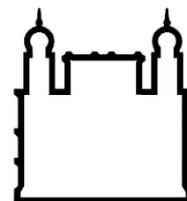




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE
UM HIDROGEL DE FIBROÍNA PARA A REGENERAÇÃO CARDÍACA**

PEDRO BRITO BORBA

Salvador – Bahia

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE
UM HIDROGEL DE FIBROÍNA PARA A REGENERAÇÃO CARDÍACA**

PEDRO BRITO BORBA

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rocha Formiga

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental para a obtenção do
grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B726s Borba, Pedro Brito.
Síntese, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de um hidrogel de
fibroína para a regeneração cardíaca. / Pedro Brito Borba. - 2019.
75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Rocha Formiga, Laboratório de Enfermidades
Infecciosas Transmitidas por Vetores.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Instituto Gonçalo
Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Biomateriais. 2. Fibroína. 3. Hidrogel. 4. Miocardio. 5. Células
Tronco. I. Título.

CDU 616.12-008.1

**"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE UM
HIDROGEL DE FIBROÍNA PARA A REGENERAÇÃO CARDÍACA".**

Pedro Brito Borba

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 29 de maio de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Simone Garcia Macambira

Dra. Simone Garcia Macambira
Professora associada
UFBA

Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes
Fullam
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Fábio Rocha Formiga

Dr. Fábio Rocha Formiga
Pesquisador
FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

AGRADECIMENTOS

É impossível olhar para trás e não desejar gratidão a todos aqueles que se fizeram presentes nessa etapa de minha vida, portanto quero agradecer primeiramente às minhas três mães: Delsulene, Delsuíte e Dalva, vocês são a inspiração e a força de vontade de sempre vencer. Agradeço também ao meu irmão Raul, ver seu esforço serve de inspiração para mim. Você vai longe.

Agradecer ao meu padrasto. Seu suporte se faz sempre presente

Aos meus amigos natalenses em especial Rayane, Ingrid e Thammy. Obrigado por todo apoio.

Agradecer aos meus amigos soteropolitanos, em especial Adermes Júnior, Filipe Rocha e Lucas Gouvea, o apoio de vocês na construção pessoal e profissional foi de grande valia.

A toda turma da fiocruz, em especial a Mariana, Ícaro, Filipe, Rafael e Lívia por terem me acolhido em um momento tão difícil como foi o início dessa trajetória.

Agradecer aos técnicos, pesquisadores, a turma do CBTC e da biblioteca. Nenhum trabalho é construído sozinho.

Agradecer ao meu orientador Dr. Fábio Rocha Formiga por ter me dado a chance de expandir meus horizontes

E por último agradecer à Deus. Obrigado por ter me ensinado que é nas maiores dificuldades que encontramos a nossa maior força. Obrigado.

Se você se render ao ar, poderá voar

Toni Morrison, 1953

BORBA, Pedro Brito. Síntese, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de um hidrogel de fibroína para a regeneração cardíaca. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Dentre as patologias do grupo, o infarto agudo do miocárdio (IAM), caracterizado pela perda de cardiomiócitos e consequente remodelamento ventricular adverso, é a manifestação clínica mais prevalente. Intervenções terapêuticas convencionais são capazes de amenizar os sintomas, mas não resultam na regeneração do tecido e, conseqüentemente, no restabelecimento da função cardíaca. Para alguns pacientes a única alternativa é o transplante, porém há limitações no número de doadores e compatibilidade. Neste sentido, novas estratégias vêm sendo investigadas com o intuito de regenerar o miocárdio lesionado, incluindo a terapia gênica, a terapia celular e a utilização de biomateriais. Esta última abordagem exerce um papel crucial na administração de células-tronco diante da necessidade de uma plataforma física que permita a viabilidade e diferenciação celular no tecido cardíaco. Biomateriais também podem promover um perfil de liberação controlado de citocinas e outras biomoléculas produzidas por estas células. Portanto, o desenvolvimento de matrizes poliméricas 3D (*scaffold*) que mimetizem a matriz extracelular e permitam a ancoragem de células representa uma importante abordagem no contexto do potencial translacional da terapia celular no IAM. **OBJETIVO:** o presente trabalho fundamenta-se no desenvolvimento de uma matriz à base de fibroína de seda como plataforma para administração de células-tronco no miocárdio infartado. **MATERIAL E MÉTODOS:** Hidrogéis injetável foram preparadas pelo método de *crosslink* químico através de um solvente orgânico (metanol) e foram submetidos à caracterização físico-química, morfologia, ensaios de citocompatibilidade *in vitro* e retenção celular em um modelo farmacológico de infarto agudo em camundongos. **RESULTADOS:** Após sintetizados e secos, os hidrogéis apresentaram a capacidade adequada de absorção de água. A análise por espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) indicou a mudança conformacional proteica, comprovando a gelificação do material. Não houve variação significativa no pH do hidrogel nas temperaturas de armazenamento avaliadas (4°C e 37°C). A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicou um arranjo tridimensional com poros, o que demonstra a arquitetura porosa na forma de *scaffold*. Este padrão espacial permitiu a adesão de fibroblastos L929, cardiomiócitos H9c2, células-tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras cardíacas induzidas (CPCi) na matrix de fibroína. Estas células também se apresentaram viáveis e proliferativas quando cultivadas em substrato plástico revestido com o hidrogel objeto deste estudo. Este material também foi avaliado quanto a sua capacidade de proporcionar retenção celular em um modelo murino de IAM. Foi possível observar CPCi no tecido cardíaco 72 horas após sua administração via intramiocárdica guiada por ecografia. Esta retenção não foi observada nos animais injetados com as CPCi na ausência do hidrogel. **CONCLUSÃO:** No contexto da pesquisa em novos biomateriais para terapia celular, este trabalho demonstra o potencial do hidrogel de fibroína como um sistema de administração capaz de otimizar a retenção de células-tronco no tecido cardíaco.

Palavras-chave: Biomateriais, fibroína, hidrogel, reparo cardíaco, retenção, células tronco.

BORBA, Pedro Brito Synthesis, characterization and evaluation of the biocompatibility of a fibroin hydrogel for cardiac regeneration. 2019. 75 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2019

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in the world. Among them, acute myocardial infarction (AMI) promotes cardiomyocytes loss and adverse ventricular remodeling. Indeed, AMI is the most prevalent clinical manifestation of CVD. Conventional therapeutic interventions are able to ameliorate the symptoms, but do not result in tissue regeneration and, consequently, in cardiac function recovery. For some patients, the only alternative for treating AMI is the myocardial transplantation, but there are limitations on the number of donors and organ compatibility. In this sense, new strategies have been investigated to regenerate the injured myocardium, including gene therapy, cell therapy and the use of biomaterials. This latter approach plays a crucial role in stem cell administration, regarding the need for a physical platform to provide cell retention. Still, biomaterials could promote a biochemical microenvironment for cell viability and cell differentiation in the cardiac tissue. As another attribute, biomaterials could provide a controlled release pattern of cytokines and other biomolecules released from transplanted stem cells. Thus, the development of three-dimensional (3D) polymer matrices (scaffolds) that mimic the extracellular matrix and allow the anchoring of cells represents an important approach in the context of the translational potential of stem cells for AMI. **OBJECTIVES:** This work seeks to develop a silk fibroin matrix as platform for administration of stem cells in the infarcted myocardium. **MATERIALS AND METHODS:** Matrices in the form of an injectable hydrogel were prepared by the chemical crosslink method through an organic solvent (methanol). Hydrogels were characterized in terms of physical-chemical properties, morphology, and *in vitro* cytocompatibility. Cell retention assays were performed in a pharmacological model of AMI in mice. **RESULTS:** Freeze-dried hydrogels presented a suitable swelling rate, reflecting a proper capacity to absorb water. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) indicated the protein conformational change, confirming the gelation of the material. There was no significant variation in the pH of the hydrogels at 4 ° C or 37 ° C. The morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM) indicated a 3D arrangement with pores, which demonstrates the porous architecture in the form of scaffold. This spatial pattern allowed the adhesion of L929 fibroblasts, H9c2 cardiomyocytes, mesenchymal stem cells (MSCs) and induced cardiac progenitor cells (iCPCs) in the fibroin matrix scaffold. These cells were also found to be viable and proliferative when cultured on a plastic substrate coated with the hydrogel. In the *in vivo* cell retention evaluation, it was possible to observe iCPCs in cardiac tissue 72 hours after its ultrasound-guided intramyocardial administration. In mice injected with iCPCs only (hydrogel-free), no cells were found to have attached in the heart tissue. **CONCLUSIONS:** In the context of biomaterial research for cell therapy, this work demonstrates the potential of the hydrogel-based fibroin scaffold as a feasible delivery system capable of optimizing the retention of stem cells in cardiac tissue.

Key word: Biomaterials, fibroin, hydrogel, cardiac repair, retention, stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quadro representativo das etapas que levam ao remodelamento negativo do coração após um quadro de infarto agudo do miocárdio. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL <i>et al.</i> , 2015.....	20
Figura 2. Representação esquemática das principais fontes utilizadas para a geração de células progenitoras cardíacas (células tronco pluripotentes e células somáticas induzidas).....	28
Figura 3. Fibroína do Bicho da seda e suas diversas nanoestruturas. Fonte: adaptado de ROCKWOOD <i>et al.</i> , 2011	32
Figura 4. Biomateriais explorados no processo de regeneração cardíaca. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL <i>et al.</i> , 2015.....	35
Figura 5. Delineamento experimental para a avaliação da capacidade de retenção celular in vivo do hidrogel de fibroína em um modelo murino de IAM.....	49
Figura 6. Aspecto visual da fibroína em sua forma líquida e após formação de hidrogéis. A: Fibroína após solubilização e posterior centrifugação.....	50
Figura 7. Espectro de infravermelho para a fibroína em seu estado não processado e após gelificação.....	51
Figura 8. Monitoramento do pH do hidrogel preparado com metanol 37,5% durante 30 dias nas temperaturas de armazenamento 4°C e 37°C.	52
Figura 9. Fotomicrografia do hidrogel de fibroína sintetizado em solução de metanol a 37,5%.	52
Figura 10. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de fibroína produzidos em diferentes soluções de metanol.	53
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis em fibroblastos L929 (A), cardiomiócitos H9c2 (B), células tronco mesenquimais (C) e células progenitoras cardíacas induzidas (D).....	54
Figura 12. Proliferação celular de diferentes linhagens aderidas sobre o hidrogel de fibroína.. ..	55
Figura 13. Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de fluorescência das células cultivadas em hidrogel de fibroína.....	56
Figura 14. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura indicando os perfis de adesão das células L929, H9c2, CTM e CPCi na matriz de fibroína após 24, 48 e 72 horas.	57

Figura 15. Retenção das células progenitoras cardíacas induzidas no coração infartado de camundongo quando administradas sem hidrogel (CPCi) e com hidrogel de fibroína (CPCIH). 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CaCl₂	Cloreto de Cálcio
C-	Controle negativo
CH₃CH₂OH	Álcool Etílico
CO₂	Gás Carbônico
CPC	Célula Progenitora Cardíaca
CPCi	Célula Progenitora Cardíaca Induzida
CTE	Células tronco embionárias
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CTP	Célula Tronco pluripotentes
CTPi	Células tronco pluripotentes induzidas
DCV	Doenças Cardiovasculares
DI	Doenças isquêmicas
ECG	Eletrocardiograma
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês Food and Drug Administration
FT-IR	do inglês Fourier Transformed Infrared
H₂O	Água
IAM	Infarto agudo do miocárdio
mL	Mililitro
m/v	Massa sobre volume
m1	Massa da cápsula seca
m2	Massa da cápsula mais massa fibroína
MEC	Matriz Extracelular
microRNAs	ARN monocatenário
PBS	Do inglês phosphate buffered saline
PCL	Cloreto de pararosanilina
PEG	Polietilenoglicol
PGO	Poli (ácido glicólico)

PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVP	Polivinilpirrolidona
SF	Solução de Fibroína
v/v	Volume por volume
VEGF	do inglês Vascular endothelial growth factor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES NO MUNDO.....	17
1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	18
1.3 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONVECIONAIS	20
1.4 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA REGENERAÇÃO E REPARO TECIDUAL – TERAPIA EMERGENTES	21
1.4.1 Terapias com fatores de crescimento.....	21
1.4.2 Terapia gênica.....	22
1.4.3 Terapia Celular.....	23
1.5 REPARO CARDÍACO E TERAPIA CELULAR.....	23
1.5.1 Mioblastos	24
1.5.2 Células Tronco Celulares Derivadas da Medula Óssea	25
1.5.3 Células Tronco Mesenquimais	25
1.5.4 Células Tronco Pluripotentes e Células Tronco Pluripotentes Induzidas	26
1.6 BIOMATERIAIS NA REGENERAÇÃO TECIDUAL	28
1.6.1 Biomateriais	29
1.6.2 Biomateriais sintéticos.....	29
1.6.3 Biomateriais naturais	30
<i>1.6.3.1 Fibroína da seda.....</i>	<i>30</i>
1.7 TIPOS DE BIOMATERIAIS	32
1.7.1 Micro e nanopartículas	33
1.7.2 Nanofibras	33
1.7.3 Hidrogéis	33
1.8 HIDROGÉIS NA TERAPIA CELULAR	35
1.9 HIDROGÉIS DE FIBROÍNA E REGENERAÇÃO CARDÍACA	37
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS	39
4. HIPÓTESE	40
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 REMOÇÃO DA SERICINA	41
5.2 SOLUBILIZAÇÃO DA FIBROÍNA	41

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SF.....	41
5.4 SÍNTESE DOS HIDROGÉIS DE FIBROÍNA	42
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	42
5.5.1 Entumescimento	42
5.5.2 Avaliação da Estabilidade.....	43
5.5.3 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FT-IR).....	43
5.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	44
5.6 AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i>	44
5.6.1 Cultivo Celular.....	44
5.6.2 Ensaio de citotoxicidade.....	45
5.6.3 Ensaios de adesão e proliferação celular	45
5.6.4 Avaliação da adesão e espalhamento celular	46
5.6.5 Avaliação da proliferação celular	47
5.6.6 Estudo de retenção celular <i>in vivo</i>.....	48
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
3. RESULTADOS	49
6.1 SÍNTESE DOS HIDROGÉIS.....	49
6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	50
6.2.1 Entumescimento	50
6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)	50
6.2.3 Avaliação da Estabilidade.....	51
6.2.4 Avaliação da microestrutura do hidrogel de fibroína.....	52
6.3.1 Avaliação da viabilidade celular	53
6.3.2 Avaliação da proliferação celular	54
6.3.3 Avaliação da adesão e espalhamento celular na matriz de fibroína	55
6.4 Avaliação da retenção celular <i>in vivo</i>	58
7. DISCUSSÃO.....	58
8. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES NO MUNDO

As doenças cardiovasculares (DCV) são enfermidades que afetam o coração e os vasos sanguíneos (OMS, 2017) e foi incluída pelas Nações Unidas, em 2011, no grupo das doenças classificadas como não comunicantes ou não transmissíveis (ROTH et al., 2017), sendo as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (OIKONOMOPOULOS; KITANI; WU, 2018). A presença de fatores de risco como – alimentação desequilibrada, inatividade física, uso de tabaco e bebida alcoólica – tem elevado o número de pacientes com a presença de placas de ateroma na parede dos vasos. Quando essas placas se tornam grandes a ponto de impedir a passagem do fluxo sanguíneo, a doença cardiovascular se estabelece, acometendo vasos que irrigam o coração e cérebro (OPAN, 2017).

A Associação Americana de Cardiologia define como uma saúde cardiovascular ideal, aquele indivíduo que além de não apresentar manifestações clínicas características de DCV, não faz uso do tabaco, mantém uma dieta saudável, normotenso, peso corporal e frequência cardíacas normais, além de níveis normais de glicose sanguínea na ausência de tratamentos farmacológicos (BENJAMIN et al., 2018).

No mundo, as DCV afetam cerca de 17,7 milhões de pessoas, compreendendo 32% de todos os óbitos (LEOPOLD; LOSCALZO, 2018). Esse impacto tende a elevar-se nas próximas décadas, podendo atingir números superiores a 23,6 milhões de afetados, como consequência da alta prevalência dos fatores de risco associados às DCV (LEOPOLD; LOSCALZO, 2018; PASCUAL-GIL et al., 2015).

Nos Estados Unidos da América (EUA), as DCV têm afetado um grande contingente populacional, sendo responsável por 1 entre 4 mortes (HILL et al., 2017). Entre os anos de 2013 e 2014, o custo direto e indireto com essas patologias foi estimado em 329,7 bilhões de dólares, causando sérios problemas econômicos, não apenas nos EUA, como também nos outros países desenvolvidos e países em desenvolvimento (BENJAMIN et al., 2018). Na Europa, as DCV matam cerca de 3,9 milhões de pessoas, sendo responsáveis por mais de 45% dos óbitos. Para estes países, os custos relacionados às DCV foram estimados em € 169 bilhões em 2006 (LEAL et al., 2006), aumentando, posteriormente, em 2010, para € 210 bilhões por ano (WILKINS et al., 2017). O Brasil segue a tendência mundial e tem nas DCV a principal causa de morte. Segundo o Ministério da Saúde, no último DATASUS publicado em 2014, 131.558 pessoas

vieram a óbito por doenças no aparelho circulatório, sendo a maioria indivíduos do sexo masculino. Na Bahia, essa taxa é de 33 óbitos a cada 100.000 habitantes (DATASUS, 2011).

Apesar da crescente elevação no número de distúrbios cardíacos, a mortalidade por doenças cardiovasculares tem diminuído drasticamente. Nos últimos 50 anos, esse declínio foi de 75%, consequência do crescente investimento em pesquisa para melhor entendimento da fisiopatologia das DCV, trazendo assim melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento (WILKINS et al., 2017).

Na classificação das DCV, o grupo das doenças isquêmicas (DI) é caracterizado pela perda de cardiomiócitos e surgimento de um tecido cicatricial (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018). Entre as manifestações das DI, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a sua forma mais grave.

1.2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

O IAM é um subconjunto das doenças coronarianas agudas, do qual faz parte a angina instável (TEICH; ARAUJO, 2011). A enfermidade tem origem no deslocamento de fragmentos de placas ateroscleróticas que, ao alcançar a circulação sanguínea, acaba por estimular agregação plaquetária e elevar o nível dos fatores de coagulação, formando assim, um trombo. Ao alcançar a artéria coronariana, termina por obstruí-la, reduzindo a reperfusão sanguínea na área e causando morte por hipóxia de cardiomiócitos (**Figura 1**) (GREAVES; GORDON, 2001).

Quando o processo isquêmico se torna prolongado, os mecanismos de morte de células parenquimatosas e cardiomiocíticas são ativados (necrose e apoptose), causando danos celulares irreversíveis. Também ocorre a liberação de espécies reativas de oxigênio e o consequente aumento do estresse oxidativo (FRANGOIANNIS, 2012), comprometendo os cardiomiócitos saudáveis, as células musculares lisas e células endoteliais. O processo de degradação da matriz extracelular (MEC) também é disparado, resultando em danos estruturais e funcionais progressivos, como afinamento da parede ventricular esquerda (BOLOOKI; ASKARI, 2010).

Nesse microambiente tecidual hostil, a natureza progressiva do IAM ocorre pela perda excessiva e continuada de cardiomiócitos e pela incapacidade de autorregeneração dessas células. Desta forma, a fim de conter esse processo destrutivo, um tecido cicatricial começa a ser formado mediante uma cascata de eventos (FRANGOIANNIS, 2014). O processo de cicatrização do miocárdio é composto de três etapas: fase inflamatória, fase reparativa e proliferativa e a fase de maturação.

A fase inflamatória caracteriza-se por uma reação rápida e intensa, que resulta em limpeza da região lesionada, através da esferocitose de restos celulares, preparando o sítio para o início da segunda fase do curso da cicatrização (FRANGOIANNIS, 2014), a fase reparativa e proliferativa. Esta etapa é marcada pela presença de moléculas envolvidas na fase de resolução da inflamação e aumento da população de fibroblastos fenotipicamente diferentes, os miofibroblastos (PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016). Esse fenótipo sintetiza proteínas da matriz extracelular (MEC), iniciando, assim, a reconstrução do tecido perdido, bem como preservando a região periférica ao infarto (M.; C.; N.G., 2010).

Essa nova MEC é marcada pela presença de proteínas chamadas de matriciais que não dão um suporte mecânico às células, mas permitem que essas se proliferem. Em seguida, as células envolvidas no reparo são desligadas e a nova MEC se torna auto ligada, dando suporte mecânico ao tecido. Essa fase é chamada de maturação e marca a última etapa da regeneração cardíaca. (FRANGOIANNIS, 2014; PRABHU; FRANGOIANNIS, 2016).

O pleno sucesso no processo de regeneração cardíaca é essencial para a cicatrização ótima e é diretamente dependente do tempo de indução e supressão das vias inflamatórias. Quando essas condições não são alcançadas, um tecido de cicatrização sem função será então formado, levando a alterações morfológicas e funcionais no coração, conhecido como remodelamento ventricular (BUJAK et al., 2012). Definido como sendo modificações moleculares, genéticas e intersticiais que tem manifestações clínicas na morfologia do coração e disfunções na sua função contrátil (COHN; FERRARI; NORMAN, 2000), o remodelamento ventricular ocorre em duas fases: uma fase precoce e uma fase tardia. Na fase precoce, que pode ocorrer de dentro de horas ou até de dias (3-4 dias) após o IAM, ocorre uma intensa atividade inflamatória com destruição MEC, levando a um afinamento e dilatação da parede ventricular e perda da forma, devido a destruição das fibras de colágeno (BHATT; AMBROSY; VELAZQUEZ, 2017). A fase tardia do remodelamento é marcada por um período adaptativo com hipertrofia compensatória dos miócitos, principal célula afetada. É compensatória e essencial pois acaba permitindo o funcionamento básico do coração, mesmo em condições

adversas. Entretanto, com a progressão do quadro haverá o aumento dos volumes sistólicos e diastólicos finais, levando o coração a necessitar de uma maior energia para ejetar tal quantidade de sangue. Essa maior necessidade energética adicionada a um pequeno aporte de oxigênio tem como consequência maior isquemia miocárdica e aumento da área infartada (BHATT; AMBROSY; VELAZQUEZ, 2017; COHN; FERRARI; SHARPE, 2000).

Com o avanço do remodelamento adverso – afinamento da parede ventricular, aumento da cavidade ventricular e dos volumes sistólicos e diastólicos – o coração sofre uma diminuição na fração de ejeção. Esse processo retroalimentado positivamente define o remodelamento ventricular adverso como sendo de natureza progressiva e irreversível e acaba por culminar em insuficiência cardíaca grave, consequência comum em pacientes que apresentam IAM (BHATT; AMBROSY; VELAZQUEZ, 2017; COHN; FERRARI; SHARPE, 2000).

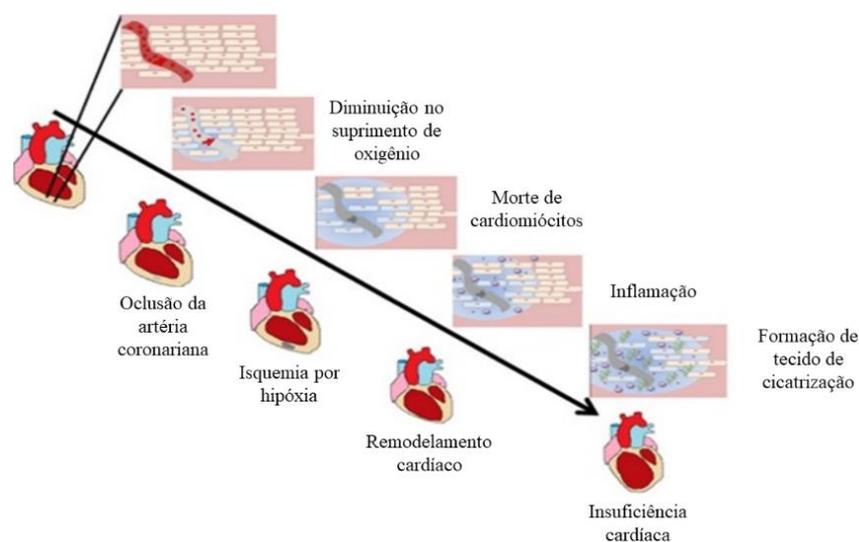


Figura 1. Quadro representativo das etapas que levam ao remodelamento negativo do coração após um quadro de infarto agudo do miocárdio. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL et al., 2015.

1.3 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONVECIONAIS

Os tratamentos para as doenças isquêmicas do coração têm focado em proteger o órgão de uma progressão para insuficiência cardíaca. Estes incluem procedimentos de revascularização, intervenção cardíaca e *bypass* cirúrgico. Contudo, a maioria dos pacientes não estão aptos a esses procedimentos, ou então conseguem uma baixa taxa de revascularização (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016).

O tratamento farmacológico baseia-se na utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina, β -bloqueadores, e fibrinolíticos, e tem como alvo o remodelamento adverso do coração. Nos casos mais graves de doença cardíaca, o transplante do miocárdio é a única opção favorável. Entretanto, esse procedimento é limitado pela escassez de doadores e problemas de compatibilidade (FORMIGA et al., 2010; HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018).

A natureza progressiva e irreversível do remodelamento negativo, aliada à baixa capacidade regenerativa do coração (REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016) tem dificultado o completo sucesso das terapias acima citadas. Conseqüentemente, a prevalência de insuficiência cardíaca tem aumentado de maneira significativa. Estima-se que em 2030 o número de indivíduos afetados será de 8 milhões ao redor do mundo, com uma taxa de mortalidade de 20% (BHATT; AMBROSY; VELAZQUEZ, 2017; MASON et al., 2015). Para mitigar esse cenário, novas terapias, chamadas de terapias emergentes – que tem como objetivo a regeneração do músculo cardíaco – vem sendo investigadas. Nesse conjunto, estão os biomateriais, os fatores de crescimento e as terapias gênica e celular (FORMIGA et al., 2010).

1.4 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA REGENERAÇÃO E REPARO TECIDUAL – TERAPIA EMERGENTES

A medicina regenerativa está centrada em intervenções clínicas que envolvem a restauração de um tecido, o tornando funcional após dano físico, utilizando-se de três abordagens: terapia com fatores pró-angiogênicos, a terapia gênica e a terapia celular (TOH; LOH, 2015).

1.4.1 Terapias com fatores de crescimento

Conhecidas como biomoléculas que influenciam em múltiplos processos celulares, os fatores de crescimento vêm sendo estudados tanto em ensaios pré-clínicos, quanto clínicos, devido sua capacidade de promover mecanismos de regeneração do músculo cardíaco (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018; REBOUÇAS; SANTOS-MAGALHÃES; FORMIGA, 2016). Suas ações diretas sobre o músculo cardíaco têm despertado interesse quanto ao uso desses fatores, pois podem proporcionar a ativação de mecanismos reparadores

(J.J. et al., 1998), além de promover um efeito protetor sobre o músculo cardíaco (NAKAMURA et al., 2000).

Uma gama de fatores de crescimento e citocinas tem demonstrado importantes ações na terapia celular. Estudos mostram que os efeitos do transplante de células tronco mesenquimais não apenas está associado à diferenciação dessas células na região lesionada, como também à secreção de VEGF. Esse fator é responsável por promover angiogênese e migração de células voltadas para a regeneração cardíaca (AMADO et al., 2005). Quando modificadas geneticamente para expressar o fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF), foram capazes de levar a um efeito imunomodulatório, diminuindo o processo inflamatório gerado na cardiopatia da doença de Chagas (SILVA et al., 2018).

1.4.2 Terapia gênica

A capacidade de alterar a expressão gênica em células somáticas através da inserção de genes surgiu com a promessa de ser uma excelente ferramenta terapêutica, uma vez que, a modificação gerada pela inclusão gênica tem o potencial de modificar especificamente os mecanismos da doença (GONÇALVES; PAIVA, 2017). Para o êxito da terapia gênica, elementos essenciais são necessários: a escolha de um gene apropriado e um sistema que o empacote e o entregue de forma eficaz e em quantidade suficiente para atingir as células do sítio alvo (MASON et al., 2015).

Moléculas formadas por ácidos nucleicos além de instáveis não transpassam a membrana plasmática com facilidade, necessitando, assim, de carreadores que facilitem esse transporte. Vetores virais e não virais têm sido utilizados no transporte dessas moléculas. Entretanto, limitações relacionadas com a baixa eficiência, toxicidade, imunogenicidade e a falta de especificidade restringem o uso da terapia gênica (JIANG; VADER; SCHIFFELERS, 2017). Uma vez no interior das células, o material genético inserido deve ser capaz de alterar a expressão de proteínas e passar essa informação para as próximas gerações de células, garantindo a condição de saúde (NALDINI, 2015).

No que se refere a utilização da terapia gênica para propiciar a regeneração tecidual, as estratégias utilizadas estão direcionadas a proporcionar aos cardiomiócitos sua reentrada em ciclo celular, permitindo sua proliferação e posterior repovoamento celular (ALAM et al.,

2019). Outros efeitos incluem a inibição de apoptose durante a fase inflamatória do IAM (PLEGER et al., 2007), a restauração do fluxo sanguíneo, angiogênese (TAIMEH et al., 2013), etc.

1.4.3 Terapia Celular

A terapia celular baseia-se na utilização de células com capacidade de autorrenovação e de diferenciação em diversas categorias funcionais. Com efeito, a pesquisa com células tronco abre novas oportunidades terapêuticas para pacientes com disfunções autoimunes, oftalmológicas, renais, esqueléticas, neurológicas e cardiovasculares (FORBES; ROSENTHAL, 2014; MOUNT et al., 2015).

Além das células progenitoras e primárias, estudos mais recentes identificaram as células tronco pluripotentes induzidas, que podem ser administradas localmente, ou através de via intravenosa (BUZHOR et al., 2014). A depender da fonte de células, esse transplante pode ser autólogo – quando doador e receptor for o mesmo indivíduo – ou alogênico, quando receptor e doador são diferentes (MOUNT et al., 2015).

As células tronco podem promover o reparo cardíaco por diferentes mecanismos de ação. Um primeiro e indireto, que se deve a capacidade parácrina dessas células em secretar no microambiente moléculas biologicamente ativas, (GORADEL et al., 2018), como os fatores de crescimento que vão recrutar e ativar células (HATZISTERGOS et al., 2010), aumentando a atividade protetora (NAKAMURA et al., 2000), reparativa e regenerativa (J.J. et al., 1998).

Um segundo mecanismo de reparo mais direto é a substituição do tecido lesionado pelas células enxertadas após sua diferenciação em linhagens cardíacas (SHIM et al., 2004), repovoando o órgão e diminuindo a formação de um tecido fibrótico não funcional. Contudo, estudos controversos quanto a esse mecanismo tem surgido (BALSAM et al., 2004), tornando a capacidade parácrina dessas células o principal mecanismo associado aos benefícios do transplante de células tronco para regeneração cardíaca.

1.5 REPARO CARDÍACO E TERAPIA CELULAR

Estima-se que o IAM leva a depleção de aproximadamente 1 bilhão de cardiomiócitos, sendo 25% dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (LIN; PU, 2014; MURRY; REINECKE; PABON, 2006). Apesar de quiescente, as células cardíacas adultas apresentam uma pequena taxa mitótica. Estudos mostraram que essa taxa de renovação das células cardíacas era de 0,76% em coração de jovens adultos e quando lesionado, essa taxa aumentava cerca de 4 vezes. Porém, devido o quadro de IAM levar a perda de uma extensa quantidade de cardiomiócitos, essa renovação não é suficiente para manter o coração funcional (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018; LIN; PU, 2014).

A terapia celular, no contexto do reparo cardíaco, vem surgindo como uma poderosa fonte para aumentar a qualidade e expectativa de vida daqueles pacientes com quadros avançados de remodelamento cardíaco adverso causado pela perda excessiva de cardiomiócitos, prevenindo assim seu principal desfecho, a insuficiência cardíaca. Quando transplantadas no coração, as células tronco podem reparar o músculo cardíaco perdido através de diversas formas: pelo seu repovoamento direto, como também por efeitos parácrinos (LALIT et al., 2014). Algumas células que merecem destaque na área do reparo cardíaco serão abordadas adiante.

1.5.1 Mioblastos

Na terapia celular, a primeira geração de células estudadas foi o mioblasto esquelético, célula precursora presente no coração, que permanece em estado adormecido e são ativadas quando há lesão do músculo cardíaco (SOUZA et al., 2011). Estudos experimentais realizados com enxertos celulares de mioblastos esqueléticos mostraram que elas foram capazes de se diferenciar em linhagens miogênicas (miotubos), promovendo aumento da eficiência ventricular (AL ATTAR et al., 2003), mesmo após diminuição no número de células.

Por outro lado, os resultados de ensaios clínicos não corroboram aqueles encontrados em estudos experimentais (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018). Não foi possível observar nenhum aumento de função cardíaca significativa nos pacientes que receberam enxertos de mioblastos, apenas uma redução no volume ventricular esquerdo, porém, apenas nos pacientes que receberam uma quantidade maior de células (MENASCHÉ et al., 2008).

1.5.2 Células Tronco Celulares Derivadas da Medula Óssea

Diante da ausência de efeitos positivos associados ao transplante dos mioblastos esqueléticos, experimentos com transplante de células mononucleares derivadas da medula óssea têm sido realizados (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018). Um primeiro tipo foram as células tronco hematopoiéticas derivadas desse tecido, que apesar de inicialmente parecerem uma promissora fonte de células tronco para a regeneração cardíaca, falharam em se diferenciar em cardiomiócitos. Não foi observado um aumento na função cardíaca, levando a respostas inconclusivas frente a utilização dessa fonte celular (MURRY et al., 2004).

Por sua vez, as células progenitoras endoteliais tiveram suas características testadas frente a sua capacidade regenerativa (PERIN; SILVA, 2004). Quando isoladas e enxertadas em modelos experimentais, essas células apresentaram a capacidade de formar novos vasos sanguíneos, participando de vias de angiogênese e neovascularização (MURAYAMA et al., 2002). Essas células também foram capazes de secretar moléculas de estímulo endógeno, arquitetando um ambiente favorável ao processo de regeneração cardíaca (KUPATT et al., 2005).

Ensaio clínico de fase I foram realizados utilizando células tronco derivadas da medula óssea, com resultados controversos entre diferentes estudos. Os ensaios REPAIR-AMI e BOOST apresentaram resultados positivos frente ao transplante dessas células (ERBS et al., 2007; MEYER et al., 2006). Contudo, não coincidem com resultados de estudos mais robustos que não conseguiram visualizar melhora na função cardíaca de pacientes submetidos aos transplante de células quando comparado a um grupo placebo (TRAVERSE et al., 2012).

1.5.3 Células Tronco Mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTM), extraídas de tecidos humanos como o adiposo e medula óssea, possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares especializados: adipócitos, condrócitos, hepatócitos, osteoblastos, neurônios e células musculares esqueléticas. Devido seu poder de auto renovação, diferenciação e baixa imunogenicidade, estudos pré-clínicos iniciais foram realizados. Um efeito negativo das CTM foi associado a regiões de calcificação e ossificação encontrados no tecido cardíaco

(BREITBACH et al., 2007; FLOREN et al., 2016; HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018; MIAO et al., 2017). Por outro lado, a partir de um entendimento da maquinaria de diferenciação das CTM, estudos mostraram células bem aderidas, funcionais e diferenciadas em células cardiomiogênicas e angiogênicas *in vivo* (MIAO et al., 2017).

Apesar de resultados divergentes, dados promissores na utilização das CTM foram reportados, o que permitiu a realização de importantes estudos clínicos de fase I. Esses incluem os ensaios POSEIDON e MSC-HF, ambos com resultados modestos sobre a melhora das funções cardíacas por mecanismos parácrinos que permitiram a regeneração do tecido cardíaco (HARE et al., 2012; MATHIASSEN et al., 2015).

1.5.4 Células Tronco Pluripotentes e Células Tronco Pluripotentes Induzidas

A nova geração de células investigadas no âmbito da terapia celular são as células tronco pluripotentes (CTP) e as células tronco pluripotentes induzidas (CTPi) (**Figura 2**). A primeira linhagem de células tronco pluripotentes utilizadas foram as células tronco embrionárias (CTE) – extraídas da fase de blastocisto – pluripotentes, com capacidade de se diferenciar em qualquer célula dos três folhetos germinativos. Quando inicialmente isoladas, essas células formaram clássicos corpos embrióides que apresentavam, dentre os vários tipos celulares, cardiomiócitos contrácteis com marcadores positivos para cardiomiócitos adultos (HARTMAN; DAI; LAFLAMME, 2016).

A capacidade de se diferenciar em cardiomiócitos funcionais deram as CTE vantagens em relação as outras células estudadas, limitadas quanto a essa capacidade (HASHIMOTO; OLSON; BASSEL-DUBY, 2018). Enxertos de células tronco embrionárias indiferenciadas injetadas em murinos mostraram a formação de teratomas no coração dos animais (NUSSBAUM et al., 2007). Mais tarde, a partir de um maior entendimento da biologia envolvida na diferenciação dessas células, novos estudos foram realizados e elevações na função cardíaca foram encontradas (PERIN; SILVA, 2004; QIAO et al., 2011).

Dois grandes problemas relacionados ao transplante dessa classe de células tronco foram identificados: a rejeição imunológica dos doadores frente a sua presença e os fatores éticos relacionados a fonte desse tipo celular (PERIN; SILVA, 2004). Yamanaka e Takahashi, a partir

de fibroblastos murinos, conseguiram gerar células com características de células tronco embrionárias, chamadas de células tronco pluripotentes induzidas (CTPi), resolvendo os problemas éticos e de rejeição. Mais tarde, Yamanaka originou CTPi a partir de células somáticas humanas, com a expressão forçada de 4 fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4), sendo, hoje, chamados de fatores de Yamanaka (TAKAHASHI et al., 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Com efeito, o pesquisador foi reconhecido com o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 2012 e abrindo uma nova era para a terapia celular, a partir da geração de um novo tipo celular com poder de diferenciação e baixa imunogenicidade.

Para que esses fatores possam transpor as células, é necessário o emprego de vetores. Os vetores prevalentes no transporte são os virais (retrovírus e lentivírus), mas a expressão nas células de constituintes virais associado aos casos de mutagênese tem alavancado pesquisas na busca de um vetor ideal ou até mesmo na transferência sem uso vetorial, porém, o uso destes carreadores ainda tem se sobressaído (LALIT et al., 2014).

A capacidade dessas células se diferenciarem em vários outros tipos celulares abriu um horizonte de oportunidades para a regeneração cardíaca, como também levaram ao melhor entendimento da fisiopatologia das doenças cardiovasculares (MAGUIRE; XIAO; XU, 2017). Estudos iniciais utilizando CTPi geradas a partir de diversas fontes levaram a tumorigênese nos animais que as receberam (MIURA et al., 2009). A partir desse ponto, os pesquisadores iniciaram a investigação com células que apresentavam um certo grau de diferenciação acima das CTPi, surgindo, assim, as células progenitoras cardíacas (CPC) (LALIT et al., 2014).

As CPC são células multipotentes que apresentam a capacidade de se diferenciar em várias células de origem cardíaca. Atualmente, tem sido uma excelente fonte para estudos de cardiologia experimental, pois em modelos animais, conseguem se diferenciar nas células envolvidas no processo de regeneração cardíaca, sendo capaz, inclusive de se integrar eletromecanicamente com as outras células do coração (LALIT et al., 2014).

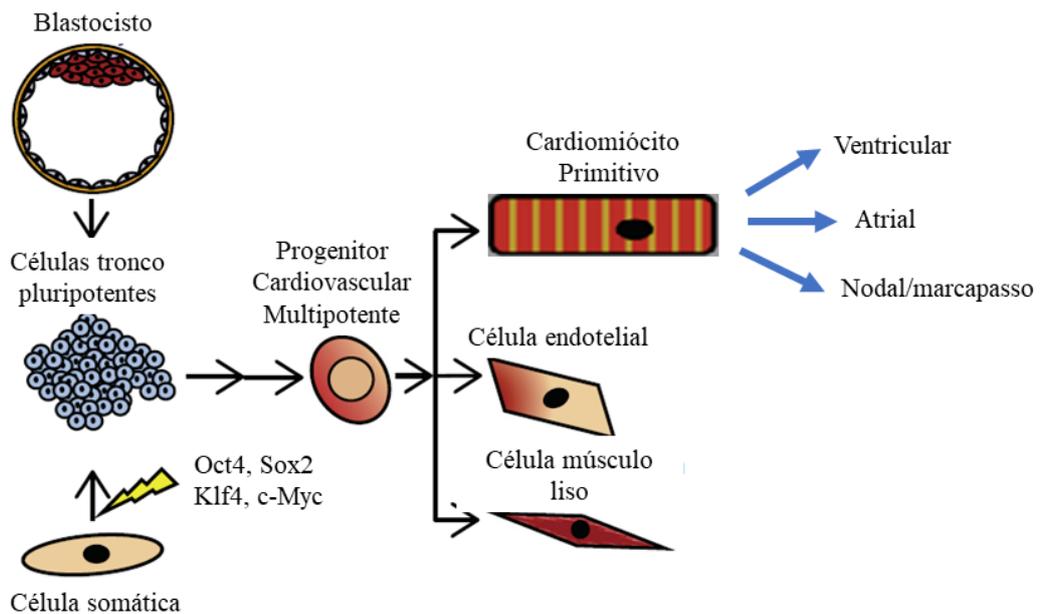


Figura 2. Representação esquemática das principais fontes utilizadas para a geração de células progenitoras cardíacas (células tronco pluripotentes e células somáticas induzidas).

Grande parte dos estudos que utilizaram a terapia celular como mecanismo de regeneração cardíaca têm falhado em obter melhorias significativas a longo prazo. Ao analisar histologicamente corações extraídos de experimentos progressos, pesquisadores observaram baixa quantidade de células retidas no músculo cardíaco após injeção intratorácica. Este achado é consequência da baixa capacidade de retenção celular proveniente da dinâmica fisiológica do órgão, como também, por morte celular em face ao ambiente hostil do coração lesado (CHENG et al., 2017; SHEIKH et al., 2007).

Como uma forma de solucionar os problemas associados à baixa retenção e morte celular, a engenharia de tecidos tem dedicado esforços para desenvolver matrizes que permitam a ancoragem de células, funcionando como uma plataforma física para as células implantadas. Adicionalmente, o microambiente bioquímico essencial para manter a viabilidade e diferenciação destas células pode ser alcançado pela liberação local e controlada de citocinas e fatores de crescimento no miocárdio infartado (CHENG et al., 2017; CHOW et al., 2017).

1.6 BIOMATERIAIS NA REGENERAÇÃO TECIDUAL

1.6.1 Biomateriais

A Sociedade Europeia para Biomateriais define estes produtos como sendo materiais que possam interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido ou órgão do corpo (PASCUAL-GIL et al., 2015). Essa interface biomaterial-tecido ocorre por intermédio dos receptores de membrana das células com a estrutura química, física e mecânica do material, características que quando alteradas tem consequência direta no funcionamento desses dispositivos (HUEBSCH; MOONEY, 2009).

Os biomateriais, no âmbito da medicina regenerativa, oferecem os seguintes atributos: (1) capacidade de encapsular células, criando um microambiente favorável ao seu desenvolvimento; (2) atuem como uma matriz que permite a ancoragem de células; (3) funcionam como sistemas de liberação e transporte para moléculas bioativas, protegendo-as da biodegradação natural do organismo. Portanto, é possível que as propriedades do biomaterial lhe forneçam a capacidade de funcionar como agente ativo no processo de regeneração (PASCUAL-GIL et al., 2015).

1.6.2 Biomateriais sintéticos

Os materiais sintéticos são maleáveis, com propriedades físicas, químicas e mecânicas que podem ser facilmente modificadas, oferecendo vantagens quanto a sua utilização para a síntese não só de hidrogéis, como também de outros biomateriais (NAAHIDI et al., 2017), acrescentando a isso a facilidade de reprodutibilidade, por apresentar características bem definidas (TOH; LOH, 2015). Em contrapartida, podem disparar reações autoimunes de rejeição, sendo, portanto, menos biocompatíveis que os naturais (NAAHIDI et al., 2017). Entre os biomateriais que recebem destaque podemos citar poli (ácido láctico) (PLA) e o poli (ácido glicólico) PGA e seus copolímeros (PLGA), como também o poli (etileno glicol) (PEG), todos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) com estudos na área de regeneração óssea, neural e na terapia celular (BATISTA et al., 2019; NACHLAS et al., 2018; ZONG et al., 2014).

1.6.3 Biomateriais naturais

Compostos a partir de produtos naturais, essa classe de biomateriais naturais tem chamado a atenção de pesquisadores quanto ao seu uso na engenharia tecidual. Diferente dos biomateriais formados a partir de produtos sintéticos, esse tipo vêm apresentando resultados favoráveis quanto a sua baixa citotoxicidade e adequada biocompatibilidade. Contudo, o fato de serem processados a partir de organismos vivos, sua complexidade estrutural e fragilidade tem dificultado a síntese de biomateriais naturais com características e propriedades homogêneas, limitando a reprodutibilidade do processo (NAAHIDI et al., 2017).

Diversos materiais naturais têm sido testados quanto a sua capacidade de formar hidrogéis e agir como matrizes para terapia celular. Neste grupo, encontra-se o colágeno, fibras naturais presentes na matriz extracelular, que tem sido largamente utilizado como arcabouço (*scaffold*) para implantes de células tronco (BOSNAKOVSKI et al., 2006). No reparo cardíaco, hidrogéis de colágeno estimulam o endereçamento de células (SHI et al., 2011), ou em blendas, adicionando características a hidrogéis já formados (BUITRAGO et al., 2018). Outro material natural, o ácido hialurônico, presente em vários tecidos humanos, é investigado como material que impede a formação de aderências após procedimento cirúrgico. Também tem sido investigado na regeneração óssea, regeneração de tecidos neurais, como molécula bioativa, entre outras (COLLINS; BIRKINSHAW, 2013).

Além das fontes naturais presentes no corpo humano, outras fontes podem ser utilizadas como insumos para a síntese de biomateriais, como a quitosana e a fibroína. A quitosana é um material extraído do exoesqueleto de crustáceos que, quando na sua forma desacetilida, apresenta propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo utilizado para a produção de nanomateriais que estão sendo utilizados para sistemas de entrega de drogas, como curativos e também na regeneração tecidual (AHMADI et al., 2015).

1.6.3.1 Fibroína da seda

A seda sintetizada a partir de células epiteliais de aracnídeos e bicho da seda são transformadas em fibras por esses animais através de reações químicas e físicas no interior das suas glândulas (CHENG et al., 2016; KIM et al., 2004). Dentre as fontes mais estudadas está o

casulo do bicho da seda, espécie *Bombyx mori*, que já é largamente utilizado para a produção de fios de sutura, como também na indústria têxtil, para a síntese de tecidos de seda (KIM et al., 2004). O casulo do bicho da seda é formado por duas estruturas: uma mais interna, chamada de fibroína, e uma mais externa, solúvel em água, que une as fibras de fibroína, chamada de sericina (INOUE et al., 2000; KASOJU et al., 2016; KASOJU; BORA, 2012).

A fibroína, que representa cerca de 70% do casulo, é composta por três regiões, uma região chamada de cadeia pesada (~350 kDa) e duas regiões moleculares mais leves: cadeia leve (~26 kDa), unida a cadeia pesada através de pontes dissulfeto e uma glicoproteína P25 (~30 kDa), somando 5507 aminoácidos (KUNDU et al., 2010; PARTLOW et al., 2016).

A natureza anfifílica da proteína se deve a presença de domínios hidrofóbicos (cadeia pesada, maior parte) e domínios hidrofílicos (cadeia leve, menor parte), no qual o domínio hidrofóbico e cristalino apresenta sequências organizadas e repetidas de aminoácidos (Gli-Ala-Gli-Ala-Ser) dispostos em conformação de β -folha enquanto a região hidrofílica de caráter amorfo apresenta aminoácidos de estrutura secundária aleatória. (KASOJU; BORA, 2012; KUNDU et al., 2013).

Essa configuração reserva a fibroína da seda características como elasticidade, força mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade, as quais são ideais para seu uso como biomaterial. A flexibilidade em alterar suas propriedades confere a fibroína uma versatilidade para formar diversas nanoestruturas, em função sua conformação proteica, se tornando rica em regiões cristalinas. Estas nanoestruturas podem ser configuradas em filmes, fibras, micro e nanopartículas e hidrogéis (**Figura 3**). Esses arranjos podem ser utilizados na engenharia tecidual como arcabouços/*scaffolds* para a regeneração de ossos, cartilagens, vasos, nervos, entre outros (FLOREN et al., 2016; KUNDU et al., 2013)



Figura 3. Fibroína do Bicho da seda e suas diversas nanoestruturas. Fonte: adaptado de ROCKWOOD et al., 2011

Na terapia celular para a regeneração cardíaca, alguns trabalhos apresentam vantagens na utilização desse biomaterial, seja como ancoradouro para células tronco, seja para encapsular fatores de crescimento (KUNDU et al., 2010) envolvidos no processo de regeneração cardíaca (FLOREN et al., 2016). Também pode agir como uma molécula bioativa, estimulando processos de regeneração endógenos (FLOREN et al., 2016).

1.7 TIPOS DE BIOMATERIAIS

Atualmente, a nanomedicina tem focado na síntese de diversos dispositivos utilizados pela medicina regenerativa, como: micro e nanopartículas, *arcabouços*, fibras e nanofibras, hidrogéis, entre outros (**Figura 4**) (KASIEWICZ; WHITEHEAD, 2017; PASCUAL-GIL et al., 2015).

1.7.1 Micro e nanopartículas

As micro e nanopartículas são biomateriais de tamanho micro e nanométrico formados a partir de biopolímeros, metais, lipídeos ou da miscelânea de diferentes compostos (KASIEWICZ; WHITEHEAD, 2017). São utilizados como dispositivos de entrega de fármacos, fatores de crescimento e reguladores gênicos (FORMIGA et al., 2014; MAIYO, 2017; TIASH; KAMARUZMAN; CHOWDHURY, 2017). Dependendo do desenho e natureza da formulação, micro e nanopartículas otimizam a biodisponibilidade dos ativos, incrementam sua atividade biológica, e reduzem sua toxicidade. Também podem exercer dupla funcionalidade (alvo terapêutico e diagnóstico), com função teranóstica. Micro e nanopartículas contendo ativos encapsulados, com propriedades físico-químicas definidas, podem ser administradas por diferentes vias. Com efeito, podem facilitar a distribuição de agentes bioativos através da microcirculação, protegendo-os dos sistemas de *clearance* (KASIEWICZ; WHITEHEAD, 2017; PASCUAL-GIL et al., 2015).

1.7.2 Nanofibras

Outro biomaterial utilizado na área de engenharia tecidual são as nanofibras, sendo estruturas porosas, formadas geralmente por processos de eletrospiação. Nestes, ocorre a geração de fibras com diâmetro variável que permite a incorporação de fármacos e/ou biomoléculas. Sua microestrutura fornece aos compostos a facilidade de se dispersarem facilmente no microambiente, interagindo com a célula, atuando, portanto, no processo de regeneração tecidual.

Além de permitir a entrega de agentes bioativos, as nanofibras, devido sua estrutura sólida, também permite a ancoragem de células, aumentando sua sobrevivência e retenção no tecido (KASIEWICZ; WHITEHEAD, 2017; PASCUAL-GIL et al., 2015).

1.7.3 Hidrogéis

Também chamados de géis hidrofílicos (AHMED, 2015), são consideradas estruturas 3D com capacidades de absorver grande quantidade de água, podendo atingir até 90% do seu peso seco. Além de funcionar como plataformas de entrega de fármacos, a malha polimérica mimetiza a matriz extracelular. Representam um grupo de biomateriais investigados desde 1960, quando lentes oculares foram criadas a partir de cross-links com poly (2-hydroxyethyl methacrylate) (NAAHIDI et al., 2017; PASCUAL-GIL et al., 2015; TOH; LOH, 2015).

De forma mais ampla, os hidrogéis são utilizados na indústria alimentícia como estruturas para embalagem de alimentos (BATISTA et al., 2019). Na agricultura (SALEEM et al., 2018), no meio ambiente (GUO et al., 2015) e na área biomédica, também tem sido utilizados como sistemas inteligentes para entrega de fármacos e células e também como curativos (AHMED, 2015).

O desenho de um hidrogel ideal requer três atributos: biocompatibilidade, biodegradação e capacidade de mimetização da matriz extracelular. Tais propriedades são totalmente dependentes das características físicas, químicas e mecânicas do material utilizado, como também da interação do biomaterial com o microambiente em que ele está inserido. Os mecanismos que envolvem a interação biomaterial-célula são capazes de modular as reações que ocorrem no interior delas, afetando seu funcionamento (NAAHIDI et al., 2017; TOH; LOH, 2015).

Idealmente, um hidrogel deveria funcionar como materiais que sequestram espécies reativas de oxigênio, fornecendo sinais para restauração do tecido lesado. Assim, forneceria um microambiente ideal para a retenção celular e teria uma taxa de degradação ideal, ficando o tempo necessário para acomodação e proliferação celular. Paralelamente, deveria apresentar tempo de biodegradação adequado para evitar o surgimento de reações de rejeição (DIMATTEO; DARLING; SEGURA, 2018).

Dentre as variáveis de um hidrogel, conhecer sua microestrutura e definir o tamanho dos poros é essencial para compreender o mecanismo de funcionamento desse biomaterial. Desta forma, a partir do arranjo desses poros as células podem se locomover e interagir com o microambiente ao redor. Também é através do grau de porosidade que moléculas como fármacos e/ou fatores de crescimento podem se difundir atingindo os pontos alvos (NAAHIDI et al., 2017).

Quando sintetizados, os hidrogéis podem ser classificados desde o material utilizado, até quanto a natureza das ligações formadas na sua geração. Quanto a natureza dos materiais

utilizados, existem os hidrogéis construídos a partir de materiais sintéticos, , materiais naturais, semi-naturais, e os hidrogéis híbridos (blendas) processados a partir de materiais sintéticos e naturais (AHMED, 2015; HASAN et al., 2015; NAAHIDI et al., 2017; TOH; LOH, 2015).

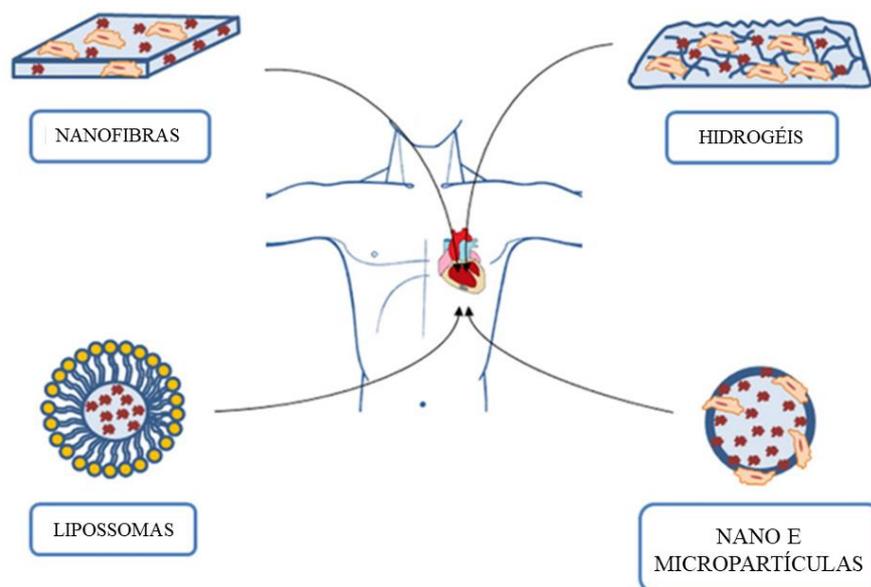


Figura 4. Biomateriais explorados no processo de regeneração cardíaca. Fonte: adaptado de PASCUAL-GIL et al., 2015.

1.8 HIDROGÉIS NA TERAPIA CELULAR

A utilização da terapia celular tem como objetivo regenerar o tecido danificado provendo células e substâncias bioativas ao microambiente. Contudo, estudos têm evidenciado que após injeção do enxerto de células no órgão lesado, estas apresentam uma baixa capacidade de retenção, distribuindo-se por todo o organismo de forma não controlada, podendo gerar tumores de alcance sistêmico, além da alta taxa de morte, o que limita seu poder terapêutico (ALINEJAD et al., 2018; JANSEN et al., 2017; SHEIKH et al., 2007).

Portanto, a utilização de uma matriz para a inserção da população de células é essencial para o sucesso da terapia celular. Nesse contexto, os hidrogéis injetáveis oferecem administração minimamente invasiva, reduzindo os danos causados pelas grandes cirurgias vasculares (BROWN et al., 2016; YIN et al., 2018).

Hidrogéis injetáveis como plataforma para adesão de células tronco apresentam grande potencial para permitir os benefícios da terapia celular no âmbito da regeneração tecidual. Wei

Sun e colaboradores sintetizaram um hidrogel formado a partir de fibroína da seda, modificado com peptídeo IKVAV e carregado com células tronco neurais. Através de experimentos de viabilidade, proliferação e diferenciação, estes autores reportaram que as células não apenas permaneceram viáveis como diferenciadas em tipos especializados de células neurais (SUN et al., 2017). Heyong Yin e colaboradores (2018) investigaram a regeneração de tendões por células progenitoras administradas em hidrogel de colágeno e diisocianato de butano. Trabalhos utilizando o transplante de células tronco derivadas de adipócitos mostraram sucesso terapêutico quando associadas a um hidrogel de ácido hialurônico metacrilado na redução de ferimentos ou prevenção de úlceras de pressão (EKE et al., 2017).

Quando se trata de regeneração cardíaca com o uso de hidrogéis, duas classes se destacam: (1) os hidrogéis não carregados com células, oferecendo suporte mecânico ao coração, como também funcionando como dispositivo para entrega de fatores de crescimento (WU et al., 2011) ou como *scaffold* bioativo (SONG et al., 2016); (2) e os hidrogéis carregados com célula, que permitem a permanência e sobrevivência das células no tecido hospedeiro (HASAN et al., 2015).

Tanto estruturas de gel hidrofílico de produtos sintéticos como naturais tem sua capacidade testada frente a capacidade regenerativa em DCV. Andre Chow e colaboradores (2017) observaram que cardiomiócitos derivados de célula tronco pluripotentes na presença de eritropoietina e aderidos em hidrogel de PEG, através de injeção intramiocárdica, melhoravam a função cardíaca do animal com aumento da massa muscular do coração. Hidrogéis produzidos através de quitosana também tiveram seus efeitos testados quanto a capacidade de reter células tronco no miocárdio infartado. Por testes *in vitro*, foi notada a diferenciação de células tronco de tecido adiposo marrom em linhagens cardíacas, e em experimentos *in vivo*, notou-se uma maior sobrevivência dessas células com diminuição do remodelamento adverso (WANG et al., 2014).

Através de análises *in vitro* e *in vivo*, hidrogéis formados a partir de quitosana e gelatina com células tronco obtidos de adipócitos mostraram que essas células, apesar de não agirem diretamente no repovoamento do coração, tem a capacidade de estimular por efeitos parácrinos a revascularização do coração a partir da secreção de fatores de crescimento, como o VEGF (CHENG et al., 2017).

1.9 HIDROGÉIS DE FIBROÍNA E REGENERAÇÃO CARDÍACA

A fibroína extraída do casulo do bicho da seda apresenta, devido ao seu domínio hidrofóbico e cristalino, a capacidade de se modificar e gerar diversos biomateriais, dentre eles, os hidrogéis de fibroína. Para a formação desses hidrogéis, algumas metodologias de reticulação são utilizadas, seja por método químicos ou físicos. Dentre os métodos químicos destaca-se a transição sol-gel a partir de álcoois orgânicos (etanol, acetona, metanol, dentre outros). Ao interagir com a cadeia de aminoácidos da região pesada da fibroína, a proteína altera sua conformação proteica para beta-folha, tornando mais estável e na forma de gel (KASOJU et al., 2016).

Hidrogéis formados pelos diversos métodos de gelificação tem em sua microestrutura a formação de poros intercomunicantes (EBRAHIMI et al., 2018; KASOJU et al., 2016), fornecendo a célula a capacidade de espalhamento e proliferação. Estudos mostram a utilização desses hidrogéis como encapsulantes de células (WANG et al., 2008), e conseqüentemente, sua utilização como arcabouço para células tronco serem injetadas em modelos de IAM, permitindo a regeneração do músculo cardíaco (FLOREN et al., 2016; YANG et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte entre homens e mulheres no mundo, entre todos os grupos raciais e étnicos (MATHERS; LONCAR, 2006), sendo o infarto agudo do miocárdio a principal manifestação das cardiomiopatias isquêmicas. A isquemia é responsável pelo dano ao músculo cardíaco, incluindo a perda de cardiomiócitos. Este processo produz um remodelamento negativo do coração, causando a substituição do tecido cardíaco com função contrátil normal por um tecido cicatrizado não funcional (GAFFNEY et al., 2007).

O tratamento do IAM inclui o uso de fármacos (antiplaquetários, anticoagulantes orais, nitratos, bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da ECA, outros), procedimentos de reperfusão e de revascularização cirúrgica e, nos casos mais complexos, o transplante de coração. Entretanto, apesar de aumentar a sobrevida do paciente, o número de casos com insuficiência cardíaca vem crescendo e a regeneração cardíaca baseada no uso de células tronco surge como uma alternativa terapêutica na restauração da função cardíaca (DUELEN; SAMPAOLESI, 2017).

Na última década houve uma crescente investigação a respeito da utilização da terapia com células tronco associado ao uso de biomateriais uma vez que estudos com enxertos ejetados no tecido cardíaco sem uma matriz de suporte não demonstraram melhora da função cardíaca, provavelmente devido à baixa retenção e viabilidade das células transplantadas (ANVERSA et al., 2013; SHENG; ZHOU; HAO, 2013). Nesse contexto, o desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis capazes de servir como matrizes para o transplante de células-tronco podem otimizar o êxito da terapia celular. No contexto da pesquisa em novos materiais para aplicações cardiovasculares, a fibroína de seda é um polímero natural com grande potencial para aplicação como biomaterial, devido à sua alta resistência mecânica, estabilidade térmica e biodegradabilidade (KASOJU; BORA, 2012).

Hidrogéis à base de fibroína representam biomateriais inovadores, mas o potencial destes materiais no âmbito da regeneração cardíaca não foi amplamente investigado. Portanto, esta dissertação encontra-se delimitada para investigar a biocompatibilidade e funcionalidade de hidrogéis à base de fibroína através de ensaios *in vitro* de citocompatibilidade e avaliação *in vivo* da capacidade desse arcabouço de reter CPCi.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Desenvolver um hidrogel de fibroína como plataforma de administração de células-tronco para regeneração cardíaca.

3.2 ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar hidrogéis de fibroína;
- Avaliar a estabilidade dos hidrogéis de fibroína produzidos;
- Investigar a biocompatibilidade *in vitro* dos hidrogéis de fibroína produzidos em cardiomiócitos, fibroblastos, células tronco mesenquimais e células progenitoras cardíacas induzidas;
- Investigar a retenção de células-tronco administradas em hidrogel de fibroína em um modelo de infarto do miocárdio em camundongos C57BL/6

4 HIPÓTESE

Hidrogéis à base de fibroína são capazes de funcionar como plataforma de administração de células-tronco, com o potencial para aumentar a retenção celular no miocárdio infartado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REMOÇÃO DA SERICINA

Vinte gramas de casulos do bicho da seda, espécie *Bombyx mori*, foram doados pelo Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), mediante colaboração. Para que seja possível obter a fibroína é necessário, inicialmente, a remoção da sericina dos casulos. Uma porção de 10 g de casulos foi adicionada a uma solução fervente 0,5% de carbonato de sódio (Na_2CO_3) por 30 minutos. Esse processo foi repetido três vezes para a retirada parcial da sericina presente no casulo (ZHANG et al., 2007). A fibroína, produto do processo de fervura, foi submetida a lavados com água destilada repetidas vezes para retirar o excesso da solução alcalina, e secada ao ar livre por cerca de 24 horas, em ambiente livre de contaminação.

5.2 SOLUBILIZAÇÃO DA FIBROÍNA

Depois de seco, o produto da fervura foi solubilizado em sistema ternário composto de cloreto de cálcio (CaCl_2) (Anidrol; PM: 110,99), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e água na proporção de 1:2:8 (proporção molar) a 80°C por 4 horas, numa relação de 10 g de fibroína para 100 mL da solução.

Por conseguinte, a solução de fibroína (SF) foi centrifugada para a remoção de agregados de fibroína, como também para resquírios do casulo original. Logo após a centrifugação, a SF foi colocada em membranas de celulose semipermeáveis (8.000 kDa) para a realização da diálise, utilizando como meio dialisador a água destilada, sendo este trocado a cada 3 horas. Esse processo foi realizado por 3 dias consecutivos para que sejam retirados os sais e etanol utilizados na solubilização, movimento que ocorre por difusão de moléculas individuais ou por movimento de fluidos. A solução de concentração foi estocada em geladeira a temperatura de 4°C .

5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SF

Para estabelecer a real concentração de fibroína presente em solução, o método de secagem foi utilizado com pequenas modificações (ROCKWOOD et al., 2011). O experimento foi realizado em triplicata. Depois de secos em estufa por 24 horas a temperatura de 100 °C, três cápsulas foram pesadas e suas massas anotadas (m1). Em seguida, 500 µL da solução de fibroína foram depositados em cada cápsula e estas levadas a estufa previamente aquecida a 60 °C. Após secos, foram transferidos para um dessecador, e em seguida, pesados (m2). Para determinar a concentração de fibroína a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Concentração de fibroína} = \frac{m2 - m1}{0,5mL} \times 100 (\%)$$

Quando calculado a concentração de fibroína é expressa em porcentagem (m/v).

5.4 SÍNTESE DOS HIDROGÉIS DE FIBROÍNA

Na literatura, diversas metodologias são utilizadas para agregação protéica da fibroína. No presente trabalho, utilizou-se o método de reticulação química através de um solvente orgânico, o metanol. Para otimização do processo de síntese do hidrogel, duas diferentes condições foram consideradas, utilizando como variável a concentração do metanol. Inicialmente uma SF de concentração 2,3% (m/v) foi misturada a uma solução de metanol 37,5% (hidrogel 1) e 50% (hidrogel 2) (v/v). Em seguida, a mistura foi levada ao vórtex por 3 minutos em uma rotação de 2000 rpm, permitindo assim a interação do solvente orgânico com a cadeia de aminoácidos da fibroína, além da interação entre as próprias cadeias de fibroína. Após 3 minutos, a solução pré-gelificação foi deixada em temperatura ambiente (22 °C), até completa gelificação do material (NARESH KASOJU et al., 2016).

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

5.5.1 Entumescimento

O grau da capacidade de absorção da água de um hidrogel define a sua capacidade frente a liberação de moléculas e células da malha, tornando essa medida necessária em sua caracterização. Para isso, hidrogéis com 37,5% e 50% de metanol foram sintetizados, congelados em freezer -80 °C e secos através de liofilização. Em seguida, tiveram suas medidas de massa anotadas (m_{seco}); por conseguinte, foram imersos em 1 mL de solução de PBS 1X por 24 horas. Depois desse período, foram novamente pesados (m_{entu}). A taxa de absorção de água foi calculada de acordo com a equação abaixo (SALEEM et al., 2018), a partir de experimentos realizados em triplicata.

$$Taxa\ de\ entumescimento = \frac{m_{(entu)} - m_{(seco)}}{m_{(entu)}} \times 100$$

5.5.2 Avaliação da Estabilidade

Considerando a variação de pH como parâmetro indicativo de degradação do material, medidas de pH dos hidrogéis foram efetuadas durante 7, 15 e 30 dias em duas diferentes condições de armazenamento: temperaturas de 4 °C e 37 °C.

5.5.3 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FT-IR)

A Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura de substâncias, podendo ser usada para identificar um composto ou investigar sua composição química. A fibroína apresenta em sua estrutura regiões de amida características que podem ser visualizadas através da técnica. Para realizar as medidas, a radiação no infravermelho passa através da amostra e é comparada com aquela transmitida na ausência de amostra. O espectrofotômetro registra o resultado na forma de bandas de absorção. O metanol, ao interagir com a fibroína, induz uma mudança conformacional protéica de α -hélice para β -folha, alterando o padrão de picos, que é facilmente notado pelo FT-IR. Essa alteração, quando confirmada, é um indicativo de gelificação. A análise foi realizada em um espectro na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e 64 scans em equipamento Nicolet-Avatar 360, no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

5.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) baseia-se em um feixe de elétrons que incide na amostra, varrendo-a ponto a ponto. Esses elétrons são captados por detectores e traduzidos na forma de uma imagem tridimensional. Esta técnica é utilizada para o estudo da superfície de materiais sólidos. Neste trabalho, a MEV foi utilizada para análise morfológica do hidrogel e avaliação de sua microestrutura. Para o preparo das amostras, uma alíquota do hidrogel foi fixada com paraformaldeído a 4% foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e seco através do secador de ponto crítico por CO₂.

Essa metodologia é bastante utilizada para desidratar materiais biológicos pois mantém íntegra a sua estrutura superficial, permitindo assim sua visualização através de MEV. Depois de secos por ponto crítico, as amostras foram fixadas em um suporte de alumínio (*stub*) coberto com uma fita de carbono condutora. Após fixação da amostra, os *stubs* foram submetidos à metalização em partículas de ouro, e em seguida, acoplados ao leitor do microscópio JSM-6390LV (JEOL), disponibilizado pela plataforma de microscopia do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA para as análises.

5.6 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE *IN VITRO*

5.6.1 Cultivo Celular

Macrófagos J774, fibroblastos da linhagem L929, cardiomiócitos da linhagem H9c2, células tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras cardíacas induzidas (CPCi) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Life Technologies™, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), estreptomicina 10 µg/mL e penicilina 10 UI/mL. As células foram mantidas em cultivo na estufa a 37°C e 5% de CO₂, com troca do meio DMEM suplementado a cada dois dias. Na 3ª passagem, com uma confluência celular de 80-90%, os ensaios foram realizados.

5.6.2 Ensaio de citotoxicidade

Em microplacas de 96 poços, células de linhagem J774, densidade celular de 1×10^4 foram plaqueadas. Posteriormente, as microplacas foram incubadas durante 24 horas na mesma condição de cultivo. Após o período de incubação, o sobrenadante foi completamente retirado e os hidrogéis sintetizados com 37,5% e 50% de metanol foram diluídos em meio DMEM de forma seriada nas seguintes concentrações: 170 mg/mL, 85 mg/mL, 42,5 mg/mL, 21,25 mg/mL e 10,625 mg/mL. Em seguida, os hidrogéis foram inseridos na placa. Após a aplicação dos tratamentos e controles em triplicata, as microplacas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle positivo de toxicidade, foi utilizada uma solução de cloreto de pararosnilina; o controle negativo foi apenas o meio DMEM suplementado.

De forma semelhante, em um segundo grupo de experimentos, células de linhagem L929, células de linhagem cardíaca H9c2, células tronco mesenquimais e células progenitoras cardíacas foram submetidas à avaliação da citotoxicidade dos hidrogéis. À densidade de 1×10^4 , também foram depositadas em microplacas de 96 poços e mantidas por 24 horas; em seguida, o meio foi aspirado e os hidrogéis foram adicionados aos cultivos nas concentrações de 340 mg/mL, 170 mg/mL, 85 mg/mL, 42,5 mg/mL, 21,25 mg/mL, 10,625 mg/mL e 5,235mg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Os controles foram os mesmos do ensaio com as células J774.

Para a determinação da viabilidade celular nestes ensaios, foram adicionados 20 µl do reagente Alamar Blue® (Invitrogen™) em cada poço, e a placa foi mantida novamente nas mesmas condições durante 4 horas. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, USA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. A média foi obtida a partir de três ensaios independentes.

5.6.3 Ensaios de adesão e proliferação celular

Os hidrogéis de fibroína sintetizados também foram avaliados quanto a sua capacidade em promover adesão e proliferação celular em placas de 24 poços. Depois de gelificado, o material foi exposto à luz ultravioleta para descontaminação e, em seguida, lavado com solução salina com estreptomicina 10 µg/mL e penicilina 10 UI/mL, por 30 minutos. Por conseguinte,

500 μL de meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos foram depositados no poço a fim de preparar o material para receber a suspensão de células. Após 60 minutos, o meio foi completamente aspirado e uma suspensão de células com densidade 5×10^4 foi depositada. A placa foi novamente incubada a 37°C e 5% de CO_2 durante 1,5 horas, tempo necessário para as células aderirem no material; em seguida, cada poço foi completado com 1000 μL de meio. O experimento foi realizado em três tempos: 24 horas, 48 horas e 72 horas.

Ao final de cada 24 horas, o meio foi completamente aspirado e um novo meio com solução de Alamar Blue® (Invitrogen™) a 10% adicionado ao poço. Após 4 horas de incubação, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, USA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm, e a média obtida a partir de três ensaios independentes.

5.6.4 Avaliação da adesão e espalhamento celular

A adesão das células na superfície do substrato foi avaliada com o auxílio da microscopia confocal a laser e da microscopia eletrônica de varredura. Para essas análises, o hidrogel com células aderidas foi previamente preparado.

Na análise por microscopia confocal a laser no equipamento SP8 (Leica), os hidrogéis foram lavados com solução salina estéril e fixados com paraformaldéido 4%. Em seguida, foram lavados com uma solução de PBS, 5 vezes por 5 minutos; por conseguinte, foram permeados com Triton X-100 (MERCK) na concentração 0,5% por 15 minutos. Para retirar o excesso de Triton X-100, as amostras foram novamente lavadas com PBS, 5 vezes por 5 minutos. A fim de visualizar os filamentos de actina polimerizados, utilizou-se marcação com faloidina conjugada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific) para as células de linhagem L929 e H9c2 e ao fluoróforo Alexa-Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) para as células CTM e CPCi. Após diluição em BSA 3% (1:1200), a faloidina foi inserida sobre os hidrogéis e o sistema mantido sob agitação por 45 minutos. Adiante, as amostras foram novamente lavadas com PBS e 10 μL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) foram adicionados sobre o hidrogel para a marcação nuclear. Por ser tratar de um material 3D, as células se encontram em diversos planos diferentes, portanto, essa análise permitiu avaliar não apenas a presença da célula no material, como também, sua capacidade de expansão na estrutura do hidrogel.

Em outra avaliação, a análise morfológica das células foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. O sistema contendo as células no hidrogel foi fixado com paraformaldeído 4%; em seguida, lavado 3 vezes por 10 minutos com tampão cacodilato de sódio a 0,2% e contrastado com tetróxido de ósmio a 1% por 30 minutos. O sistema foi lavado novamente com tampão cacodilato de sódio a 0,2% e desidratado com soluções crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Adiante, foi submetido à secagem através do método de ponto crítico por gás carbônico (CPD030, Leica) com 20 ciclos de substituição do etanol por CO₂, sendo 10 ciclos de 1 minuto e 10 ciclos de 30 segundos. Após fixação da amostra, os *stubs* foram submetidos à metalização em partículas de ouro através do equipamento DENTON VACCUM IV e, em seguida, acoplados ao leitor do microscópio JSM-6390LV (JEOL), disponibilizado pela plataforma de microscopia do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA para as análises. As fotos foram capturadas em diferentes aumentos.

5.6.5 Avaliação da proliferação celular

Para avaliar a proliferação celular nos diferentes tempos definidos acima, 1000 µL de uma solução a 10% de Alamar Blue® (Invitrogen™) foram depositados na placa e, após 4 horas de incubação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® 190, Molecular Devices, USA), nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

Para cálculo da proliferação celular a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\%Proliferação\ celular = \frac{(A_{570} - A_{600})_{células\ no\ hidrogel}}{(A_{570} - A_{600})_{células\ controle}} \times 100$$

Sendo:

- A₅₇₀ = Absorbância no comprimento de onda 570 nm
- A₆₀₀ = Absorbância no comprimento de onda 600 nm

Por se tratar de um experimento para a avaliação temporal da proliferação celular, não houve controle negativo no teste. Como controle positivo, foi utilizada a absorção nos comprimentos de onda da hora 0 (zero) para que fosse possível mensurar a ocorrência de proliferação celular no decorrer do tempo. Os resultados foram expressos relativamente ao número de vezes que a proliferação foi maior em relação ao controle (*fold increase*).

5.6.6 Estudo de retenção celular *in vivo*

A capacidade de retenção celular *in vivo* do hidrogel de fibroína foi avaliada em um modelo murino de IAM, em conformidade com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publication N° 85-23) e com a Lei N° 11.794. Todos os protocolos experimentais envolvendo animais de laboratório foram aprovados pela CEUA-IGM/Fiocruz Bahia (Certificados de Aprovação N° 010/2015 e 013/2016).

Inicialmente, 12 camundongos C57BL/6 foram avaliados quanto sua função cardíaca basal através do eletrocardiograma (ECG). A lesão cardíaca para induzir o modelo de IAM foi gerada a partir da administração subcutânea de isoproterenol (150 mg/Kg/dia), conforme delineamento experimental indicado na **Figura 5** (MNAFGUI et al., 2016; R. et al., 2013). No dia 0, dia da administração das formulações, um ECG confirmatório da lesão cardíaca foi realizado. Aqueles animais que tiveram a lesão cardíaca confirmada no ECG foram incluídos no delineamento, sendo randomicamente divididos em 4 grupos (n=3).

Os seguintes grupos e controles foram considerados: (1) controle saudável, animais apenas manipulados que tem como objetivo, nas análises, de eliminar os efeitos acessórios ao experimento (anestesia, manipulação, entre outros); (2) grupo salina, animais que receberam 50 µL de solução de cloreto de sódio 0,9; (3) grupo CPCi, animais injetados com células progenitoras cardíacas GFP positivas (GFP⁺) (gentilmente cedidas pela Dra. Daniela Nascimento Silva, Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - CBTC, Salvador/BA), 10⁶ células/animal; (4) grupo CPCiH, animais que receberam 50 µL de células CPCi GFP⁺ (10⁶ células/animal) em hidrogel de fibroína. Todas as formulações foram administradas via intracardíaca guiada por ecografia (Vevo 2100, Visualsonics Inc., Canada). Os animais foram anestesiados por meio de um circuito anestésico de isoflurano inalado a 2% (Abbott) por 10 minutos antes e após a injeção intramiocárdica.

Após 72 horas do transplante, um novo ECG foi registrado e os animais foram eutanasiados com a administração de xilazina e cetamina 0,30 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente. Depois de constatada a morte do animal, o coração foi excisado e incluído em OCT Tissue-Tek® (matriz para criocorte), inserido em nitrogênio líquido para congelamento rápido e depois transferido para freezer a -80 °C. Para os cortes, foi utilizado um criostato CM1850UV (Leica). Após serem cortados transversalmente, os tecidos foram analisados por

microscopia confocal a laser para avaliar a presença ou ausência das células CPCi GFP⁺ implantadas de acordo com os grupos experimentais.

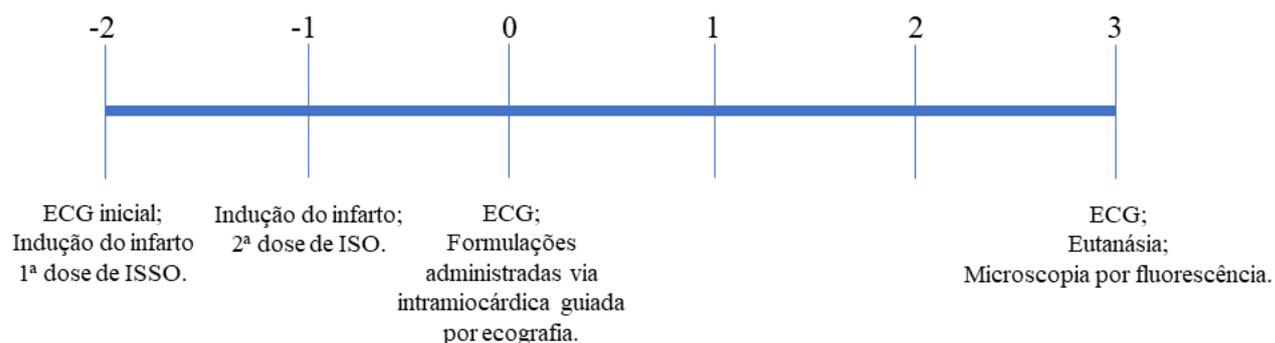


Figura 5. Delineamento experimental para a avaliação da capacidade de retenção celular *in vivo* do hidrogel de fibroína em um modelo murino de IAM

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Prism 5.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Todos os gráficos indicam valores da média \pm erro padrão da média. Testes de normalidade D'agostino-Pearson e Shapiro-Wilk foram aplicados. As diferenças entre grupos nos ensaios de citotoxicidade foram avaliadas através de Two-Away ANOVA com pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%. Para o experimento de proliferação celular, os grupos foram avaliados através do teste de Friedman com teste de comparações múltiplas de Dunn, utilizando o mesmo intervalo de confiança. $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo

3. RESULTADOS

6.1 SÍNTESE DOS HIDROGÉIS

A gelificação do material ocorre pela interação da fibroína com o metanol durante o estresse mecânico de “vortexeamento”. Após formação de ligações entre as cadeias dos

aminoácidos, a solução de fibroína adquire aspecto visual opaco, tomando a forma do molde na qual está inserida, confirmando, de forma macroscópica, a sua gelificação (**Figura 6**).



Figura 6. Aspecto visual da fibroína em sua forma líquida e após formação de hidrogéis. A: Fibroína após solubilização e posterior centrifugação. B e C: hidrogéis de fibroína sintetizados pela interação com o metanol nas concentrações de 37,5% e 50% (v/v).

6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

6.2.1 Entumescimento

Quando imersos em solução aquosa, hidrogéis secos devem apresentar a capacidade de absorver água, expandindo seu volume, sendo essa característica intrínseca de entumescimento do hidrogel. Neste trabalho, os hidrogéis apresentaram as seguintes taxas de absorção de água: $46,45 \pm 22,63$ para o hidrogel produzido com uma solução de metanol a 37,5%; e $12,49 \pm 4,98$ para o hidrogel produzindo com 50%.

6.2.2 Espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR)

A análise por espectroscopia FTIR permite a determinação de vibração molecular, detectando absorção correspondente especificamente às ligações presentes na molécula. A fibroína é caracterizada pela presença de três regiões: Amida I, que corresponde aos comprimentos de onda de 1700 a 1600 cm^{-1} ; amida II, de 1600 a 1500 cm^{-1} ; e, amida III, de

1200 a 1300 cm^{-1} , sendo a região de amida I essencial para identificar mudanças de conformação proteica. Quando em seu estado não processado, a fibroína apresenta uma conformação do tipo aleatória e α -hélice com um pico na região de amida I por volta de 1622 cm^{-1} (estado sol). Quando em contato com metanol, o comprimento de onda sofre um afastamento, chegando a 1607 cm^{-1} . Essa modificação aponta uma conformação proteica para β -folha correspondente a uma transição do tipo sol-gel, indicando, portanto, a formação do hidrogel de fibroína (**Figura 7**).

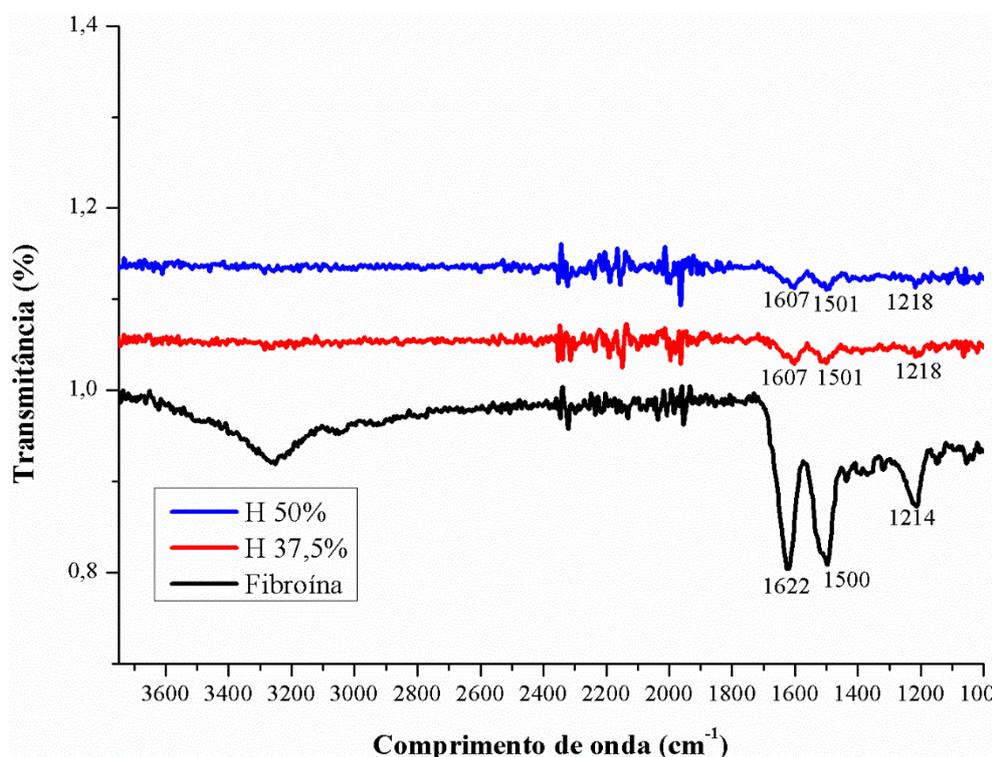


Figura 7. Espectro de infravermelho para a fibroína em seu estado não processado e após gelificação. Liofilizado de fibroína de seda em seu estado não processado, disperso em $\text{CaCl}_2:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ na proporção molar 1:2:8 e após formação de hidrogel com metanol na concentração de 37,5% (H 37,5%) e 50% (H 50%).

6.2.3 Avaliação da Estabilidade

Como uma medida de análise da estabilidade do material, o pH foi mensurado em diferentes condições (temperatura de 4°C e 37°C) durante 7, 15 e 30 dias. Não houve diferenças significativas nas medidas de pH no hidrogel, refletindo, portanto, baixa taxa de degradação desse material (**Figura 8**).

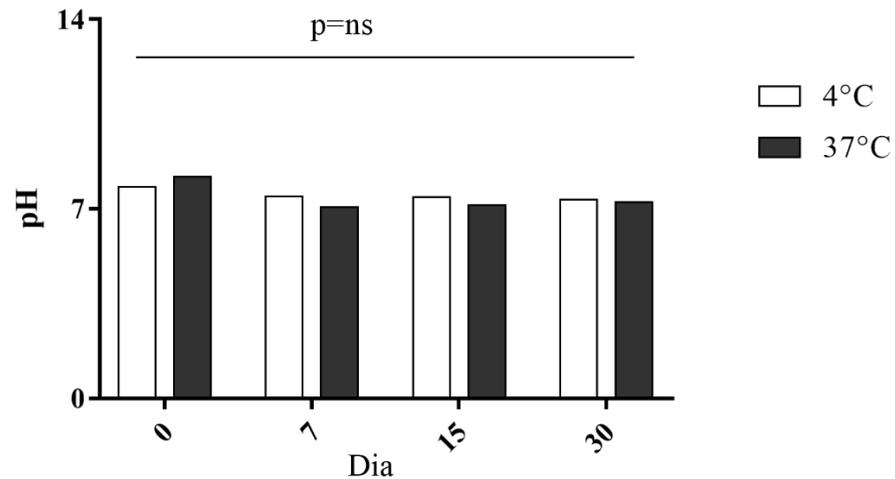


Figura 8. Monitoramento do pH do hidrogel preparado com metanol 37,5% durante 30 dias nas temperaturas de armazenamento 4°C e 37°C.

6.2.4 Avaliação da microestrutura do hidrogel de fibroína

Os hidrogéis de fibroína liofilizados foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura. Desta forma, foi possível elucidar seu arranjo estrutural, observando-se uma matriz rica em poros de diversos diâmetros, com junções intercomunicantes entre eles. Essa arquitetura tridimensional possui o potencial de utilização como material ancoradouro de células (**Figura 9**).

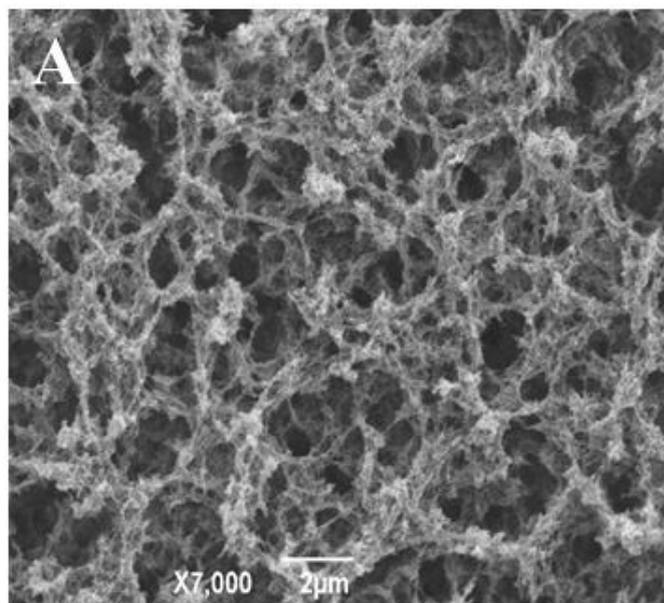


Figura 9. Fotomicrografia do hidrogel de fibroína sintetizado em solução de metanol a 37,5%.

6.3 BIOCOMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS DE FIBROÍNA

6.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Inicialmente, a compatibilidade celular dos hidrogéis foi avaliada em macrófagos da linhagem J774, considerando a ativação de macrófagos no processo de rejeição de implantes. Os hidrogéis não apresentaram efeitos citotóxicos significativos (**Figura 10**). Desta forma, pelo fato do hidrogel de 37,5% apresentar menor teor de metanol e ausência de toxicidade, este foi selecionado para os testes posteriores.

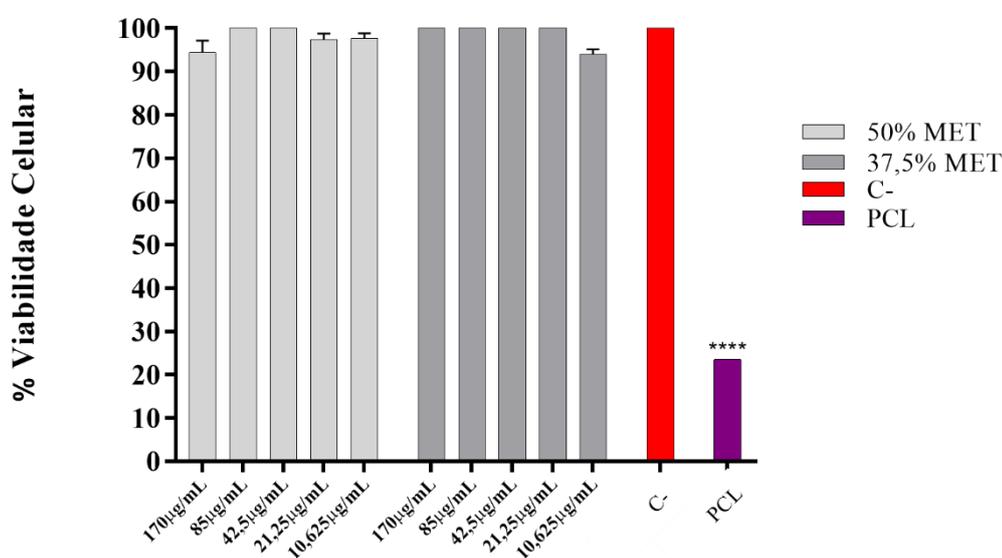


Figura 10. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de fibroína produzidos em diferentes soluções de metanol. Os valores representam média \pm erro padrão da média e foram obtidos a partir de ensaios de viabilidade celular com Alamar Blue® utilizando os hidrogéis de fibroína sintetizados a partir de metanol nas concentrações de 37,5% e 50% em linhagem de células macrófágicas J774. **** $P < 0,0001$ tratamentos *versus* controle PCL.

A partir da ausência de toxicidade dos hidrogéis em macrófagos, ensaios de viabilidade celular foram realizados em outras linhagens celulares envolvidas diretamente no reparo do coração. Também não foram determinadas concentrações citotóxicas nestas células a partir do ensaio com Alamar Blue®. Dessa forma, soluções de fibroína em diferentes concentrações não induziram toxicidade aos tipos celulares testados (**Figura 11**).

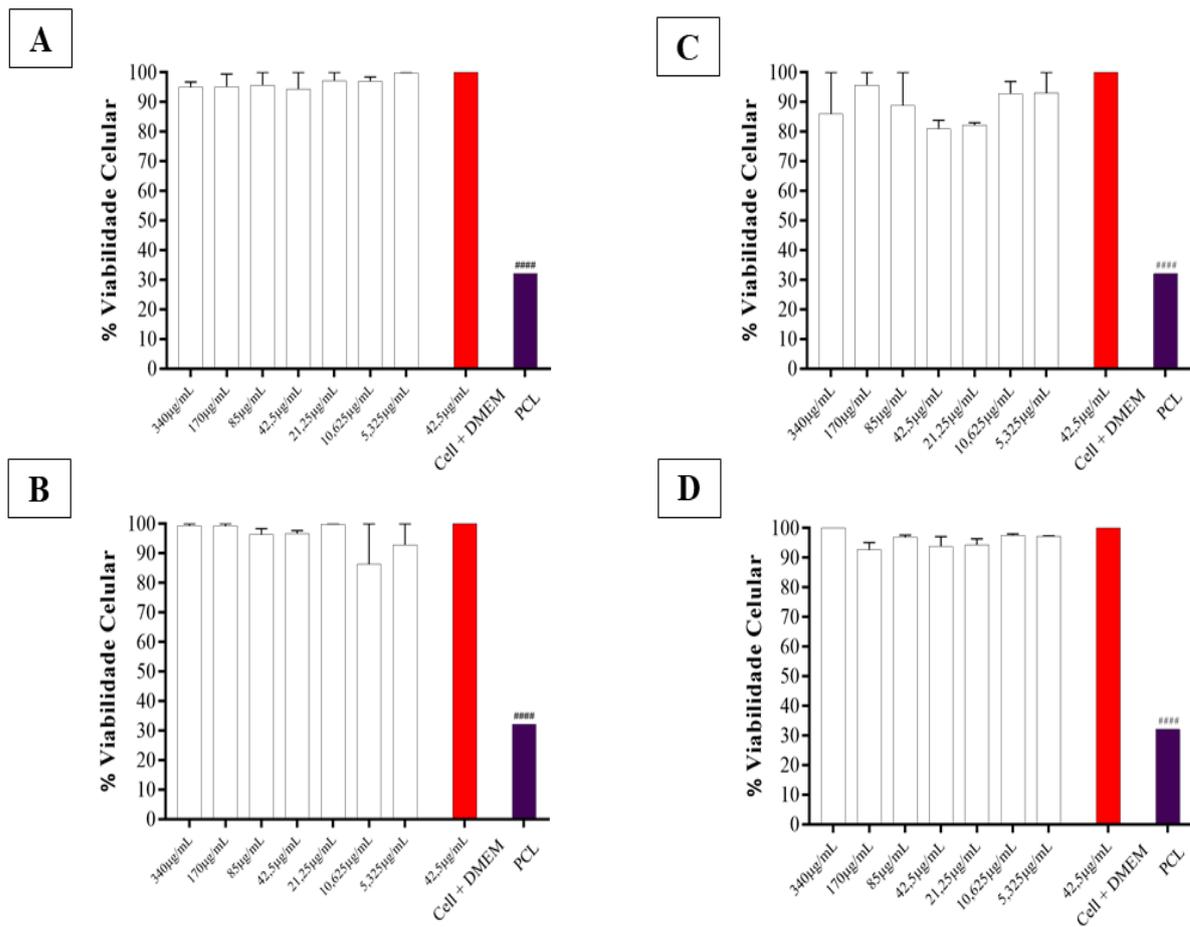


Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis em fibroblastos L929 (A), cardiomiócitos H9c2 (B), células tronco mesenquimais (C) e células progenitoras cardíacas induzidas (D). Ensaio realizado com o Alamar Blue® em hidrogel de fibroína sintetizado com metanol a 37%. **** $P < 0,0001$ tratamentos *versus* controle PCL.

6.3.2 Avaliação da proliferação celular

Foi possível observar que as células plaqueadas sobre o hidrogel de fibroína mantiveram sua capacidade proliferativa, aumentando em número relativo ao decorrer do tempo do experimento. Em 72 horas, o aumento no número de células foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) demonstrando, portanto, que a matriz de fibroína permitiu não apenas a viabilidade, como também, a proliferação celular, sendo, portanto, uma plataforma potencial para o *delivery* de células (Figura 12).

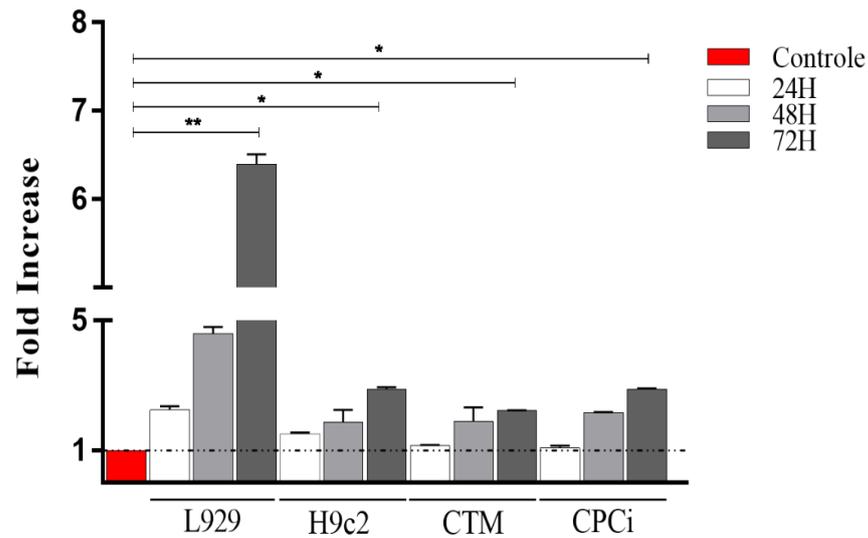


Figura 12. Proliferação celular de diferentes linhagens aderidas sobre o hidrogel de fibroína. Ensaio realizado com o reagente Alamar Blue® após 24h, 48h e 72h de cultivo das células L929, H9c2, CTM e CPCi na matriz de fibroína gelificada, tendo como controle o início do ensaio. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam o p-valor ajustado para cada análise ao se comparar a proliferação celular após 72 horas (72H) *versus* controle (tempo zero).

6.3.3 Avaliação da adesão e espalhamento celular na matriz de fibroína

A adesão das células CTM e CPCi na superfície do substrato de fibroína foi avaliada com o auxílio da microscopia confocal e da microscopia eletrônica de varredura nos tempos de 24h, 48h e 72h. Na análise de microscopia confocal, foram utilizadas marcações de sinal fluorescente para faloidina e DAPI. A visualização da F-actina revelou o aspecto íntegro de fibras de citoesquelético bem espalhadas, como evidência indireta para a ligação da integrina e a formação de aderências focais, além da visualização de um tamanho normal dos núcleos celulares, (**Figura 13**).

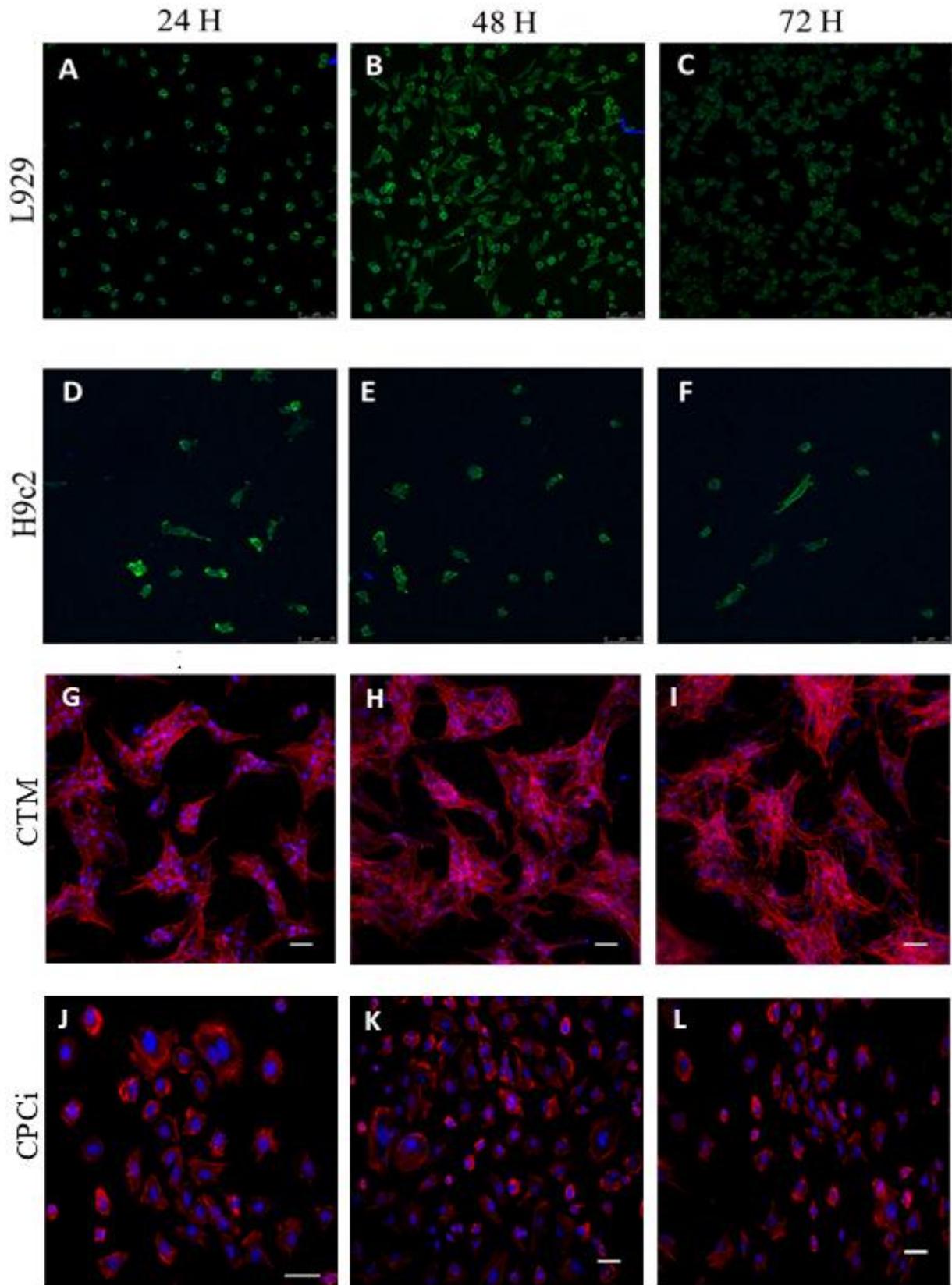


Figura 13. Fotomicrografias obtidas por microscopia confocal de fluorescência das células cultivadas em hidrogel de fibroína. A coloração em verde e em vermelho é referente à sonda molecular Faloidina e o azul é referente a marcação do núcleo (DAPI). Fibroblastos da linhagem L929, cardiomiócitos da linhagem H9c2, células tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras cardíacas induzidas (CPCi).

Além da microscopia confocal, a análise morfológica da superfície celular foi realizada com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Através das imagens capturadas por essa técnica, foi possível visualizar células na matriz de fibroína, com sua estrutura porosa normal (**Figura 9**). As células apresentavam-se bem aderidas e com diferenças morfológicas ao decorrer do tempo, o que pode indicar um processo de adaptação ao hidrogel. Em 72 horas, as células apresentavam morfologia espreada e sem alterações de membrana (**Figura 14**). Também não foram observados processos aparentes de morte celular.

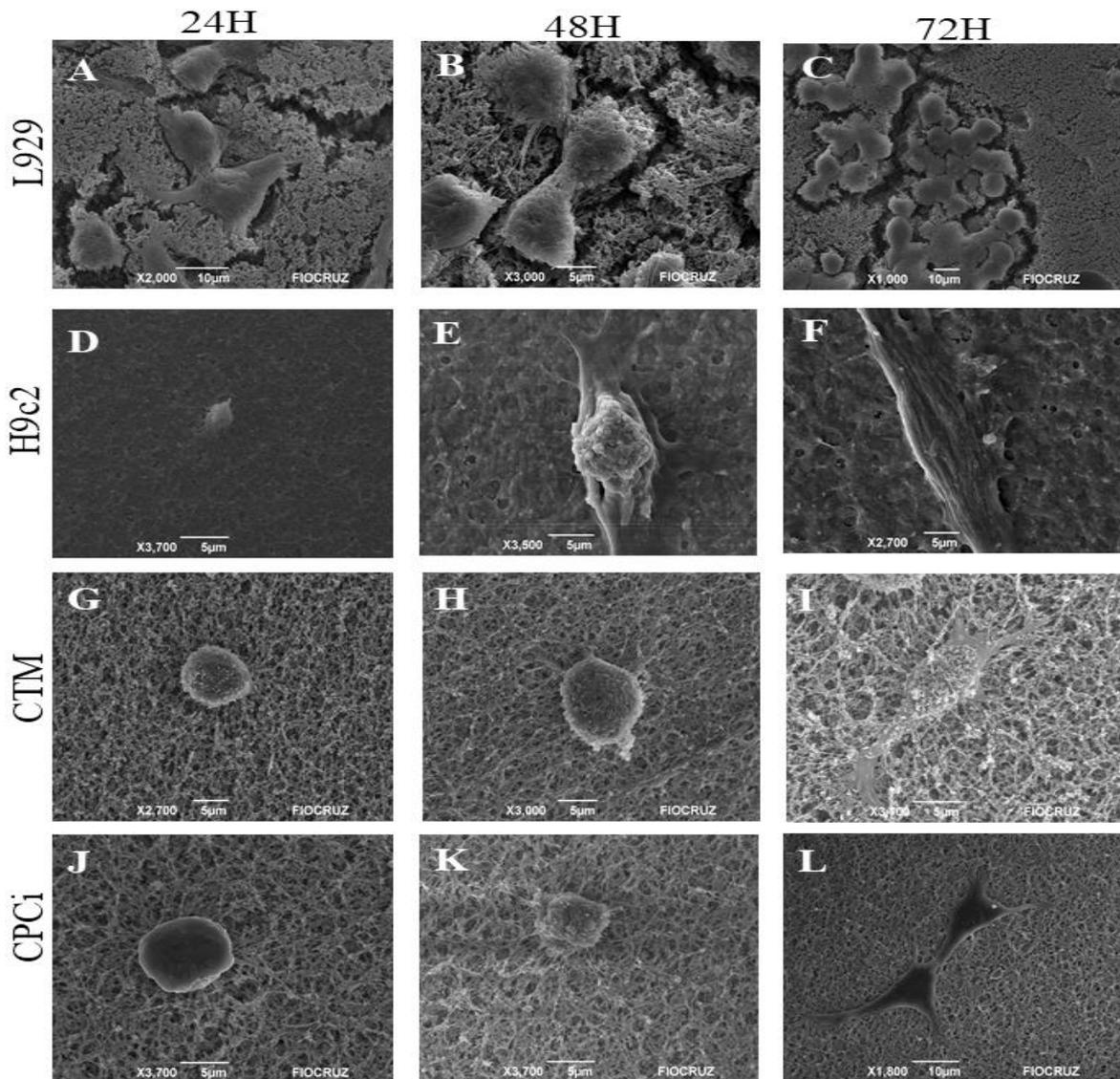


Figura 14. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura indicando os perfis de adesão das células L929, H9c2, CTM e CPCi na matriz de fibroína após 24, 48 e 72 horas. Fibroblastos da linhagem L929, cardiomiócitos da linhagem H9c2, células tronco mesenquimais (CTM) e células progenitoras cardíacas induzidas (CPCi).

6.4 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO CELULAR *IN VIVO*

Os hidrogéis têm sido investigados pela sua capacidade de aumentar a retenção de células tronco no coração, visando a indução de mecanismos de reparo cardíaco. Neste trabalho, o hidrogel de fibroína produzido com solução de metanol a 37,5% foi utilizado como matriz de suporte para a administração de células progenitoras cardíacas induzidas (CPCi) em um modelo murino de IAM.

De acordo com a análise dos cortes de coração por microscopia confocal de fluorescência, não foram visualizadas células GFP+ no coração dos animais que receberam apenas o implante de CPCi (10^6 células) (**Figura 15-A**). Por outro lado, nos cortes dos animais injetados com CPCi em hidrogel foi possível visualizar regiões com nichos de células GFP+ (**Figura 15-A, B**). Estes achados pré-clínicos indicam as células tronco progenitoras podem ser administradas no tecido cardíaco injuriado através do hidrogel de fibroína, o qual proporciona maior retenção celular.

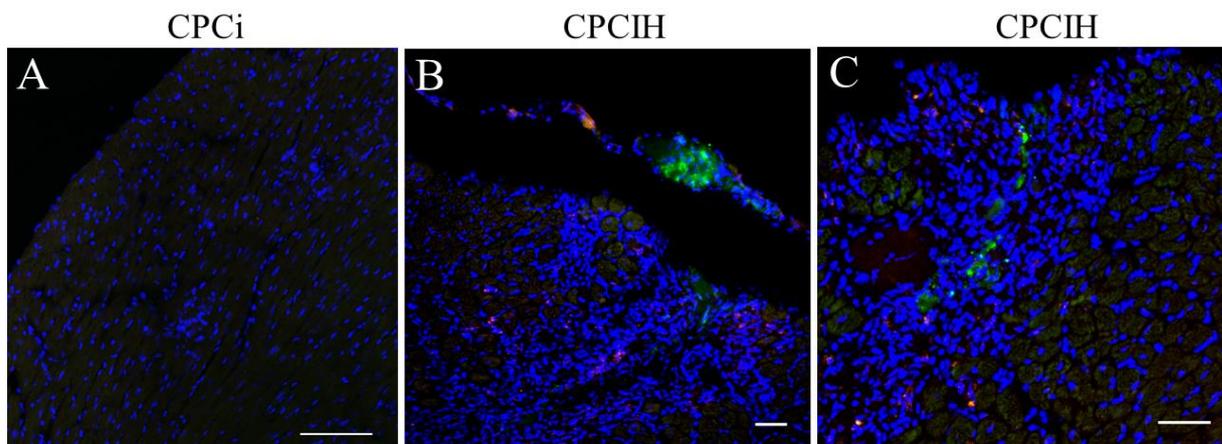


Figura 15. Retenção das células progenitoras cardíacas induzidas no coração infartado de camundongo quando administradas sem hidrogel (CPCi) e com hidrogel de fibroína (CPCIH). Imagens de microscopia confocal, com marcação verde (células GFP positivas) e azul (núcleos, DAPI).

7. DISCUSSÃO

As doenças isquêmicas são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, acarretando em diversas mortes anualmente (ROTH et al., 2017). Portanto, as terapias que tem

por objetivo regenerar o músculo cardíaco vem crescendo rapidamente e, entre elas, estão a terapia com células tronco. Contudo, diversos estudos têm reportado a baixa retenção de células no músculo cardíaco (CHOW et al., 2017), o que limita os mecanismos de reparo e os benefícios da terapia celular.

Dessa forma, com o intuito de incrementar a baixa retenção celular no coração, plataformas biocompatíveis 3D vêm sendo sintetizadas, incluindo matrizes na forma de hidrogel injetável. Neste sentido, o presente trabalho, focou na síntese e caracterização de um hidrogel a partir da fibroína, uma proteína extraída de casulos do bicho da seda, já utilizada em diversas outras áreas da engenharia tecidual.

Para que um gel seja considerado um hidrogel é necessário que este tenha a capacidade de absorver água, sendo essa a característica que o define (PASCUAL-GIL et al., 2015). Ao realizar experimentos para avaliar se o hidrogel sintetizado apresentava a capacidade de absorver água, identificou-se que essa capacidade era dependente da concentração de metanol utilizado. Concentrações maiores de metanol diminuem a porosidade do hidrogel; uma menor quantidade de poros leva a uma menor absorção de água por este (KASOJU et al., 2016), corroborando, portanto, com os resultados encontrados neste trabalho.

Em termos espectrofotométricos, a fibroína apresenta três regiões que caracterizam essas moléculas: a região de amida I, amida II e amida III, sendo a região de amida I essencial para identificar mudanças de conformação proteica (KASOJU et al., 2016). Como exposto na **Figura 7**, ao analisar as bandas de amida I da fibroína em seu estado líquido, identifica-se a presença de uma absorção em 1622 cm^{-1} , característica da conformação random-coil (YIN et al., 2017). Quando em seu estado de gel, uma agregação das moléculas proteicas por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (WANG et al., 2006) leva a uma mudança na conformação da proteína para β -folha, levando ao afastamento do pico, principalmente de amida I (EBRAHIMI et al., 2018). Este comportamento foi encontrado neste trabalho, pois nos picos correspondentes a amida I dos hidrogéis produzidos identificou-se a absorção em 1607 cm^{-1} .

Processos de adesão e migração celular estão relacionados aos arranjos microestruturais dos hidrogéis. Hidrogéis ditos porosos, por assim apresentar em sua microestrutura poros bem formados, facilitam a adesão das células, como também, a comunicação entre elas, influenciando positivamente no processo de sobrevivência e expansão celular (KIM et al., 2005). Diferentes hidrogéis produzidos e fotografados em diferentes dias mostram um perfil padrão: estrutura compacta e opaca no aspecto macroscópico e visual; quando

microscopicamente analisados, arranjos com poros interconectados são observados. Resultados semelhantes foram encontrados por Giardino e colaboradores (2004) em que termogéis produzidos a partir da fibroína apresentaram uma microestrutura porosa com formato robusto e opaco. Yasushi Tamada e colaboradores (2005), ao produzir hidrogéis a partir de solventes orgânicos, encontraram características que corroboram os achados desta dissertação.

O monitoramento do pH do material no curso do seu armazenamento em diferentes temperaturas é utilizado para a avaliação da estabilidade (BRASIL, 2007). Neste trabalho, o pH dos hidrogéis foi monitorado nos dias 0, 7, 15 e 30 nas temperaturas de 4°C e 37 °C. Géis e hidrogéis quando muito básicos ou muito ácidos podem levar a reações inflamatórias no corpo, portanto, definir essa variação ao longo de 30 dias foi necessária para atestar sua segurança quanto ao uso (SOUZA et al., 2016). Foram detectados valores de pH próximo a neutralidade em ambos os hidrogéis, sem variação significativa em diferentes condições de armazenamento, indicando, assim, a estabilidade do material e sua adequabilidade para uso em sistemas biológicos.

Biocompatibilidade faz parte de um conjunto de características necessárias para a utilização de um material como dispositivo para entrega de fármacos ou como plataformas para células. Uma das formas de assegurar essa capacidade de não desenvolver reações tóxicas no organismo é investigar a citotoxicidade dos materiais (NAAHIDI et al., 2017). Portanto, inicialmente, ensaios de viabilidade celular através do reagente Alamar Blue® com macrófagos de linhagem J774 foram realizados com os diferentes hidrogéis produzidos. Os macrófagos são fagócitos especializados na defesa do organismo contra corpos estranhos, incluindo biomateriais e, portanto, podem estar envolvidos na rejeição do biomaterial, como também no processo de biodegradação e bioabsorção desse material (KLOPFLEISCH, 2016; XIA; TRIFFITT, 2006).

Em hidrogéis produzidos a partir de concentrações baixas de metanol (37,5% e 50%), detectou-se perfis de viabilidade celular semelhante aos controles, indicando a ausência de toxicidade dos componentes dos hidrogéis. Estes ensaios indicam, de forma preliminar e *in vitro*, a manutenção da atividade mitocondrial das células. Estes achados corroboram com os dados reportados por Makarand Risbud e colaboradores (2001) que avaliaram a viabilidade celular de macrófagos em hidrogéis produzidos a partir de quitosana e polivinilpirrolidona (PVP). Devido à baixa concentração de metanol e compatibilidade em macrófagos J774, o hidrogel produzido com metanol de 37,5% foi selecionado para os ensaios posteriores.

Diversas células estão envolvidas no processo endógeno de regeneração cardíaca, incluindo fibroblastos e cardiomiócitos (BROUGHTON et al., 2018). Portanto, é essencial avaliar a toxicidade celular frente a presença dos componentes formadores do hidrogel. A partir do ensaio com Alamar-Blue®, ensaios de viabilidade com linhagens de fibroblastos L929 e cardiomiócitos H9c2 foram realizados. Xue Liu e colaboradores (2018), ao testar hidrogéis de quitosana modificados e acoplados com ácido polilático, mostraram resultados de viabilidade próximos ao seu controle, considerando assim os hidrogéis não tóxicos. De maneira similar, o presente estudo apresenta resultados de ensaios de viabilidade que indicam os hidrogéis de fibroína como produtos atóxicos. Esses achados também estão relacionados àqueles reportados por Simone S. Silva e colaboradores (2008), que mostram esponjas produzidas a partir de quitosana e fibroína, com viabilidade acima de 100% em células cultivadas além de 7 dias.

Uma das consequências do infarto agudo do miocárdio é a morte de cardiomiócitos, e a sobrevivência dos que resistiram a falta de nutrientes é importante pois evita o aumento da área isquêmica e conseqüentemente reduz os danos causados pelo remodelamento negativo (BROUGHTON et al., 2018). Portanto, entender a interação dos cardiomiócitos com os componentes do hidrogel é fundamental para que não ocorra aumento da região isquêmica no coração após introdução do hidrogel. Diversos trabalhos que focam a utilização de hidrogéis para regeneração cardíaca têm testado a viabilidade de cardiomiócitos. Gnanaprakasam Thankam e colaboradores (2013), com hidrogéis de alginato de cálcio e PVA, mostraram cardiomiócitos viáveis, corroborando os resultados deste trabalho com células H9c2.

A partir da citocompatibilidade do hidrogel de fibroína nas linhagens avaliadas, investigou-se a viabilidade celular deste biomaterial em células tronco mesenquimais e em células progenitoras cardíacas induzidas. As células tronco mesenquimais são uma interessante fonte para a terapia celular devido seu poder de diferenciação; entretanto, sua baixa retenção no tecido hospedeiro limita o potencial translacional da terapia celular (CHOW et al., 2017; TURKHEIMER; WALDRON, 2019). Com os ensaios utilizando hidrogéis diluídos em meio DMEM, constatou-se a viabilidade próxima de 100% destes dois tipos celulares, comprovando a ausência de toxicidade do hidrogel para estas células tronco. No trabalho publicado por Matteo Ciocci e colaboradores (2017), hidrogéis de fibroína foram sintetizados e sua compatibilidade testada contra células tronco mesenquimais humanas e os resultados por eles encontrados corroboram com os apresentados na **Figura 11C e 11D**, com 100% de viabilidade. Adicionalmente, no trabalho de Tao Li e colaboradores (2018), que produziram um hidrogel de

fibróina modificado e ao testar ambos os materiais, comprovou biocompatibilidade de 100%, por intermédio da metodologia *live/dead*.

Manter a capacidade proliferativa das células é essencial para que o hidrogel permita o repovoamento do tecido lesionado; portanto, avaliou-se a capacidade proliferativa dessas células (L929, H9c2, CTM e CPCi) quando aderidas no hidrogel através da metodologia por Alamar Blue®, tomando como controle a hora 0 (zero), conforme realizado por Wesley F. Oliveira e colaboradores (2018). A **Figura 12** apresenta a capacidade proliferativa em todas as linhagens celulares, estando de acordo com o estudo realizado anteriormente por Osman e colaboradores (2017), que mostra um aumento na proliferação de células L929 em hidrogéis produzidos por levana e N-isopropilacrilamida ao longo do tempo. Resultado semelhante foi encontrado no estudo elaborado por Dimple Chouhan e colaboradores (2018), em que fibroblastos humanos tiveram uma taxa de proliferação de aproximadamente 10 vezes maior que sua quantidade inicial de células.

Com cardiomiócitos H9c2, em estudo elaborado por Haitao Cui e colaboradores (2014) ao longo de 7 dias, houve uma intensa proliferação dessas células, com aumento de 10 vezes a quantidade de DNA daquela encontrada no dia 1; quando próximo ao dia 3, essa relação de aumento era de aproximadamente 2,5 vezes, corroborando com os dados deste trabalho de dissertação. Após 72 horas, a relação de aumento da atividade metabólica foi de aproximadamente 3 vezes em relação ao dia 0 (**Figura 12**). É importante salientar que entre os dois trabalhos há uma diferença entre as metodologias utilizadas: presente estudo, foi realizada a quantificação da atividade metabólica da célula; no trabalho de Cui e colaboradores (2014), foi realizada a quantificação direta de DNA, e portanto, uma medida mais refinada do processo biológico de proliferação celular.

O cultivo de células tronco mesenquimais em hidrogéis de fibróina ao longo do tempo levou a um aumento do número de células relativas cerca de 3 vezes maior no final do experimento. Em estudo elaborado por Hongbin Fan e colaboradores (2008), através do acompanhamento da atividade metabólica das células tronco mesenquimais cultivadas em hidrogel de gelatina e fibróina, foi detectado um aumento na capacidade metabólica dessas células de aproximadamente 2 vezes maior no dia 3 que aquela detectada no dia 1, corroborando de forma relativa, porém consistente, com os resultados do presente trabalho.

Ming-Chia Yang e colaboradores (2009), a fim de avaliar o papel do marcador de membrana CD44 frente a processos de proliferação e diferenciação das células tronco

mesenquimais, desenvolveram um hidrogel de fibroína e ácido hialurônico. Quando cultivadas em hidrogéis apenas de fibroína, ao final de 5 dias, foi notada taxa de crescimento celular de 2 vezes em relação ao seu controle. No presente estudo, as células cultivadas nos hidrogéis de fibroína mantiveram sua capacidade proliferativa, com um aumento de 2,23 vezes em relação ao controle.

Com o advento das células tronco pluripotentes induzidas abriu-se um novo caminho para a medicina regenerativa cardíaca, aumentando a fonte de células tronco e diminuindo as possibilidades de rejeição; entretanto, a aplicação dessas células de forma isolada, na ausência de um sistema de suporte, tem limitado a indução dos mecanismos de reparo cardíaco. Desta forma, registra-se a necessidade de uma matriz que permita o seu crescimento e desenvolvimento (BURSAC et al., 2013). Um hidrogel de fibroína com características mecânicas semelhantes à matriz celular deverá apresentar características inerentes a uma plataforma adequada para a administração de células tronco.

Hekai Li e colaboradores (2018) estudaram a capacidade de células pluripotentes induzidas aderirem e se proliferarem em hidrogel de ácido fólico quando em contato com hidrogel, sendo essa capacidade testada a partir do kit de avaliação da proliferação celular (CCK-8). Os valores de densidade óptica foram lidos no dia 1, 2 e 3. Quando no dia 3, esses valores se mostraram maiores cerca de 2 vezes em relação ao dia 1. Nesta dissertação, em experimentos realizados a partir da revelação por Alamar Blue®, detectou-se um aumento de cerca de 3 vezes maior, corroborando, assim, com os dados encontrados por Hekai Li e colaboradores, atestando a biocompatibilidade do hidrogel de fibroína.

A interação célula-material é responsável por definir a forma como a célula se espalha e se essa poderá se proliferar frente a estímulos específicos (VELEIRINHO et al., 2012). Segundo o trabalho realizado por Beatriz Veleirinho e colaboradores (2012) os fibroblastos L929, em processos iniciais de adesão, apresentaram uma morfologia circular; ao decorrer do tempo, passam a adquirir uma morfologia espalhada com múltiplas extensões celulares, com pontos de aderência na matriz como também entre as células. Resultado semelhante foi encontrado neste trabalho, conforme as imagens obtidas por microscopia confocal e eletrônica de varredura.

Esse mesmo padrão pode ser visto também nas células tronco mesenquimais e nas células progenitoras cardíacas induzidas. Inicialmente, sua forma arredondada não parece interagir com a malha porosa do hidrogel de fibroína. Porém, em 48 horas, é possível observar

prolongamentos que partem do citosol da célula, com sua estrutura espalhada, a partir do terceiro dia. Em um trabalho proposto por X. Wang e colaboradores (2008), a análise histológica mostra que células tronco mesenquimais humanas incorporadas no hidrogel apresentaram comportamento semelhante do encontrado neste trabalho, com células em formato arredondado no dia 1, e células em forma fusiforme no dia 6 do cultivo com o material.

Esses resultados também estão em concordância com os encontrados por M. Floren e colaboradores (2016), que mostram a relação entre a concentração de fibroína utilizada com o grau de rigidez do hidrogel produzido. Em 72 horas de experimento, através da microscopia confocal, foi possível observar uma grande quantidade de células tronco mesenquimais aderidas e espalhadas no material. Este achado também foi identificado no presente trabalho, sugerindo que o hidrogel aqui desenvolvido é permissivo à presença das células tronco mesenquimais humanas e células progenitoras cardíacas.

O transplante cardíaco de células tronco após o IAM tem sido investigado por vários estudos pré-clínicos e clínicos. Contudo, a baixa retenção da população celular implantada limita o sucesso dessa terapia. Para otimizar os efeitos da terapia celular no IAM, é primordial investigar a administração das células tronco em matrizes de suporte (CAI; DEWI; HEILSHORN, 2015). Neste trabalho, um estudo piloto *in vivo* foi realizado para investigar qualitativamente a retenção de células CPCi em tecido cardíaco infartado quando administradas em hidrogel de fibroína sintetizado com 37,5% de metanol. Foi possível observar células CPCi em tecido cardíaco após 72 horas de sua injeção, efeito não observado quando nos animais que receberam apenas o enxerto celular, sem o hidrogel. Esse incremento de retenção celular foi reportado por alguns estudos que avaliaram a retenção de células tronco pluripotentes induzidas (GAFFEY et al., 2015; MULYASASMITA et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

A busca por novos biomateriais capazes de incrementar a retenção de células-tronco no tecido cardíaco levou ao delineamento deste projeto. Um hidrogel desenvolvido a partir da fibroína – proteína mais abundante no casulo do bicho da seda – foi avaliado quanto as suas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas.

Este trabalho demonstra o desenvolvimento bem-sucedido de uma plataforma de administração de células-tronco a partir de um biomaterial de origem natural, baixo custo e biocompatível, que apresentou a capacidade de reter células progenitoras cardíacas no músculo cardíaco, sendo, portanto, um protótipo biotecnológico com potencial translacional para futura investigação em terapia celular para regeneração cardíaca.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, F. *et al.* Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2015.
- AHMED, E. M. Hydrogel : Preparation , characterization , and applications : A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.
- AL ATTAR, N. *et al.* Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 1, p. 142–148, 1 abr. 2003.
- ALAM, P. *et al.* Inhibition of Senescence-Associated Genes Rb1 and Meis2 in Adult Cardiomyocytes Results in Cell Cycle Reentry and Cardiac Repair Post – Myocardial Infarction. **Journal of the American Heart Association**, 2019.
- ALINEJAD, Y. *et al.* An injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel with tunable mechanical properties for cell therapy/tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, n. 2017, p. 132–141, 2018.
- AMADO, L. C. *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 32, p. 11474–11479, 2005.
- ANVERSA, P. *et al.* Regenerating new heart with stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 62–70, 2 jan. 2013.
- BALSAM, L. B. *et al.* Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. v. 428, p. 668–673, 2004.
- BATISTA, R. A. *et al.* Hydrogel as an alternative structure for food packaging systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, n. September 2018, p. 106–116, 2019.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* **Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association.** [s.l: s.n.]. v. 137
- BHATT, A. S.; AMBROSY, A. P.; VELAZQUEZ, E. J. Adverse Remodeling and Reverse Remodeling After Myocardial Infarction. **Current Cardiology Reports**, v. 19, n. 8, 2017.
- BOSNAKOVSKI, D. *et al.* Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 1152–1163, 2006.
- BRASIL. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: Uma Abordagem sobre os Ensaio Físicos e Químicos.** Brasília: [s.n.].
- BREITBACH, M. *et al.* Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. **Blood**, v. 110, n. 4, p. 1362–1369, 2007.

- BROUGHTON, K. M. *et al.* Mechanisms of Cardiac Repair and Regeneration. **Circulation Research**, v. 122, n. 8, p. 1151–1163, 2018.
- BROWN, J. E. *et al.* Injectable silk-based biomaterials for cervical tissue augmentation: An in vitro study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 1, p. 118.e1-118.e9, 2016.
- BUITRAGO, J. O. *et al.* Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties. **Acta Biomaterialia**, v. 69, p. 218–233, 2018.
- BURSAC, N. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Differentiate to Cardiomyocytes and Form Biosynthetic Tissues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e65963, 2013.
- BUZHOR, E. *et al.* Cell-based therapy approaches: The hope for incurable diseases. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 5, p. 649–672, 2014.
- CAI, L.; DEWI, R. E.; HEILSHORN, S. C. Injectable hydrogels with in situ double network formation enhance retention of transplanted stem cells. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 9, p. 1344–1351, 2015.
- CHENG, J. *et al.* Biomimetic spinning of silk fibers and in situ cell encapsulation. **Lab Chip**, v. 16, n. 14, p. 2654–2661, 2016.
- CHENG, N. C. *et al.* Sustained release of adipose-derived stem cells by thermosensitive chitosan/gelatin hydrogel for therapeutic angiogenesis. **Acta Biomaterialia**, v. 51, p. 258–267, 2017.
- CHOUHAN, D. *et al.* In Situ Forming Injectable Silk Fibroin Hydrogel Promotes Skin Regeneration in Full Thickness Burn Wounds. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1801092, p. 1–15, 2018.
- CHOW, A. *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Encapsulating Bioactive Hydrogels Improve Rat Heart Function Post Myocardial Infarction. **Stem Cell Reports**, v. 9, n. 5, p. 1415–1422, 2017.
- CIOCCI, M. *et al.* Injectable silk fibroin hydrogels functionalized with microspheres as adult stem cells-carrier systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 960–971, 2018.
- COHN, J. N.; FERRARI, R.; NORMAN, S. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569–582, 2000.
- COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569–582, 2000.
- COLLINS, M. N.; BIRKINSHAW, C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering

- A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1262–1279, 2013.

CUI, H. *et al.* In vitro study of electroactive tetraaniline-containing thermosensitive hydrogels for cardiac tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 4, p. 1115–1123, 2014.

DIMATTEO, R.; DARLING, N. J.; SEGURA, T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound Repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2018.

DUELEN, R.; SAMPAOLESI, M. Stem Cell Technology in Cardiac Regeneration: A Pluripotent Stem Cell Promise. **EBioMedicine**, v. 16, p. 30–40, 27 jan. 2017.

EBRAHIMI, A. *et al.* Preparation and characterization of silk fibroin hydrogel as injectable implants for sustained release of Risperidone. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 2, p. 199–205, 2018.

EKE, G. *et al.* Development of a UV crosslinked biodegradable hydrogel containing adipose derived stem cells to promote vascularization for skin wounds and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 129, p. 188–198, 2017.

ERBS, S. *et al.* Restoration of Microvascular Function in the Infarct-Related Artery by Intracoronary Transplantation of Bone Marrow Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 116, n. 4, p. 366–374, 2007.

FAN, H. *et al.* Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1017–1027, 2008.

FLOREN, M. *et al.* Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. **Acta Biomaterialia**, v. 31, p. 156–166, 2016.

FORBES, S. J.; ROSENTHAL, N. Preparing the ground for tissue regeneration: From mechanism to therapy. **Nature Medicine**, v. 20, n. 8, p. 857–869, 2014.

FORMIGA, F. R. *et al.* Sustained release of VEGF through PLGA microparticles improves vasculogenesis and tissue remodeling in an acute myocardial ischemia-reperfusion model. **Journal of Controlled Release**, v. 147, n. 1, p. 30–37, 2010.

FORMIGA, F. R. *et al.* Controlled delivery of fibroblast growth factor-1 and neuregulin-1 from biodegradable microparticles promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model through activation of endogenous regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 173, n. 1, p. 132–139, 2014.

FRANGOIANNIS, N. G. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. **Circulation Research**, v. 110, n. 1, p. 159–173, 2012.

FRANGOIANNIS, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 5, p. 255–265, 2014.

GAFFEY, A. C. *et al.* Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium. **Journal of**

Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 150, n. 5, p. 1268–1277, 2015.

GAFFNEY, M. M. *et al.* Cardiovascular gene therapy: Current status and therapeutic potential. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 2, p. 175–188, 2007.

GIARDINO, R. *et al.* Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15, n. 7, p. 851–864, 2004.

GNANAPRAKASAM THANKAM, F. *et al.* Growth and survival of cells in biosynthetic poly vinyl alcohol-alginate IPN hydrogels for cardiac applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 137–145, 2013.

GONÇALVES, G. A. R.; PAIVA, R. DE M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 3, p. 369–375, 2017.

GORADEL, N. H. *et al.* Stem Cell Therapy: A New Therapeutic Option for Cardiovascular Diseases. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 95–104, 2018.

GREAVES, D. R.; GORDON, S. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 180–181, 2001.

GUO, H. *et al.* Preparation of Graphene Oxide-Based Hydrogels as Efficient Dye Adsorbents for Wastewater Treatment. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 0–9, 2015.

HARE, J. M. *et al.* Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial. **Mesenchymal Stem Cells and Ischemic Cardiomyopathy**. **JAMA**, v. 308, n. 22, p. 2369–2379, 12 dez. 2012.

HARTMAN, M. E.; DAI, D. F.; LAFLAMME, M. A. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, p. 3–17, 2016.

HASAN, A. *et al.* Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Repair after Myocardial Infarction. **Advanced Science**, v. 2, n. 11, p. 1–18, 2015.

HASHIMOTO, H.; OLSON, E. N.; BASSEL-DUBY, R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. October, p. 1–16, 2018.

HATZISTERGOS, K. E. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. **Circulation Research**, v. 107, n. 7, p. 913–922, 2010.

HILL, J. A. *et al.* Fundamental Cardiovascular Research: Returns on Societal Investment: A Scientific Statement from the American Heart Association. **Circulation Research**, v. 121, n. 3, p. e2–e8, 2017.

HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, v. 462, n. 7272, p. 426–432, 2009.

INOUE, S. *et al.* Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40517–40528, 2000.

J.J., L. *et al.* VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. **Cardiovascular Research**, v. 40, n. 2, p. 272–281, 1998.

JANSEN, K. *et al.* Hydrogel-Based Cell Therapies for Kidney Regeneration: Current Trends in Biofabrication and In Vivo Repair. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 26, p. 3845–3857, 2017.

JIANG, L.; VADER, P.; SCHIFFELERS, R. M. Extracellular vesicles for nucleic acid delivery: Progress and prospects for safe RNA-based gene therapy. **Gene Therapy**, v. 24, n. 3, p. 157–166, 2017.

KASIEWICZ, L. N.; WHITEHEAD, K. A. Recent advances in biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 10, p. 1962–1975, 2017.

KASOJU, N. *et al.* Silk fibroin gelation via non-solvent induced phase separation. **Biomater. Sci.**, v. 4, n. 3, p. 460–473, 2016.

KASOJU, N.; BORA, U. Silk fibroin in tissue engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, n. 4, p. 393–412, 2012.

KIM, H. J. *et al.* Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p. 4442–4452, 2005.

KIM, U. J. *et al.* Structure and properties of silk hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 786–792, 2004.

KLOPFLEISCH, R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model – Phenotypes, functions and markers. **Acta Biomaterialia**, v. 43, n. July, p. 3–13, 2016.

KUNDU, B. *et al.* Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 457–470, 2013.

KUNDU, J. *et al.* Silk fibroin nanoparticles for cellular uptake and control release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 388, n. 1–2, p. 242–250, 2010.

KUPATT, C. *et al.* Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: Role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. **Circulation**, v. 112, n. 9 SUPPL., p. 117–123, 2005.

LALIT, P. A. *et al.* Induced pluripotent stem cells for post-myocardial infarction repair: Remarkable opportunities and challenges. **Circulation Research**, v. 114, n. 8, p. 1328–1345, 2014.

LEAL, J. *et al.* Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. **European Heart Journal**, v. 27, n. 13, p. 1610–1619, 1 jul. 2006.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Emerging Role of Precision Medicine in Cardiovascular

Disease. **Circulation Research**, v. 122, n. 9, p. 1302–1315, 2018.

LI, H. *et al.* Folic Acid Derived Hydrogel Enhances the Survival and Promotes Therapeutic Efficacy of iPS Cells for Acute Myocardial Infarction. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 29, p. 24459–24468, 2018a.

LI, T. *et al.* Enzymatically crosslinked and mechanically tunable silk fibroin/pullulan hydrogels for mesenchymal stem cells delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 300–307, 2018b.

LIN, Z.; PU, W. T. Strategies for Cardiac Regeneration and Repair. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 239, p. 239rv1-239rv1, 2014.

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

MAGUIRE, E. M.; XIAO, Q.; XU, Q. Differentiation and application of induced pluripotent stem cell-derived vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 37, n. 11, p. 2026–2037, 2017.

MAIYO, F. 2017 Maiyo - Selenium nanoparticles potential in cancer gene. 2017.

MASON, D. *et al.* Cardiac gene therapy: Recent advances and future directions. **Journal of Controlled Release**, v. 215, p. 101–111, 2015.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 11, p. e442, 28 nov. 2006.

MATHIASSEN, A. B. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). **European Heart Journal**, v. 36, n. 27, p. 1744–1753, 29 abr. 2015.

MENASCHÉ, P. *et al.* The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. **Circulation**, v. 117, n. 9, p. 1189–1200, 2008.

MEYER, G. P. *et al.* Intracoronary Bone Marrow Cell Transfer After Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 113, n. 10, p. 1287–1294, 2006.

MIAO, C. *et al.* A brief review: The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 4–9, 2017.

MIURA, K. *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 743–745, 2009.

MNAFGUI, K. *et al.* Protective Effect of Hydroxytyrosol Against Cardiac Remodeling After Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rat. **Cardiovascular Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 147–155, 2016.

MOUNT, N. M. *et al.* Cell-based therapy technology classifications and translational

challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1680, 2015.

MULYASASMITA, W. *et al.* Avidity-controlled hydrogels for injectable co-delivery of induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells and growth factors. **Journal of Controlled Release**, v. 191, p. 71–81, 2014.

MURAYAMA, T. *et al.* Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 8, p. 967–972, 2002.

MURRY, C. E. *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature**, v. 428, n. 6983, p. 664–668, 2004.

MURRY, C. E.; REINECKE, H.; PABON, L. M. Regeneration Gaps. Observations on Stem Cells and Cardiac Repair. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 9, p. 1777–1785, 2006.

NAAHIDI, S. *et al.* Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 5, p. 530–544, 2017.

NACHLAS, A. L. Y. *et al.* Human iPSC-derived mesenchymal stem cells matured into valve interstitial-like cells using PEGDA hydrogels. **Acta Biomaterialia**, 2018.

NAKAMURA, T. *et al.* Myocardial protection from ischemia / reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF Teruya Nakamura , ... , Hikaru Matsuda , Toshikazu Find the latest version : Myocardial protection from ischemia / reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. 2000.

NALDINI, L. Gene therapy returns to centre stage. **Nature**, v. 526, n. 7573, p. 351–360, 2015.

NUSSBAUM, J. *et al.* Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 7, p. 1345–1357, 2007.

OIKONOMOPOULOS, A.; KITANI, T.; WU, J. C. Pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a platform for cell therapy applications: Recent progress and obstacles for clinical translation. **Molecular Therapy**, 2018.

OLIVEIRA, W. F. *et al.* Titanium dioxide nanotubes functionalized with Cratylia mollis seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science and Engineering C**, v. 90, n. August 2017, p. 664–672, 2018.

OSMAN, A.; ONER, E. T.; EROGLU, M. S. Novel levan and pNIPA temperature sensitive hydrogels for 5-ASA controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 165, p. 61–70, 2017.

PARTLOW, B. P. *et al.* Silk Fibroin Degradation Related to Rheological and Mechanical Properties. **Macromolecular Bioscience**, v. 16, n. 5, p. 666–675, 2016.

PASCUAL-GIL, S. *et al.* Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic

- biomaterials. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 23–38, 2015.
- PERIN, E. C.; SILVA, G. V. Stem cell therapy for cardiac diseases. **Current Opinion in Hematology**, v. 11, n. 6, p. 399–403, 2004.
- PERKINELMER. FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). **PerkinElmer Life and Analytical Sciences**, p. 1–5, 2005.
- PLEGER, S. T. *et al.* Stable Myocardial-Specific AAV6-S100A1 Gene Therapy Results in Chronic Functional Heart Failure Rescue. p. 2506–2515, 2007.
- PRABHU, S. D.; FRANGOIANNIS, N. G. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 119, n. 1, p. 91–112, 2016.
- QIAO, H. *et al.* Long-term improvement in postinfarct left ventricular global and regional contractile function is mediated by embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 4, n. 1, p. 33–41, 2011.
- R., R. *et al.* Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. **Disease Markers**, v. 35, n. 6, p. 773–790, 2013.
- REBOUÇAS, J. DE S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; FORMIGA, F. R. Cardiac Regeneration using Growth Factors: Advances and Challenges. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 271–275, 2016.
- RISBUD, M.; BHONDE, M.; BHONDE, R. Chitosan-Polyvinyl Pyrrolidone Hydrogel Does Not Activate Macrophages : Potentials for Transplantation Applications. v. 10, p. 195–202, 2001.
- ROCKWOOD, D. N. *et al.* Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. **Nature Protocols**, v. 6, 2011.
- ROTH, G. A. *et al.* Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 2017.
- SALEEM, M. *et al.* Correlation between shoulder pain and functional disability among nurses. **Rawal Medical Journal**, v. 43, n. 3, p. 483–485, 2018.
- SHEIKH, A. Y. *et al.* Molecular Imaging of Bone Marrow Mononuclear Cell Homing and Engraftment in Ischemic Myocardium. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2677–2684, 2007.
- SHENG, C. C.; ZHOU, L.; HAO, J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- SHI, C. *et al.* Stem-cell-capturing collagen scaffold promotes cardiac tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2508–2515, 2011.
- SHIM, W. S. N. *et al.* Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 481–488, 2004.

- SILVA, D. N. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor-overexpressing mesenchymal stem cells exhibit enhanced immunomodulatory actions through the recruitment of suppressor cells in experimental chagas disease cardiomyopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, p. 1–12, 2018.
- SILVA, S. S. *et al.* Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2764–2774, 2008.
- SONG, Y. *et al.* An injectable silk sericin hydrogel promotes cardiac functional recovery after ischemic myocardial infarction. **Acta Biomaterialia**, v. 41, p. 210–223, 2016.
- SOUZA, C. C. DE *et al.* Desenvolvimento e caracterização de formulação tópica de extrato de uvarana para tratamento de feridas. **Eletronic Journal of Pharmacy**, v. XIII, n. 3, p. 191–200, 2016.
- SOUZA, C. F. DE *et al.* Mioblasto Esquelético : um justo abandono ? v. 24, n. 2, p. 105–111, 2011.
- SU, F. *et al.* Biocompatibility and in vivo degradation of chitosan based hydrogels as potential drug carrier. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 13, p. 1515–1528, 2018.
- SUN, W. *et al.* Viability and neuronal differentiation of neural stem cells encapsulated in silk fibroin hydrogel functionalized with an IKVAV peptide. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1532–1541, 2017.
- TAIMEH, Z. *et al.* Vascular endothelial growth factor in heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 10, n. 9, p. 519–530, 2013.
- TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.
- 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. 663–676, 2006.
- TAMADA, Y. New process to form a silk fibroin porous 3-D structure. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 6, p. 3100–3106, 2005.
- TANAI, E.; FRANTZ, S. Pathophysiology of heart failure. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 1, p. 187–214, 2016.
- TEICH, V.; ARAUJO, D. V. Estimativa de Custo da Síndrome Coronariana Aguda no Brasil | Estimated Cost of Acute Coronary Syndrome in Brazil. **Revista Brasileira de Cardiologia**, v. 24, n. 2, p. 85–94, 2011.
- TIASH, S.; KAMARUZMAN, N. I. B.; CHOWDHURY, E. H. Carbonate apatite nanoparticles carry siRNA(S) targeting growth factor receptor genes egfr1 and erbb2 to regress mouse breast tumor. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1721–1730, 2017.

TOH, W. S.; LOH, X. J. Advances in hydrogel delivery systems for tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 690–697, 2015.

TRAVERSE, J. H. *et al.* Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: The time randomized trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 22, p. 2380–2389, 2012.

TURKHEIMER, E.; WALDRON, M. No Title عمان سلطنة. **Psychological Bulletin**, v. 126, n. 1, p. 21, 2019.

VELEIRINHO, B. *et al.* Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly(ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 37–46, 2012.

WANG, H. *et al.* Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 3986–3998, 1 abr. 2014.

WANG, X. *et al.* Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1054–1064, 2008.

WANG, Y. *et al.* Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. **Biomaterials**, v. 27, n. 36, p. 6064–6082, 2006.

WILKINS, E. *et al.* European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition. **European Heart Network, Brussels**, p. 192, 2017.

WU, J. *et al.* Infarct stabilization and cardiac repair with a VEGF-conjugated, injectable hydrogel. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 579–586, 2011.

XIA, Z.; TRIFFITT, J. T. A review on macrophage responses to biomaterials. **Biomedical Materials**, v. 1, n. 1, 2006.

YANG, M.-C. *et al.* The influence of rat mesenchymal stem cell CD44 surface markers on cell growth, fibronectin expression, and cardiomyogenic differentiation on silk fibroin – Hyaluronic acid cardiac patches. **Biomaterials**, v. 31, n. 5, p. 854–862, 2009.

YIN, H. *et al.* Functionalized thermosensitive hydrogel combined with tendon stem / progenitor cells as injectable cell delivery carrier for tendon tissue engineering Functionalized thermosensitive hydrogel combined with tendon stem / progenitor cells as injectable cell. **Biomedical Materials**, v. 13, n. 3, p. 034107, 2018.

YIN, Z. *et al.* A silk fibroin hydrogel with reversible sol–gel transition. **RSC Adv.**, v. 7, n. 39, p. 24085–24096, 2017.

ZHANG, Y.-Q. *et al.* Formation of silk fibroin nanoparticles in water-miscible organic solvent and their characterization. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 5, p. 885–900, 2007.

ZONG, C. *et al.* Biocompatibility and bone-repairing effects: Comparison between porous

poly-lactic-Co-glycolic acid and nano-hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1091–1104, 2014.