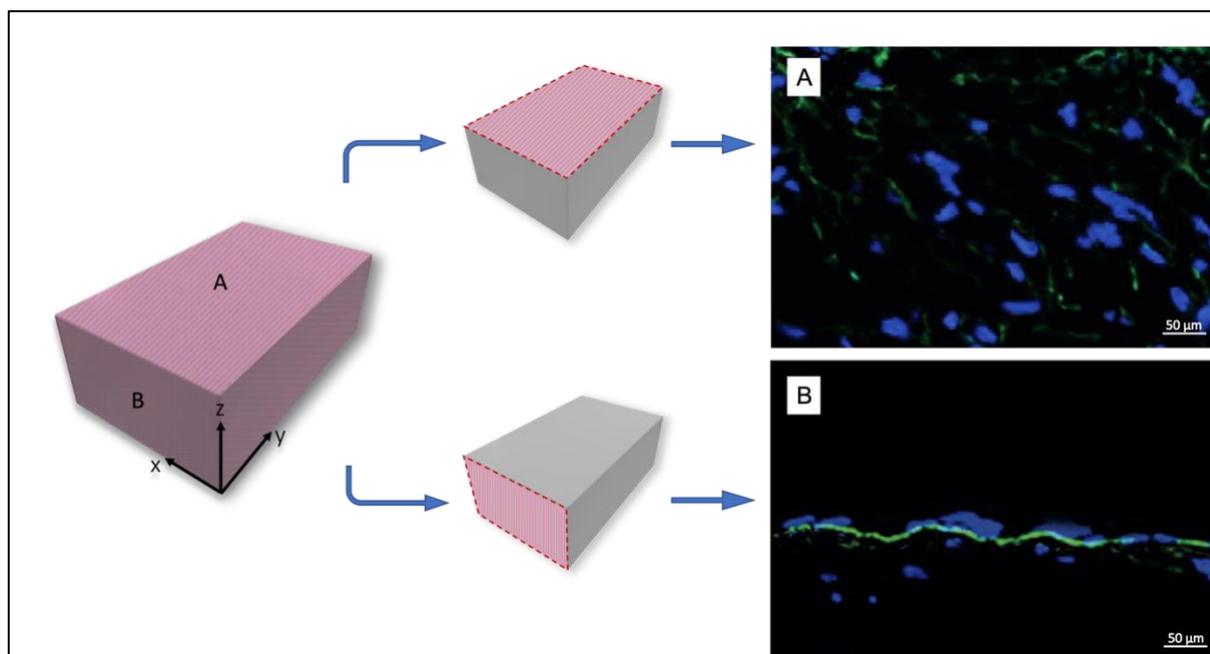


Figura 20: Ilustração esquemática de um construto (hidrogel) tridimensional para o cultivo de cardiomiócito. Em A e B se observam as células imunocoradas para DAPI (azul) e cTnT (verde) e sua distribuição ao longo dos eixos do hidrogel. Visão do topo do hidrogel (A) com incidência da imagem de microscopia confocal sobre o eixo z, e visão da lateral do hidrogel em um corte ao longo do eixo x (B). 40x.

A marcação “Livre/dead” (Livre/dead Assay, ThermoFisher) demonstrou que os cardiomiócitos mantiveram-se viáveis do mesmo modo em comparação à queles cultivados em Matrigel, após desprendimento das placas de cultivo bidimensionais e passagem para o cultivo em suspensão (Figura 21).

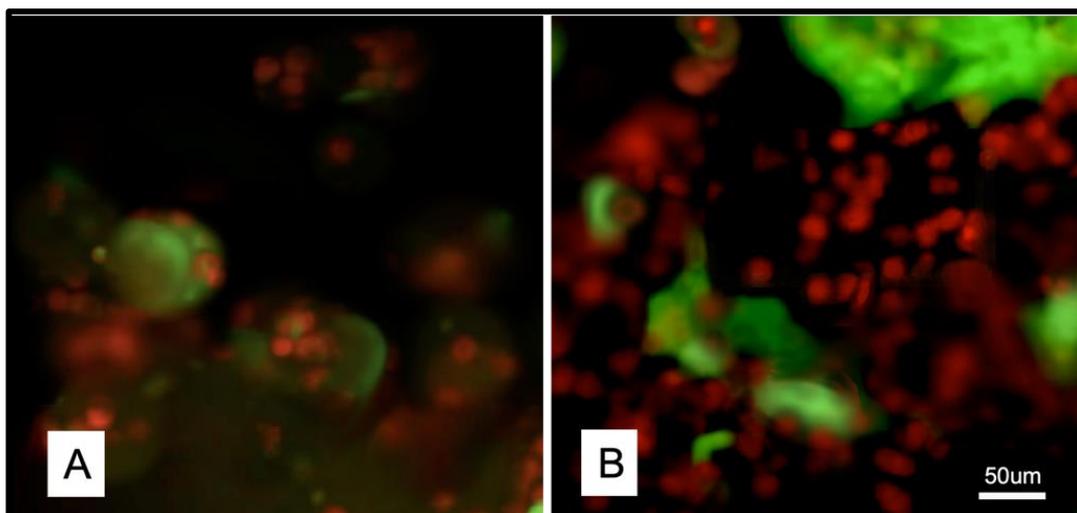


Figura 21: Cardiomiócitos cultivados em suspensão após 48h. Células marcadas com o kit Live/Dead. Imagem de fluorescência demonstrando agregados de cardiomiócitos viáveis/células vivas e em Vermelho as células desagregadas mortas. 40x.

A função contrátil das células diferenciadas evidenciou o comportamento das células, sendo utilizado como um indicador de que a diferenciação de iPSC em cardiomiócitos foi efetiva quando utilizando a MEC, e além disto foi possível esta diferenciação e manutenção de viabilidade sem adição de fatores de crescimento adicionais ao meio de cultivo ou à preparação do cultivo 3D.

A análise de sequências de imagens a 200 quadros (40ms/quadro) obtidos utilizando microscópio de contraste de fase (Olympus IX81). O tamanho da área contrátil foi avaliado por contagem de pixels em software de processamento de imagens (ImageJ, NIH) e analisados por processamento de dados. As áreas contráteis e de proliferação celular em cultivos utilizando o gel da MEC descelularizada foram mais pronunciados naqueles em que o substrato utilizado foi o Matrigel® (Figura 22).

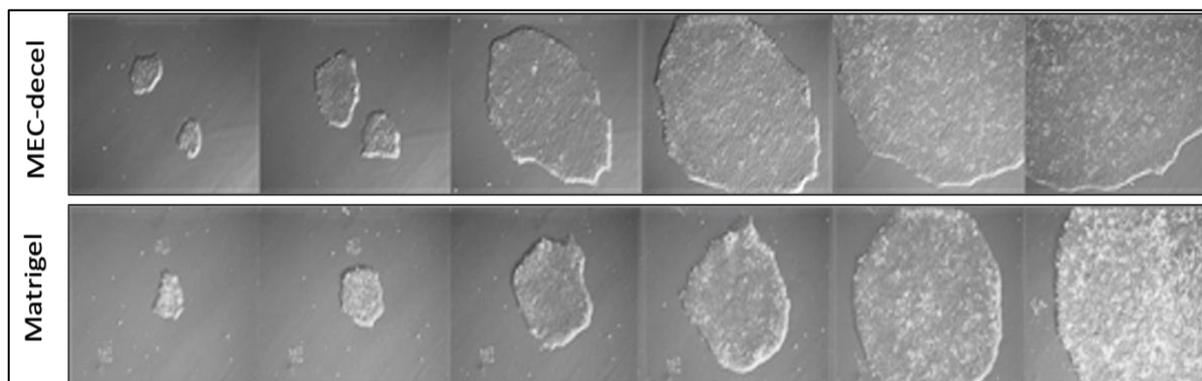


Figura 22: Cultivos bidimensionais de cardiomiócitos derivados de IPSC em revestimento de Matrigel® e de MEC descelularizada cardíaca. Dias 3 ao 8. Microscópio óptico, contraste de fase. 20x.

A amplitude de contração (%) foi avaliada pela quantificação da área de contração de cardiomiócitos em placa de cultivo de 52mm utilizando-se a MEC descelularizada cardíaca em comparação ao matrigel. A área de contração na placa de cultivo em condição bidimensional utilizando o Matrigel® demonstrou-se 22,16% superior (4753 ± 427.8 N=4) à da MEC descelularizada (3700 ± 239.4 N=4), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 23).

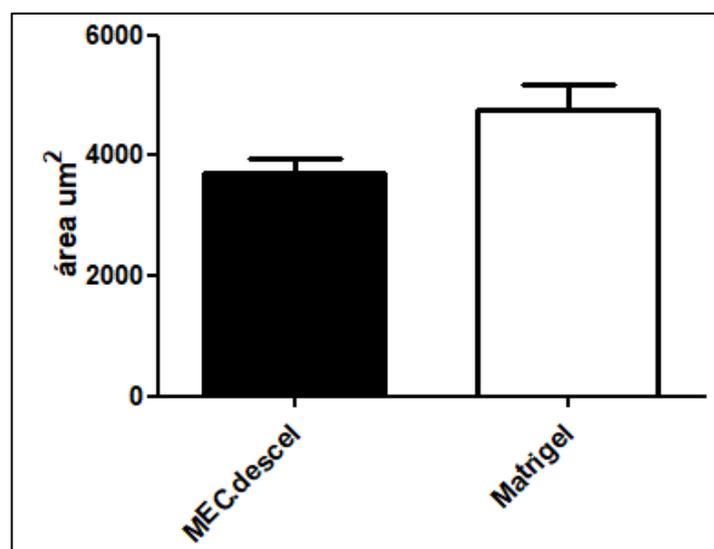


Figura 23: Área contrátil do cultivo em placa de cultivo de 52mm de diâmetro, utilizando revestimento de MEC descelularizada cardíaca e Matrigel.

A amplitude de contração (%) também se apresentou maior quando utilizado o substrato de MEC cardíaca descelularizada no cultivo em suspensão, observando-se a mudança de área no cultivo (μm^2) 14,3% maior quando utilizadas as células previamente cultivadas em 2D na MEC cardíaca descelularizada (3374 ± 184.1 N=6), em comparação ao Matrigel® (2923 ± 192.9 N=6) (Figura 24), porém sem diferença significativa.

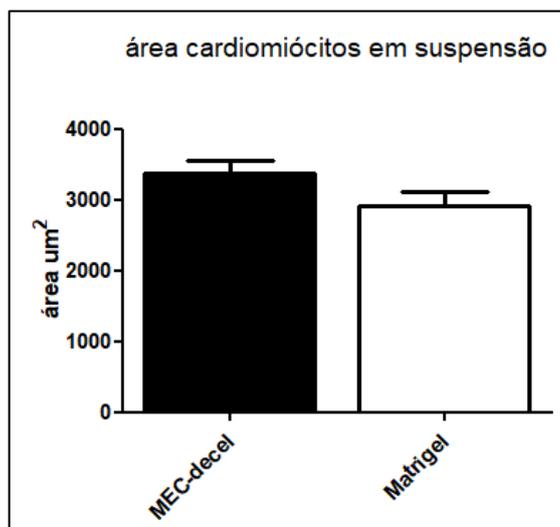


Figura 24: Área contrátil de agregados de cardiomiócitos em cultivo em suspensão. Células ressuspendidas derivadas de cultivo bidimensional em MEC descelularizada cardíaca e em Matrigel.

Imagens de microscopia confocal evidenciaram nas amostras marcadas para imunofluorescência específica para marcadores cardíacos, a expressão de troponina cardíaca T nos cultivos em suspensão. A expressão positiva de cTnT em cultivos de cardiomiócitos em condições bi- e tridimensionais utilizando como subestrato a MEC descelularizada cardíaca comprova a capacidade desta plataforma de cultivo manter a viabilidade e o status diferenciado dos cardiomiócitos, tanto no ambiente 2D como em suspensão (Figura 25).

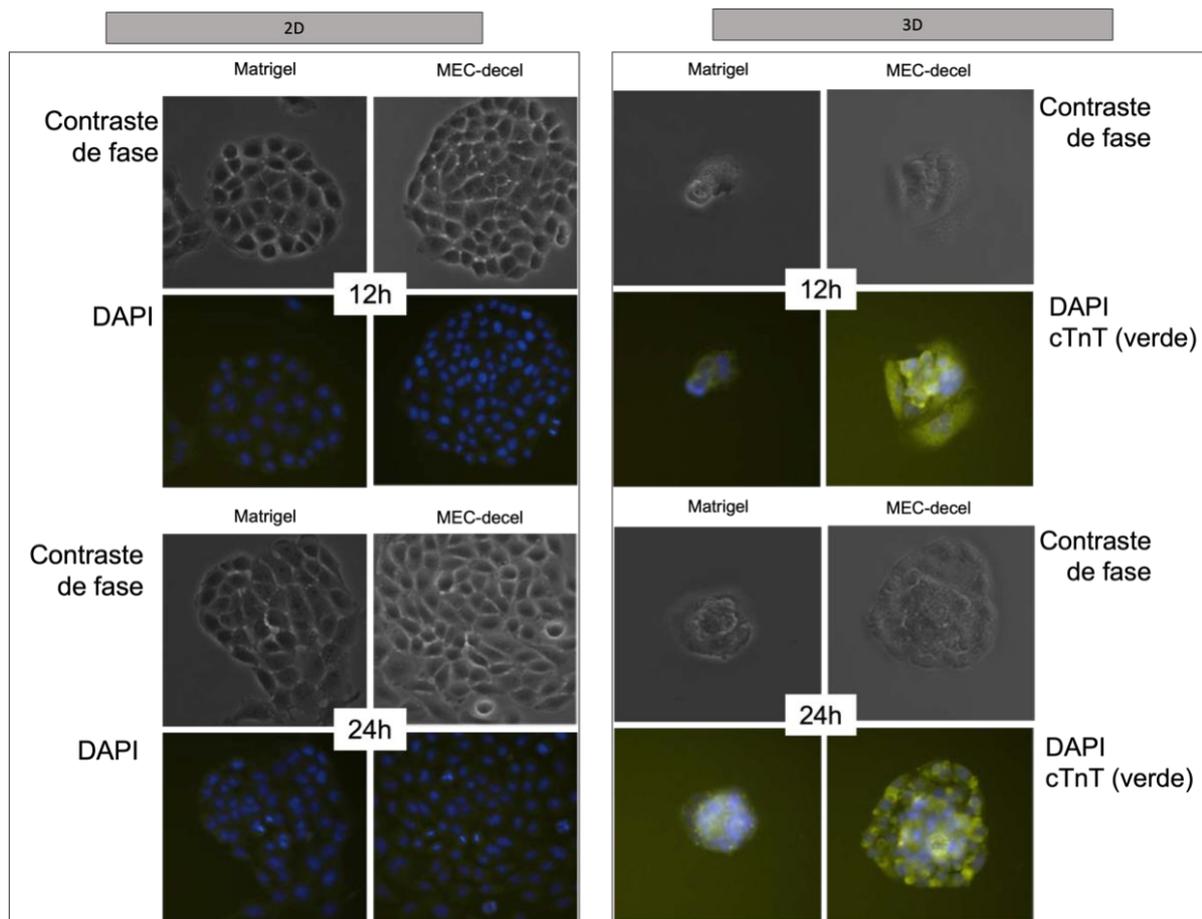


Figura 25: Imagens microscópicas de cultivos utilizando Matrigel® e MEC descelularizada cardíaca nas condições bidimensional (2D) e em suspensão (3D), 40x. A imagem foi adquirida em contraste de fase e fluorescência. As imagens de fluorescência mostram marcação imunofluorescente para DAPI evidenciando núcleo celular, e a expressão de cTnT, em verde, marcação específica para células cardíacas, demonstrando a manutenção do status diferenciado de cardiomiócitos.

4.4. DISCUSSÃO

Hidrogéis derivados da MEC descelularizada, assim como o substrato para revestimento de cultivo bidimensional, deste estudo possibilitaram gerar um ambiente de crescimento e proliferação celular, mantendo as células cultivadas viáveis. Além disso, promoveu-se a diferenciação de células tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos.

A alta incidência de doenças cardíacas mundialmente, especialmente o infarto agudo do miocárdio, demandam uma grande oferta de órgãos para transplante uma vez que atinge o ponto de insuficiência cardíaca (WANG *et al*, 2021). Realizar estudos em engenharia tecidual é uma promissora abordagem para o estudo de doenças cardíacas, criando modelos para o estudo de potenciais terapias, testes toxicológicos e alternativas à experimentação animal utilizando modelos provenientes do uso de células derivadas de pacientes humanos, criando assim modelos mais específicos e precisos (BROUGHTON; SUSSMAN, 2020).

É de conhecimento que a utilização de substrato descelularizado nativo, derivado da matriz extracelular, promove melhores características para as células, podendo mimetizar o microambiente tecidual do órgão em questão (SVYSTONYUK *et al*, 2020; BEJLERI; DAVIS, 2019; PORZIONATO *et al*, 2018). A utilização destes construtos utilizando a matriz extracelular descelularizada cardíaca possibilitam a alteração de suas características biomecânicas, mantendo a composição protéica da MEC e seus fatores de sinalização (NIZAMOGLU *et al*, 2022). Quando recelularizados com as células tecido-específicas, os construtos derivados da MEC descelularizada proporcionam uma escolha ideal para regenerar aspectos funcionais de órgãos ou tecidos, aproveitando-se das características macro- e microestruturais e biomoleculares da MEC (WHITEHEAD *et al*, 2022).

Os resultados apresentados demonstraram o potencial da MEC cardíaca descelularizada para a manutenção, promoção da diferenciação e expansão bi- e tridimensional de cardiomiócitos derivados de IPSC. O cultivo 2D e 3D utilizando o substrato de matriz extracelular descelularizada cardíaca é capaz de dar suporte às células de maneira semelhante ou melhor em comparação às opções comerciais convencionais utilizadas em pesquisa pré-clínica e clínica, sem alterar a capacidade

das células em manterem sua viabilidade ou suas características fenotípicas (YI *et al*, 2017).

Além da vantagem em proporcionar ao cultivo as características da MEC específicas cardíacas, a utilização de substratos de MEC descelularizada cardíaca na forma de pré-geis para cultivo bidimensional ou hidrogéis tridimensionais, é sua atribuição em diferentes plataformas de cultivo, estáticas, dinâmicas ou podendo ser em suspensão para futuro cultivo em larga escala (BROWN *et al*, 2022).

O pré-gel formulado neste trabalho, derivado da MEC descelularizada cardíaca, pôde ser utilizado para o revestimento de placas de cultivo bidimensionais e para a elaboração de hidrogéis para o cultivo tridimensional. Em ambas as condições o biomaterial se manteve estável. Estas características fazem com que seja possível uma adaptação de cultivo para diferentes opções de pesquisa e aplicação em bioengenharia e medicina regenerativa (GOLDFRACHT *et al*, 2019; FREYTES *et al*, 2014).

Possibilitar um ambiente de cultivo celular em que se viabilize o crescimento e proliferação de células IPSC favorece a criação de modelos de doença personalizáveis e paciente-específicas. A utilização da MEC estimula, além da diferenciação de IPSC em cardiomiócitos, à sua efetiva maturação (FREYTES *et al*, 2014). A utilização de células tronco, em especial a utilização de células tronco induzidas pluripotentes abre grande espaço na pesquisa em medicina regenerativa cardíaca, sendo essencial os estudos de diferentes tipos de cultivo e de diferenciação de células tronco em cardiomiócitos, de modo a explorar opções de criação de plataformas de estudos *in vitro* de doença (GOLDFRACHT *et al*, 2019).

Os hidrogéis se mostraram uma opção prática devido à suas características de modelagem e aplicação de diferentes tipos de células, pois permitiu que as mesmas fossem simplesmente misturadas com a solução pré-gel ou cultivadas no topo da estrutura do hidrogel já formulado. Isto abre caminho para futuras aplicações como a injeção direta da associação MEC-cardiomiócitos derivados de IPSC no próprio músculo cardíaco, visando sua regeneração. Apesar de ideal e promissora, a injeção de hidrogéis contendo cardiomiócitos visando a regeneração do tecido cardíaco ainda

é uma técnica que apresenta diversas limitações, requerendo ainda muitos esforços até atingir sua aplicação em cenários clínicos (SHARMA *et al*, 2021).

Com o desenvolvimento de cultivos bi- e tridimensionais de cardiomiócitos derivados de IPSC é possível promover abordagens de sua utilização na bioengenharia e medicina regenerativa cardíaca (AUGUSTINE *et al*, 2021). Estudos mais aprofundados utilizando modelos *in vivo* para regeneração tecidual são necessários, avaliando o potencial promissor da utilização de substratos proveniente da MEC descclularizada cardíaca aliada a estímulos elétricos, mecânicos e a geração em larga escala de cardiomiócitos.

4.5. CONCLUSÃO

A utilização de corações suínos para descelularização possibilitou a obtenção de substrato para a geração de cultivos bidimensionais e tridimensionais, assim como foi possível o cultivo viável de células tronco pluripotentes induzidas e sua diferenciação em cardiomiócitos.

A efetiva descelularização do miocárdio suíno esquerdo resultou em matrizes extracelulares com a eficiente remoção do conteúdo celular, manutenção da sua composição protéica e passível de ser transformada em um substrato em pó de matriz extracelular descelularizada cardíaca com suas características desejáveis preservadas.

O substrato da MEC descelularizada cardíaca permitiu a geração de pré-géis e hidrogéis para o cultivo bi- e tridimensional, respectivamente, de células tronco pluripotentes induzidas.

A partir da elaboração de biomateriais com base no cultivo de IPSC nos hidrogéis, e também no pré gel em cultivo 2D, foi possível realizar a diferenciação destas células em cardiomiócitos que se mantiveram viáveis e chegaram à maturação nas diferentes condições de cultivo, apresentando contração espontânea e a mantendo de forma sustentável.

Os biomateriais funcionais derivados da MEC cardíaca descelularizada podem ser utilizados em futuras investigações em medicina regenerativa para criação de modelos de doenças mimetizando o microambiente tecidual, utilizando as células específicas do tecido nativo.

5. CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Este estudo possibilitou a elaboração de substratos de matriz extracelular descelularizada pulmonar e cardíaca, com características desejáveis preservadas.

Cultivos bi- e tridimensionais puderam ser gerados e mantidos viáveis em biomateriais funcionais derivados da matriz extracelular descelularizada de pulmão e coração.

A obtenção de diferentes cultivos bidimensionais e a criação de construtos tridimensionais que favoreceram o crescimento celular, sua proliferação e diferenciação, abrem espaço para a pesquisa com biomateriais funcionais ideais por meio da aplicação da matriz extracelular e dos processos de descelularização. Estes biomateriais podem permitir a interação com o cultivo celular e possibilitar a reprodução de condições fisiológicas do tecido em questão, características que tornam uma opção promissora para o desenvolvimento de diferentes abordagens em medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

A aplicação destas plataformas de cultivos bi- e tridimensionais são de suma importância para o avanço de terapias de reparo tecidual para órgãos e tecidos danificados, com grande potencial clínico futuro.

Estudos futuros que avaliem a biocompatibilidade de biomateriais derivados do substrato em pó da matriz extracelular *in vivo* são necessários, assim como a exploração de demais plataformas de cultivo e da implantação destes biomateriais funcionais em modelos clínicos avançados para viabilizar novas opções terapêuticas, ou ainda no desenvolvimento de modelos *in vitro* simulando o microambiente tecidual em uma larga escala, contribuindo também para a redução na utilização de modelos animais na pesquisa básica e pré-clínica.

REFERÊNCIAS

AMIRRAH, I. N. et al. A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from biosynthesis to bioscaffold. **Biomedicines**, v.10, n. 9, p. 2307, 2022.

AUGUSTINE, R.S. et al. Stem cell-based approaches in cardiac tissue engineering: controlling the microenvironment for autologous cells. *Biomedicine & pharmacotherapy*. **Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 138, 2021.

BADYLAK, S. F.; FREYTES, D.O.; GILBERT, T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**; v. 5, p. 1–13, 2009.

BALAKRISHNAN-NAIR, D. K. et al. An immunopathological evaluation of the porcine cholecyst matrix as a muscle repair graft in a male rat abdominal wall defect model. **Toxicologic pathology**, v. 46, n.2, p.169–183, 2019.

BANDZEREWICZ, A.; GADOMSKA-GAJADHUR, A. Into the tissues: extracellular matrix and its artificial substitutes: cell signalling mechanisms. **Cells**, v. 11, p. 914, 2022.

BEJLERI, D.; DAVIS, M. E. Decellularized extracellular matrix materials for cardiac repair and regeneration. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 5, 2019.

BHARAT, A. et al. Lung transplantation for patients with severe COVID-19. **Science translational medicine**, v. 12, p.574, 2020.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, n.12, 2014.

BROUGHTON, K. M.; SUSSMAN, M. A. Cardiac tissue engineering therapeutic products to enhance myocardial contractility. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 41, n. 4, p. 363–373, 2020

BROWN, M. et al. Decellularized extracellular matrix: New promising and challenging biomaterials for regenerative medicine. **Biomaterials**, v. 289, 2022

BUSCH, S. M.; LORENZANA, Z.; RYAN, A.L. Implications for extracellular matrix interactions with human lung basal stem cells in lung development, disease, and airway modeling. **Frontiers Pharmacology**, v. 12, 2021.

CHANDA, D. et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 65, p56-69, 2019.

CHEN, X.; ZHU, L.; WANG, X.; XIAO, J. Insight into heart-tailored architectures of hydrogel to restore cardiac functions after myocardial infarction. **Molecular pharmaceutics**, 2022.

- CHIEN, K.R.; DOMIAN, I.J.; PARKER, K.K. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. **Science** v. 322, p. 1494–1497, 2008
- CORTIELLA, J. et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. **Tissue engineering Part A**. v. 16, n. 8, 2010.
- COSTA, A.; NARANJO, J.D.; LONDONO, R.; BADYLAK, S.F. Biologic Scaffolds, **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**. v.7, 2017.
- 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, 2011
- DA FONSECA, L. M. C. et al. Emphysema induced by elastase enhances acute inflammatory pulmonary response to intraperitoneal LPS in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, p. 430-437, 2017.
- DUFFY, S. P.; CRINER, G. J. Chronic obstructive pulmonary disease: evaluation and management. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n.3, p. 453-461 2019.
- ESFAHANI, A., et al. Tissue regeneration from mechanical stretching of cell-cell adhesion. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 25, n. 11, p. 631–640, 2019.
- FLEISCHER, S.; SHAPIRA, A.; FEINER, R.; DVIR, T. Modular assembly of thick multifunctional cardiac patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**., v. 114, p.1898–1903, 2017.
- FRANGOGIANNIS, N. G. Cardiac fibrosis. **Cardiovascular research**, v.117, n.6, 2021.
- FRANTZ, C., STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v.123, p. 4195–4200, 2010.
- FREYTES, D. O. et al. Natural cardiac extracellular matrix hydrogels for cultivation of human stem cell-derived cardiomyocytes. **Methods in molecular biology**, v. 1181, p. 69–81. 2014
- FREYTES, D.O. et al. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. **Biomaterials**, v. 29, p. 1630–1637, 2008
- FUJITA, B.; ZIMMERMANN, W. H. Myocardial tissue engineering for regenerative applications. **Current cardiology reports**, v. 19, n.9, p. 78, 2017
- FUSTER, V. Global burden of cardiovascular disease: time to implement feasible strategies and to monitor results. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, p. 520–22, 2014.
- GILBERT, T.W. et al. Repair of the thoracic wall with an extracellular matrix scaffold in a canine model. **Journal of Surgical Research**, v.147, p. 61–67, 2008.
- GILBERT, T.W.; SELLARO, T.L.; BADYLAK, S.F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v.27, p. 3675–3683, 2008.

- GOLDFRACHT, I. et al. Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. **Acta biomaterialia**, v.92, p.145–159, 2019.
- GUYETTE, J. P. et al. Perfusion decellularization of whole organs. **Nature Protocols**, v.9, n.6, p.1451-68, 2014.
- HACKETT, T.L.; OSEI, E.T. Modeling extracellular matrix-cell interactions in lung repair and chronic disease. **Cells**, v.10, n.8, p. 2145, 2021.
- HAEUBLEIN, G. et al. Human endothelial cell seeding in partially decellularized kidneys. **BioMed research international**, 2022.
- HANTOS Z, ET al. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **Journal of applied physiology** 2008; 98: 503-511.
- HUANG, X. et al. Origin of critical nature and stability enhancement in collagen matrix based biomaterials: Comprehensive modification technologies. **International journal of biological macromolecules**, v. 216, p. 741–756, 2022.
- HUANG, Y, et al. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. **Biotechnology journal**, v.12, n.8, 2017
- INGBER, D. E. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. **The International journal of developmental biology**, v.50, n. 2-3, p. 255–266, 2006.
- JANA, S.; LERMAN, A. Bioprinting a cardiac valve. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1503–1521, 2015.
- JAWARD, H.; LYON, A.R.; HARDING, S.E.; ALI, N.N.; BOCCACCINI, A. R. Myocardial tissue engineering. **British Medical Bulletin**, v. 87, p. 31-47, 2008.
- JENSEN, T. et al. A rapid lung decellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation. **Tissue Engineering, Part C Methods**, v.18, p. 632–646, 2012.
- KARAMANOS, N. K. et al. Extracellular matrix-based cancer targeting. **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, p.1000–1013, 2021.
- KWON, J. S. et al. Injectable extracellular matrix hydrogel developed using porcine articular cartilage. **International Journal of Pharmacology**, v.454, p. 183–191, 2013.
- KYRIAKOPOULOU, K.; PIPERIGKOU, Z.; TZAFERI, K.; KARAMANOS, N. K. Trends in extracellular matrix biology. **Molecular biology reports**, 2022.
- LI, L.; ZHAO, Q.; KONG, W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. **Matrix Biology**. v.68, n.69, p. 490-506, 2018

LIAN, X. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. **Nature Protocols**, v. 8, p. 162–175, 2013.

LINK, P.A. et al. Tunable hydrogels from pulmonary extracellular matrix for 3d cell culture. **Journal of Visualizes Experiments**, v. 17, n. 119, 2017.

LOPEZ, A. D. et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. **The European respiratory journal**, v. 27, n. 2, p.397-412, 2006.

MACCHIARINI, P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **Lancet**, v. 372, p. 2023-30, 2008

MANDRYCKY, C.; WANG, Z.; KIM, K.; KIM, D. H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. **Biotechnology Advances**. v. 34, p. 422–434, 2016.

MARCOS, J. V. et al. Quantitative assessment of emphysema severity in histological lung analysis. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, p. 2515, 2015

MEDBERRY, C. J. et al. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. **Biomaterials**, v.34, p. 1033–1040, 2013

MELO, E. et al. Effects of the decellularization method on the local stiffness of acellular lungs. **Tissue Engineering Part C Methods**, v. 20, n. 5, p. 412-22, 2014.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control, **Geneva** : World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, v. 154, 2011.

MENEZES, R. et al. Biomaterials and tissue engineering approaches using glycosaminoglycans for tissue repair: lessons learned from the native extracellular matrix. **Acta biomaterialia**, 2022.

MENSAH, G. A.; ROTH, G. A.; FUSTER, V. The global burden of cardiovascular diseases and risk factors: 2020 and beyond. **Journal of the American College of Cardiology**, v.74, n. 20, p. 2529–2532. 2019.

MIYAMOTO, K. et al. Direct in vivo reprogramming with sendai virus vectors improves cardiac function after myocardial infarction, **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 1, p. 91–103, 2018.

MOHGAN, R. et al. Emerging Paradigms in Bioengineering the Lungs. **Bioengineering**, v. 9, n.5, p. 195, 2022.

NICHOLLS, D.L.; ROSTAMI, S.; KAROUBI, G.; HAYKAL, S. Perfusion decellularization for vascularized composite allotransplantation. **SAGE Open Med**. 2022.

NICHOLS JE, et al. Design and development of tissue engineered lung: Progress and challenges. **Organogenesis**, v. 5, p. 57-61, 2009.

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

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

PARK, H. J. et al. Static and dynamic biomaterial engineering for cell modulation. **Nanomaterials**,v.12, n.8, p. 1377, 2022.

PERESTRELO, A. R. et al. Multiscale analysis of extracellular matrix remodeling in the failing heart. **Circulation Research**, v.128, n.1, p. 24-38, 2021.

PETERSEN, T. H. et al. Tissue engineered lungs for in vivo implantation. **Science**, v.329, n. 5991, p.538- 41, 2010.

POLONCHUK, L.; GENTILE, C. Current state and future of 3D bioprinted models for cardiovascular research and drug development. **ADMET & DMPK**, v.9, n.4, p. 231–242, 2021.

PORZIONATO, A. et al. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 4117, 2018.

POULIOT, R. A. et al. Development and characterization of a naturally derived extracellular matrix hydrogel. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 104, n.8, p. 1922-1935, 2016.

PRICE, A. P. et al. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. **Tissue engineering Part A**. v. 16, n.8, p. 2581-91, 2010.

RUPAL, J. S.; ROBERT, M. K. Lung transplantation for obstructive lung diseases. **Seminars in Respiratory Critical Care Medicine**. v. 34, n.3, p. 288-296, 2013.

SANTOS, L. M. O. et al. Bronchial responsiveness in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 194, p. 9-14, 2014.

SCHÉELE, S. et al, Laminin isoforms in development and disease. **Journal of molecular medicine**, v. 85, n.8, p. 825–836, 2007.

SHAKIR, S.; HACKETT, T. L.; MOSTAÇO-GUIDOLIN, L. B. Bioengineering lungs: An overview of current methods, requirements, and challenges for constructing scaffolds. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, 2022.

SHARMA, V. et al. Recent advances in cardiac tissue engineering for the management of myocardium infarction. **Cells**, v.10, n.10, p. 2538, 2021.

SHIMIZU, T. et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. **Circulation Research**. v. 90, 2022.

SINGELYN, J. M. et al. Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, p. 751-763, 2012.

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.

SOMUNCU Ö. S. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1212, p. 71–85, 2020.

SVYSTONYUK, D. A. et al. Acellular bioscaffolds redirect cardiac fibroblasts and promote functional tissue repair in rodents and humans with myocardial injury. **Scientific reports**, v.10, n.1, p. 9459, 2020.

TAKAHASHI, K. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors: Commentary, **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 63, n.3, 2008.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors., **Cell**,v. 126, n.4, p. 663–76, 2006.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

URIARTE, J. J. et al. Lung bioengineering: advances and challenges in lung decellularization and recellularization. **Current Opinion in Organ Transplantation** v. 23, n. 6, p. 673–678, 2018.

WANG, Z. et al. 3D bioprinting in cardiac tissue engineering. **Theranostics**, v.11, n.16, p. 7948-7969, 2021.

WHITEHEAD, K. M.; HENDRICKS, H. K. L.; CAKIR, S. N.; DE CASTRO BRÁS, L. E. ECM roles and biomechanics in cardiac tissue decellularization. *American journal of physiology*. **Heart and circulatory physiology**, v. 323, n. 3, p. 585–596, 2022.

YI, S.; DING, F.; GONG, L.; GU, X. (2017). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Current stem cell research & therapy**, v.12, n. 3, p. 233–246.

ZHOU, Y. et al Extracellular matrix in lung development, homeostasis and disease. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 73, p. 77–104, 2019.

ZIMMERMANN, W.H. et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. **Circulation Research**, v. 90, p. 223–230, 2002.

ZOLLINGER, A. J.; SMITH, M. L. Fibronectin, the extracellular glue. **Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 60-61, p. 27–37, 2017.

ANEXO A



P-CMR[C]

Dr. Marcelo Bahia Labruna
 Coordinator, Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA)
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
 Universidade de São Paulo

October 5, 2020

Dear Dr. Marcelo Bahia Labruna,

In reference to the use of human pluripotent stem cells for the project registered nº 4349120520 at the CEUA-FMVZ of the University of São Paulo, by the PhD student Andressa Daronco Cereta (NUSP: 10164555),

I hereby declare that the use of human induced pluripotent stem cells in my laboratory at the Regenerative Medicine Program of the Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), for research activities in the context of "*Bioengineering approaches to cardiac regeneration/repair*" has been approved by the Department of Health of the Government of Catalonia (authorization of 28/11/2012), after positive review by the Ethics Committee on Clinical Research (CEIC) of the Center for Regenerative Medicine in Barcelona (CMRB) (review of 12/07/2012) and positive evaluation by the Commission on Guarantees concerning the Donation and Use of Human Tissues and Cells of the Carlos III Health Research Institute (evaluation of 26/11/2012).

Yours sincerely,

Angel Raya, MD, PhD
 ICREA Research Professor
 Coordinator,
 Regenerative Medicine Program,
 Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)
 Director,
 Program for Clinical Translation of Regenerative Medicine in Catalonia (P-CMR[C])

RAYA CHAMORRO
 ANGEL -
 29157851S

Digitally signed by RAYA
 CHAMORRO ANGEL -
 29157851S
 Date: 2020.10.05
 16:22:05 +02'00'