

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

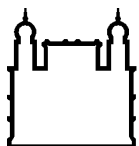
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**PAPEL DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR CÉLULAS RESIDENTES
CARDÍACAS COMO POTENCIAIS INDUTORAS DA DIFERENCIAÇÃO
CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS**

THAMILE LUCIANE REUS

CURITIBA/PR

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

THAMILE LUCIANE REUS

PAPEL DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR CÉLULAS RESIDENTES
CARDÍACAS COMO POTENCIAIS INDUTORAS DA DIFERENCIAÇÃO
CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos
Chagas como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador (es): Dr. Marco Augusto Stimamiglio
Dra. Alessandra Melo de Aguiar

CURITIBA/PR

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

R445 Reus, Thamile Luciane

Papel das proteínas secretadas por células residentes cardíacas como potenciais indutoras da diferenciação cardiomiogênica de células-tronco humanas / Thamile Luciane Reus. – Curitiba, 2015.
xix, 133 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia, 2015.
Bibliografia: f. 117-128

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Células cardíacas. 3. Aurícula. 4. Ventrículo. 5. Matriz extracelular. 6. Meio condicionado. I. Título.

CDD 616.123



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de **dissertação** para obtenção do grau de **Mestre** em
Biociências e Biotecnologia.

Aos 24 dias do mês de Fevereiro de dois mil e quinze, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: **Dra. Iriane Eger, Dr. Guilherme Ferreira Silveira e Dr. Ricardo Castilho Garcez**, com a finalidade de julgar a **dissertação** da candidata **Thamile Luciane Reus**, intitulada: "**Papel das proteínas secretadas por células residentes cardíacas como potenciais indutoras da diferenciação cardiomiogênica de células-tronco humanas**", sob a orientação de **Marco Augusto Stimamiglio e Alessandra Melo de Aguiar**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dra. Iriane Eger**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

- Aprovação da tese por unanimidade
- Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).
- Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2015

Prof. Dra. Iriane Eger
ICC / FIOCRUZ

Prof. Dr. Guilherme Ferreira Silveira
ICC / FIOCRUZ

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

UFSC

Candidato(a):

À minha família, meu alicerce, por todo o apoio e ao meu noivo, pela paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu o dom da vida e que me colocou neste caminho por razões que só Ele sabe! Agradeço a minha família, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me ajudando para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigada por estarem ao meu lado nos dias bons e ruins, não poderia ter nascido em uma família melhor!

Agradeço ao meu noivo, Maurício, pela força, companheirismo e principalmente paciência durante estes dois anos. Não foram fáceis, mas vencemos! Obrigada por estar ao meu lado mesmo quando nem eu mesma me aguentava.

Agradeço aos meus amigos, que mesmo longe, se fizeram sempre presentes e também aos amigos que aqui fiz.

Agradeço aos meus orientadores Dra. Alessandra Melo de Aguiar e Dr. Marco Augusto Stimamiglio por terem me aceitado mesmo sem me conhecer. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelo apoio nas horas difíceis e por ter confiado em mim para a realização do projeto. Obrigada por aguentarem meus momentos de desespero, sempre buscando me colocar pra cima! Meu muito obrigada!

Agradeço também ao Dr. Bruno Dallagiovanna e Dr. Alejandro Correa por permitirem que fizesse parte do grupo. Muito obrigada pelas sugestões, discussões e apoio durante o desenvolvimento do projeto.

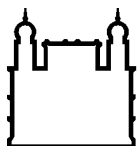
Agradeço a todos do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco LABCET por todos os momentos vividos e pelo apoio e companheiro: Crisciele Kuligovski, Axel Cofré, Patrícia Shigunov, Jaiesa Zych, Andressa Schittini, Ana Carolina Origa, Bruna Marcon, Elizabeth de Moraes, Addeli Angulski, Natássia Corrêa e a todos os amigos do Instituto Carlos Chagas. Em especial, gostaria de agradecer a Anny Robert pela ajuda durante todo o projeto, pela amizade e por tanto ter me ensinado!

Ao Dr. Fabricio Marchini e ao Dr. Michel Batista pela ajuda com as análises proteômicas, assim como a plataforma PDTIS.

Ao Banco de Homoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba pelo fornecimento dos fragmentos cardíacos utilizados nesse trabalho.

Ao Itamar Crispim pelo auxílio com as fotos e imagens.

Ao pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas, que forneceram as condições físicas e materiais para realização deste trabalho. Também as agências de fomento e fontes financiadoras desse projeto: FIOCRUZ, Fundação Araucária, CNPq, Capes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

PAPEL DAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS COMO POTENCIAIS INDUTORAS DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO HUMANAS

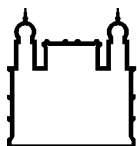
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thamile Luciane Reus

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas capazes de se autorrenovarem e diferenciarem em diversos tipos celulares; estas células têm sido amplamente avaliadas quanto ao uso em terapias para doenças cardiovasculares, visando recuperar o tecido cardíaco danificado. É sabido que o comportamento biológico das CTMs depende do microambiente onde se encontram, que é composto principalmente por células, matriz extracelular (MEC) e fatores solúveis. Desta forma, isolamos células residentes cardíacas através da cultura de explantes de aurícula e ventrículo cardíaco humano e realizamos a caracterização do fenótipo destas células, bem como de proteínas de MEC e do meio condicionado (fatores solúveis) secretados por elas. Constatamos que ambas as populações celulares são compostas por CTMs, fibroblastos cardíacos e possivelmente pericitos/miofibroblastos. Realizamos o cultivo destas células e isolamos a MEC por meio da desculturização das monocamadas celulares com uma solução de Triton X-100 0,5%. Por outro lado, obtivemos o meio condicionado (MC) de ambas as populações celulares e observamos que estes são compostos por diversas proteínas, muitas das quais sendo relacionadas aos processos de regulação da diferenciação celular, desenvolvimento e reparo tecidual. Devido ao fato destas populações celulares serem populações heterogêneas compostas de células encontradas no coração, procuramos avaliar o papel das proteínas de MEC e do MC secretados por elas em cultivos de CTMs. Primeiramente, observamos através de ensaios de viabilidade celular e morte por apoptose e necrose, que as MEC e os MCs não foram tóxicos para os cultivos de CTMs. Observamos que a MEC derivada de células de aurícula induziu redução da taxa de proliferação das CTMs em 24 horas. Em contrapartida, após 7 dias, o número de CTMs cultivadas na presença de ambos os MCs aumentou significativamente em relação ao controle, sugerindo um papel destas proteínas secretadas como indutoras da proliferação celular. Em relação a adesão, observamos que as MECs não influenciaram o número de CTMs aderidas em comparação com o controle de colágeno tipo I. Da mesma forma, não observamos diferença na taxa de migração e na marcação para GATA-4 e Troponina-I entre os grupos controle e os cultivados na presença das MECs e/ou MCs. Embora não tenhamos observado diferença nestes parâmetros, ao menos nas condições avaliadas neste estudo, conseguimos demonstrar através deste trabalho que as populações celulares derivadas de aurícula e ventrículo são secretoras ativas de diversas proteínas relacionadas a processos de desenvolvimento celular e possivelmente ao reparo do tecido cardíaco. Portanto, estas células podem representar uma importante fonte de fatores tróficos a ser avaliada como indutora de estímulos em células progenitoras com objetivos terapêuticos em lesões cardiovasculares.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; células cardíacas; aurícula; ventrículo; matriz extracelular; meio condicionado;



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ROLE OF PROTEINS SECRETED BY RESIDENT CARDIAC CELLS AS POTENTIAL INDUCERS OF HUMAN STEM CELLS CARDIOMYOGENIC DIFFERENTIATION

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thamile Luciane Reus

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells that are capable to self-renew and differentiate into many cell types. These cells have been largely evaluated when it comes to therapies for cardiovascular diseases in order to recover the damaged tissue. It is known that the biological behavior of MSCs depends on the microenvironment where they are, which is mainly composed of cells, extracellular matrix (ECM) and soluble factors. Thus, we isolated resident cardiac cells from human auricle and ventricle by explant culture technique and then we characterized these cells' phenotype, ECM and conditioned medium (soluble factors). We found that both cell populations are composed of MSCs, cardiac fibroblasts and possibly pericytes/myofibroblasts. These cells were cultured on monolayer and then we isolated their ECM by decellularization with a Triton X-100 0.5% solution. On the other hand, we obtained conditioned medium (CM) by both cell populations. We observed that the CMs are composed of several proteins, many of them related to regulatory processes of cell differentiation, development and tissue repair. Because both cell populations are heterogeneous and composed of cells found in the heart, we aimed to evaluate the role of ECM and CM proteins secreted by these cells on MSCs. First, we observed that ECMs and CMs were nontoxic to MSC cultures by cell viability and death by apoptosis and necrosis assays. We also observed that ECM derived of auricle cells reduced proliferation rate of MSCs in 24 hours. However, after 7 days, the number of MSCs significantly increased in the presence of both CMs when compared to the control, suggesting that the proteins found in CMs have a role as inducers of cell proliferation. Regarding cell adhesion, we observed that both ECMs did not influence the number of MSCs adhered when compared to the collagen type I control. Similarly, we did not observe any difference in migration rate and staining for GATA-4 and troponin I between control and ECMs and/or CMs groups. Even though we did not see any difference in these parameters, at least under the conditions evaluated in this study, we have demonstrated that cell populations derived from auricle and ventricle consist in active secretors of many proteins related to cell development processes and possibly related to cardiac tissue repair. Therefore, these cells may represent an important source of thopmic factors to be evaluated as stimuli inducers in progenitor cells for therapeutic purposes in cardiovascular injuries.

Keywords: mesenchymal stem cells; cardiac cells; auricle; ventricle; extracellular matrix, conditioned medium;

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação dos fatores de transcrição e fatores de crescimento cardiogênicos.....	23
FIGURA 1.2 - Representação das funções dos fibroblastos cardíacos.....	24
FIGURA 1.3 - Eventos e fases envolvidas no remodelamento após o infarto.....	29
FIGURA 1.4 - Características das células-tronco.....	30
FIGURA 1.5 - Diferentes tipos de células-tronco classificadas quanto a sua potencialidade.....	31
FIGURA 1.6 - Multipotencialidade das CTMs.....	34
FIGURA 1.7 - Propriedades das CTMs.....	35
FIGURA 1.8 - Diferentes fontes de células-tronco (CT) para a geração de cardiomiócitos <i>in vitro</i>	37
FIGURA 1.9 - Componentes do nicho das células-tronco.....	41
FIGURA 1.10 - Componentes do nicho cardíaco secretados por fibroblastos.....	43
FIGURA 1.11 - Revisão esquemática dos fatores do nicho cardíaco e do desenvolvimento do nicho do embrião ao adulto.....	44
FIGURA 1.12 - Regulação do comportamento das células pela matriz extracelular.....	46
FIGURA 3.1 - Fluxograma representativo das etapas experimentais.....	52
FIGURA 3.2 - Cultivo de explantes para o isolamento de células cardíacas humanas.....	54
FIGURA 3.3 - Esquema do protocolo de coleta do meio condicionado.....	58
FIGURA 3.4 - Esquema do protocolo de descelularização.....	59
FIGURA 3.5 - Modelo esquemático da metodologia de arranjo de anticorpos.....	65
FIGURA 4.1 - Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo MARTINI e colaboradores (2013).....	76

FIGURA 4.2 -	Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo HARTMANN e colaboradores (2007).....	76
FIGURA 4.3 -	Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo DeQuach e colaboradores (2010).....	76
FIGURA 4.4 -	Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares padronizado para uso neste trabalho..	77
FIGURA 4.5 -	Gel de DNA (agarose 1%) para amostras não-descelularizadas (A, V) e descelularizadas (AD1, AD2, VD1, VD2).....	78
FIGURA 4.6 -	Identificação de proteínas de MEC em cultivos de células cardíacas humanas derivadas de aurícula (Fibronectina, Decorina, Colágeno tipo I, Fibulina-2), controle e descelularizados.....	79
FIGURA 4.7 -	Identificação de proteínas de MEC em cultivos de células cardíacas humanas derivadas de ventrículo (Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I, Fibulina-2), controle e descelularizados.....	80
FIGURA 4.8 -	Imagens representativas das imunomarcações para as proteínas de MEC (Laminina, Lumincan, Sindecin 4, Colágeno tipo III) nos cultivos íntegros de células de aurícula e ventrículo.....	80
FIGURA 4.9 -	Perfil de citocinas detectadas por CBA em amostras de meio condicionado coletados de células cardíacas de aurícula e de células cardíacas de ventrículo.	83
FIGURA 4.10 -	Detecção de proteínas por arranjo de anticorpos. Representação das membranas de anticorpos.....	84
FIGURA 4.11 -	Proteínas detectadas por arranjo de anticorpos em amostras de meio condicionado coletados de células cardíacas de aurícula e de células cardíacas de ventrículo.	84
FIGURA 4.12 -	Processos relacionados com as proteínas encontradas no MC por células derivadas de explantes de aurícula.....	89

FIGURA 4.13 - Processos relacionados com as proteínas encontradas no MC por células derivadas de explantes de ventrículo.....	90
FIGURA 4.14 - Representação das proteínas detectadas no MC por células derivadas de explantes de aurícula através de espectrometria de massas (verde), CBA (rosa) e arranjo de anticorpos (azul)...	92
FIGURA 4.15 - Representação das proteínas detectadas no MC por células derivadas de explantes de ventrículo através de espectrometria de massas (verde), CBA (rosa) e arranjo de anticorpos (azul)...	93
FIGURA 4.16 - Viabilidade celular relativa (% viabilidade em relação ao controle) de aCTMs.....	96
FIGURA 4.17 - Avaliação da morte celular pela marcação com Anexina-V e 7-AAD de aCTMs.....	98
FIGURA 4.18 - Avaliação da proliferação celular de aCTMs.....	99
FIGURA 4.19 - Avaliação da adesão celular de aCTMs.....	101
FIGURA 4.20 - Ensaio de migração celular: área da migração. Imagens representativas do ensaio de migração celular de aCTMs nos tempos 0 e 12 horas.....	103
FIGURA 4.21 - Ensaio de migração celular: quantificação do número de células que migraram.....	104
FIGURA 4.22 - Avaliação da diferenciação cardiomiogênica: % de células positivas para GATA-4 e Tnl.....	106
FIGURA 4.23 - Avaliação da diferenciação cardiomiogênica em relação à área de marcação para GATA-4 e Tnl.....	107
FIGURA 4.24 - Avaliação da diferenciação cardiomiogênica através da marcação nuclear de Gata-4.....	107
FIGURA 4.25 - Imagens representativas das imunomarcações para GATA-4 em aCTMs após 7 dias de cultivo em diferentes condições.....	111
FIGURA 4.26 - Imagens representativas das imunomarcações para troponina-I (Tnl) em aCTMs após 7 dias de cultivo em diferentes condições.....	112
FIGURA 4.27 - Efeito do MC no aumento do número de células em 7 dias de cultivo.....	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Anticorpos testados para o reconhecimento de fatores de crescimento e citocinas nos MCs.....	63
TABELA 4.1 - Percentual de células positivas para diferentes marcadores de superfície celular dentro das populações celulares derivadas de explantes cardíacos de aurícula e ventrículo.....	73
TABELA 4.2 - Quantidade de DNA encontrada antes (Aurícula, Ventrículo) e depois da descelularização (AD1, AD2, VD1, VD2).....	77
TABELA 4.3 - Proteínas identificadas por espectrometria de massas em MC por células derivadas de explantes de aurícula (coluna 1) e ventrículo (coluna 2).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-aza	- 5-azacitidina
7-AAD	- 7-aminoactinomicina D
aCTMs	- Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano
ACTN1	- Proteína ACTN1
ANG-1	- Angiopoetina 1
ANXA1	- Anexina A1
APC	- Aloficocianina
APRIL	- Ligante do indutor de proliferação
BGN	- Biglicano
BLC	- Proteína quimioatraente de linfócitos B
BMP	- Proteína morfogenética óssea
BMP-2	- Proteína morfogenética óssea 2
BMP-4	- Proteína morfogenética óssea 4
BSA	- Albumina sérica bovina
BTC	- Betacelulina
CAC	- Células angiogênicas circulantes
Cat.	- Número do catálogo
CBA	- do inglês “Cytometric Bead Array”
CCDC88A	- Proteína CCDC88A
CCL28	- Quimiocina com motivo C-C ligante 28
CCT6A	- Subunidade zeta da proteína do complexo T
CLEC11A	- Domínio da lectina C-tipo da família 11 membro A
CO ₂	- Gás carbônico ou dióxido de carbono
COL12A1	- Colágeno tipo XII alfa 1
COL1A1	- Colágeno tipo I alfa 1
COL1A2	- Colágeno tipo I alfa 2
COL3A1	- Colágeno tipo III alfa 1
COL5A2	- Colágeno tipo V alfa 2
COL6A1	- Colágeno tipo VI alfa 1
COL6A2	- Colágeno tipo VI alfa 2
COL6A3	- Colágeno tipo VI alfa 3
Controle MC	- Controle do Meio condicionado (meio sem condicionar)
CT	- Células-tronco
CT-1	- Cardiotrofina 1
CTAK	- Quimiocina atrativa de células T cutâneas
CTMs	- Células-tronco mesenquimais
Cx43	- Conexina 43
CXCL14	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 14
CXCL16	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 16
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
DCAF5	- Fator 5 associado a DDB1 e CUL4
DCN	- Decorina
DDR-2	- Receptor do domínio de discoidina 2
DKK1	- Proteína relacionada a Dickkopf 1
DMEM	- “Dulbecco’s modified eagle medium”
DMSO	- Dimetilsufóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico

D-PBS	- “Dulbecco’s phosphate buffered saline”; pbs com cloreto de magnésio e cloreto de cálcio
DTT	- Ditioneitol
ECM1	- Proteína de matriz extracelular 1
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EFEMP1	- Proteína da matriz extracelular 1 semelhante a fibulina contendo EGF
EGF	- Fator de crescimento epidermal
ENA-78	- Peptídeo 78 ativador de neutrófilos epiteliais
ENO1	- Alfa-enolase
FASP	- “Filter aided proteome preparation”
FBN1	- Fibrilina-1
FGF	- Fator de crescimento de fibroblasto
FGF-6	- Fator de crescimento de fibroblasto 6
FGF-b/bFGF	- Fator de crescimento básico de fibroblasto
FITC	- Isotiocinato de fluoresceína
FLNA	- Filamina-A
Flt-3L	- Tirosina kinase 3 semelhante a fms
FN1	- Fibronectina 1
FSP1	- Proteína específica de fibroblastos
FSTL1	- Proteína 1 relacionada a folistatina
GAGs	- Glicosaminoglicanas
GCP-2	- Proteína quimiotática de granulócito 2
G-CSF	- Fator estimulador de colônia de granulócito
GM-CSF	- Fator estimulador de colônia de macrófago-granulócito
GML	- Proteína semelhante a molécula ancorada de glicosil-fosfatidilinositol
GRO	- Regulador do crescimento de oncogene
GSK3	- Glicogênio sintase quinase 3
HB-EGF	- Fator de crescimento semelhante a EGF ligante de heparina
hCG_1811539	- Do inglês “HCG1811539 isoform CRA_b
HEL107	- Transquetolase
HEL-S-270	- Anexina
HEL-S-7	- Anexina
HGF	- Fator de crescimento de hepatócito
HSPG2	- Perlecan
IAA	- Iodocetamida
IFN-g	- Interferon gama
IGF-1	- Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGFBP-1	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGFBP-2	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 2
IGFBP-4	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 4
IGFBP7	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 7
IgG	- Imunoglobulina G
IL-12p70	- Interleucina 12
IL-16	- Interleucina 16
IL-17 A	- Interleucina 17
IL-1b/IL-1β	- Interleucina 1 beta

IL-2	- Interleucina 2
IL-3	- Interleucina 3
IL-4	- Interleucina 4
IL-6	- Interleucina 6
IL-8	- Interleucina 8
ILS1	- do inglês "Islet1"
IP-10	- Proteína induzida por interferon gama 10
iPSCs	- Células-tronco pluripotentes induzidas
I-TAC	- Quimioatraente de células t induzidas por interferon
KPNB1	- Subunidade beta-1 da importina
LAMA4	- Laminina subunidade alfa-4
LAMB1	- Proteína LAMB1
LAMC1	- Proteína LAMC1
LGALS3BP	- Proteína de ligação a galectina-3
LIF	- Fator inibitório de leucemia
LUM	- Lumican
M1	- Macrófagos tipo 1
M2	- Macrófagos tipo 2
MC	- Meio condicionado
MC Aurícula	- Meio condicionado por células derivadas de aurícula
MC Ventrículo	- Meio condicionado por células derivadas de ventrículo
MCa	- Meio condicionado por células derivadas de aurícula
MCI	- Massa celular interna
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos 1
MCSF	- Fator específico de macrófago estimulador de colônia
MCv	- Meio condicionado por células derivadas de ventrículo
MEC	- Matriz extracelular
MEC Aurícula	- Matriz extracelular de células derivadas de aurícula
MEC Ventrículo	- Matriz extracelular de células derivadas de ventrículo
MEF2	- do inglês "Myocyte Enhancer Factor 2"
MIP-1 α	- Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MMC Aurícula	- Matriz extracelular e Meio condicionado de células derivadas de aurícula
MMC Ventrículo	- Matriz extracelular e Meio condicionado de células derivadas de ventrículo
MMP	- Metaloproteinase
MMP-1/MMP1	- Metaloproteinase 1
MMP-13	- Metaloproteinase 13
MMP-2/MMP2	- Metaloproteinase 2 ou colagenase tipo IV
MMP-3/MMP3	- Metaloproteinase 3
Mono	- Monócito
MPIF-1	- Fator inibitório de progenitores mielóides
MYH13	- Miosina-13
Neutro	- Neutrófilo
NH ₄ OH	- Hidróxido de amônio
NUCB1	- Nucleobindina-1
OSM	- Oncostatina
P4HB	- Proteína dissulfeto isomerase
P4HB	- Proteína dissulfeto isomerase
PBS	- Tampão fosfato salino
PCOLCE	- do inglês "Procollagen C-endopeptidase enhancer 1"
PDGF-AB	- Fator de crescimento derivado de plaquetas AB

PE	- Ficoeritrina-P
PE-Cy7	- Ficoeritrina-P/cianina 7
PFA	- Paraformaldeído
PLOD2	- Pró-colágeno-lisina 2-oxoglutarato 5-dioxigenase
PLS3	- Plastina 3
PLTP	- Proteína de transferência de fosfolípidos
POGZ	- Elemento transponível pogo com domínio ZNF
POSTN	- Periostina
PRDX1	- Peroxiredoxina-1
PRDX6	- Peroxiredoxina-6
PSAP	- Proteína PSAP
PTX3	- Proteína relacionada a pentraxina PTX3
PXDN	- Homólogo da peroxidase
RANTES	- Quimiocina regulada por ativação, secretada e expressa por células T normais
RNA _m	- Ácido ribonucleico mensageiro
SCF	- Fator de células-tronco
SDF-1	- Fator derivado de células estromais 1
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
SERPINE1	- Serpina membro 1
SERPINE2	- Serpina membro 2
SERPINF1	- Inibidor da peptidase serpina clade F membro 1
SERPING1	- Inibidor da protease do plasma C1
SERPINH1	- Serpina H1
SFB	- Soro fetal bovino
SOST	- Esclerotina
SPARC	- Osteonectina
SRF	- Fator de resposta ao soro
STC2	- Estaniocalcina-2
TALDO1	- Transaldolase
TARC	- Quimiocina do timo regulada por ativação
TECK	- Quimiocina expressa pelo timo
TGF- α	- Fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β	- Fator de transformação do crescimento beta
TGF- β 1	- Fator de transformação do crescimento beta 1
THBS1	- Trombospondina-1
TIMP1	- Inibidor de metaloproteinase 1
TNC	- Tenascina
TNF	- Fator de necrose tumoral
TNFAIP6	- Proteína 6 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
Tnl	- Troponina I
TnT	- Troponina T
TPO	- Trombopoetina
TRA1	- Endoplasmina
TSLP	- Linfopoetina estromal tímica
TWEAK	- Indutor de apoptose fraco relacionado ao fator de necrose tumoral
VASN	- Vasorina
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular

VIM	- Vimentina
VN	- Vermelho neutro
VWF	- Fator de von willebrand
WISP-1	- Proteína sinalizadora da via WNT 1
α -SMA	- Actina de músculo liso tipo alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
min	- minuto(s)
h	- hora(s)
Da	- daltos
ng	- nanograma
mg	- miligrama
pb	- pares de base
TM	- trademark
µg/ml	- micrograma por mililitro
U/ml	- unidades por mililitro
mm ³	- milímetro cúbico
G	- grama
cm ²	- centímetro quadrado
mL	- mililitro
C	- graus celsius
µm	- micrmetro
kDa	- quilodlton
mg/ml	- miligrama por mililitro
x g	- multipliccao pela aceleracao gravitacional
pH	- potencial hidrogeniônico
M	- molar ou mol/L
µl	- microlitro
mA	- milimpere
V	- Volt
µg	- micrograma
Mm	- milimolar
nm	- nanmetro
Inc	- "Incorporated"
Rpm	- rotaces por minuto
mm	- milímetro
S	- segundo (s)
p	- significância

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xvi
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O CORAÇÃO E SEU DESENVOLVIMENTO.....	20
1.2 CÉLULAS CARDÍACAS RESIDENTES.....	23
1.3 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	27
1.4 CÉLULAS-TRONCO.....	30
1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	33
1.6 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR.....	36
1.7 NICHO TECIDUAL E CÉLULAS-TRONCO.....	40
1.8 MATRIZ EXTRACELULAR E DESCELULARIZAÇÃO.....	45
2 OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO.....	52
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	52
3.3 COLETA DO TECIDO CARDÍACO.....	53
3.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS.....	53
3.5 MANUTENÇÃO E REPIQUE CELULAR.....	55
3.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS CARDÍACAS DERIVADAS DE AURÍCULA E VENTRÍCULO.....	56
3.7 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS.....	57
3.8 DESCELULARIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS CARDÍACAS PARA OBTENÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR.....	58
3.9 CONFIRMAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO.....	59
3.9.1 DETECÇÃO DE NÚCLEOS POR FLORESCÊNCIA.....	59

3.9.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA PARA CONFIRMAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO.....	60
3.10 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR POR IMUNOFLORESCÊNCIA.....	60
3.11 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTIFICAÇÃO.....	61
3.12 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS SECRETADAS E PRESENTES NO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS.....	62
3.12.1 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	62
3.12.2 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS.....	62
3.12.3 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	65
3.13 ENSAIOS FUNCIONAIS.....	66
3.13.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO.....	67
3.13.2 ANÁLISE DA MORTE CELULAR POR MARCAÇÃO DE ANEXINA-V E 7-AMINOACTINOMICINA D.....	68
3.13.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	69
3.13.4 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR.....	69
3.13.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR.....	70
3.13.6 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA – Avaliação de marcadores de diferenciação cardíaca por imunofluorescência.....	70
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS CARDÍACAS DERIVADAS DO CULTIVO DE EXPLANTES DE AURÍCULA E VENTRÍCULO – População celular heterogênea.....	72
4.2 DESCELULARIZAÇÃO DAS MONOCAMADAS CELULARES – Padronização de protocolo combinado de Triton X-100, NH ₄ OH E DNase 1.....	75
4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR –	

Descelularização altera a composição da MEC.....	78
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS – Elementos relacionados ao reparo cardíaco e regeneração tecidual.....	81
4.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR RELATIVA - MEC e MCs não são citotóxicos.....	95
4.6 ANÁLISE DA MORTE CELULAR - MECs e MCs não levam a morte celular por necrose ou apoptose.....	97
4.7 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – MEC de aurícula promove menor proliferação celular.....	99
4.8 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR – MECs derivadas de células cardíacas promovem adesão de aCTMs semelhante ao controle de colágeno tipo I.....	101
4.9 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR – MECs e MCs derivados de células cardíacas promovem migração de aCTMs semelhante ao controle de colágeno tipo I.....	103
4.10 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA - MECs alteram a morfologia celular e MCs levam a um significativo aumento no número de células.....	105
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	115
6 REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICES.....	129
ANEXO.....	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CORAÇÃO E SEU DESENVOLVIMENTO

Em mamíferos, o coração é um órgão muscular que age como uma bomba mecânica para a circulação do sangue no organismo, sendo composto de quatro câmaras destinadas a realizar distintos papéis funcionais: os átrios possuem a função de coletar o sangue e encher os ventrículos, ao passo que os ventrículos impulsionam sangue por todos os circuitos vasculares pulmonares e sistêmicos. Sua formação inicia de maneira complexa durante os primórdios da gastrulação, sendo o primeiro órgão que se torna funcional no embrião vertebrado, já que sua função precisa ser realizada no embrião enquanto este ainda está em processo de formação. Em humanos, o início da pulsação ocorre com cerca de 20-23 dias de gestação (MOORE e PERSAUD, 2000; BRAND, 2003; DUNWOODIE, 2007).

Em humanos, o desenvolvimento cardíaco ocorre através de uma série de passos complexos envolvendo morfogênese e diferenciação celular, simultaneamente (HIGH e EPSTEIN, 2008). Sua morfogênese é complexa e contínua, sendo coordenada espacialmente e temporalmente. Inicia-se com a indução de células cardiogênicas da mesoderme lateral embrionária, havendo primeiramente a formação de dois tubos cardíacos endocárdicos. Ocorre então o dobramento lateral do embrião, momento em que esses tubos se unem dando origem ao coração tubular. Dada esta fusão, há a formação de duas camadas: uma externa chamada de miocárdio primordial a qual dará origem a parede muscular do coração – o miocárdio; e uma interna, o tubo endotelial o qual dará origem ao endocárdio. Ao ocorrer o dobramento da cabeça do embrião, o coração passa a localizar-se ventralmente ao intestino, sendo que neste momento já é dividido em 4 câmaras compostas pelo bulbo cardíaco o qual dará origem a parte dos ventrículos, o ventrículo, o átrio e o seio venoso. Após 4-8 semanas de gestação, o coração já é compartimentalizado nas 4 câmaras, havendo apenas um amadurecimento final para o seu desenvolvimento completo (MOORE e PERSAUD, 2000; WAGNER e SIDDIQUI, 2007).

Muitos dos processos envolvidos no desenvolvimento do coração dependem de interações celulares e teciduais mediadas por vias de transdução de sinais que permitem sinais instrutivos provenientes de uma célula ou tecido capazes de induzir

mudanças no comportamento de células e tecidos adjacentes. Diversas são as vias de sinalização responsáveis pela diferenciação de células da mesoderme em células cardíacas dentro do desenvolvimento cardíaco; estes sinais derivam das células adjacentes à mesoderme, como as células da endoderme ou neuroectoderme. Dentre estes sinais, temos: os sinais indutores das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs - “Bone morphogenetic proteins”), dos fatores de crescimento fibroblástico (FGFs – “Fibroblast growth factor”) e de algumas proteínas da via Wnt; e os sinais que controlam negativamente a diferenciação, como “Noggin” e outras proteínas da via Wnt (WAGNER e SIDDIQUI, 2007). Quando as vias de sinalização são ativadas, desencadeiam cascatas de sinalizações que culminam na produção de fatores de transcrição cardíacos, ativadores expressos principalmente no coração. Estes regulam a expressão de proteínas estruturais ou regulatórias, características de cardiomiócitos. Os primeiros e principais fatores de transcrição expressos são o GATA-4 e o NKX2.5, seguidos de MEF2C e membros da família Tbx (TBX 2, 5 e 20) (VAN WIJK *et al.*, 2007).

Durante as últimas décadas, novas evidências têm sido discutidas e estudadas em relação à diferentes fatores de transcrição que regulam o desenvolvimento e o crescimento cardíaco, bem como sua hipertrofia e/ou mesmo a insuficiência cardíaca. Um dos principais fatores de transcrição envolvidos na cardiomiogênese consiste em um fator da família GATA. Esta família é composta por 6 proteínas: GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, GATA-5 e GATA-6. As três primeiras estão relacionadas principalmente com hematopoiese e as três últimas associadas a tecidos derivados da endoderme e mesoderme. Dentre estes fatores, o GATA-4 é o fator de transcrição que está principalmente envolvido em eventos que induzem a cardiomiogênese, sendo essencial para a morfogênese cardíaca apropriada. Mutações do gene GATA-4, ou de seus cofatores, estão associadas com doenças cardíacas congênitas humanas e sobrecarga de pressão no coração. Todos os membros desta família de proteínas possuem dois domínios adjacentes do tipo “zinc finger”, permitindo-lhes a ligação a uma região específica nos promotores e/ou regiões regulatórias de seus genes alvo, sendo que além de possuir uma região de localização nuclear, interage também com Gsk3 (glicogênio sintase quinase 3) que regula sua concentração no núcleo (PIKKARAINEN *et al.*, 2004; PETERKIN *et al.*, 2005). Seus alvos podem ser as proteínas sarcoméricas, como troponina I (TnI) cardíaca, troponina T (TnT) cardíaca e a cadeia pesada da miosina α , ou ainda proteínas de membrana, como N-caderina, fatores de crescimento, como o peptídeo

natriurético atrial e outros fatores de transcrição, como MEF2 e NKX2.5 (ROSENTHAL e HARVEY, 2010).

Outro fator de transcrição cardiogênico essencial para o desenvolvimento cardíaco é o NKX2.5. Sua expressão começa a ser observada na mesoderme lateral anterior no dia embrionário 7.5 e mantém-se em altos níveis exclusivamente nas células musculares cardíacas por toda a vida. Este fator é essencial para a morfogênese cardíaca, para a maturação funcional dos cardiomiócitos ventriculares, para a formação e maturação do sistema condutor e para a manutenção da homeostase dos cardiomiócitos (AKAZAWA e KOMURO, 2005; revisado por SHIOJIMA e KOMURO, 2005).

Membros da família dos fatores de transcrição T-box (TBX) também são essenciais durante a regionalização cardíaca. Tbx5 e Tbx20 são fundamentais para iniciar e manter a programação genética do miocárdio. Tbx5 é expresso na mesoderme cardíaca durante os estágios iniciais do desenvolvimento e subsequentemente sua expressão se torna restrita à região posterior do coração. O Tbx20 também é expresso na mesoderme cardíaca e no coração em desenvolvimento, porém, diferentemente do Tbx5, permanece expresso em todo o coração. Outros membros, como Tbx2 e Tbx3, são responsáveis por reprimir a programação genética a fim de favorecer o desenvolvimento do sistema condutor e valvuloseptal. Tbx1 e Tbx18 permitem a alongação do tubo cardíaco nos polos anterior e posterior, respectivamente. Em suma, estes fatores T-box agem em diferentes circuitos moleculares, controlando a expressão de genes alvo através de diversas estratégias moleculares (revisado por SHIOJIMA e KOMURO, 2005; GREULICH *et al.* 2011). Ainda, existem os fatores MEF2 (do inglês – “Myocyte Enhancer Factor 2), os quais pertencem a família de MADS-box de fatores de transcrição. Dentre estes, existe o fator de transcrição MEF-2C, expresso na mesoderme cardíaca, o qual possui como função o desenvolvimento tanto do coração, quanto dos vasos sanguíneos. Além destes, existem ainda outros fatores como SRF (fator de resposta ao soro) (do inglês – “Serum response fator”) e Hand, os quais relacionam-se com o desenvolvimento do coração (revisado por SHIOJIMA e KOMURO, 2005).

Os principais fatores de transcrição e de crescimento relacionados ao desenvolvimento cardíaco estão representados na figura 1.1. Estas proteínas agem de forma conjunta com o objetivo de promover o correto desenvolvimento do coração.

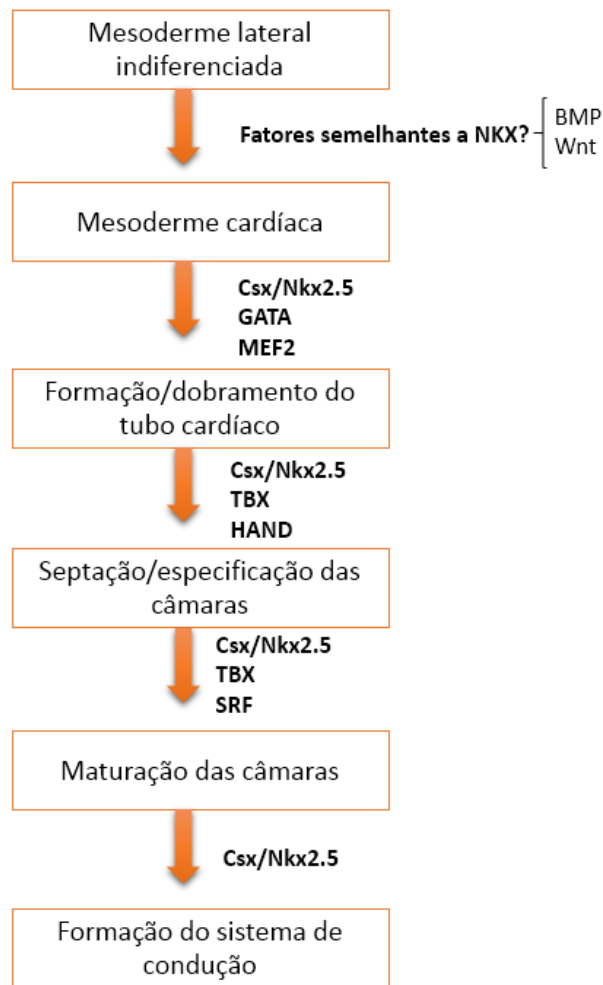


FIGURA 1.1: Representação dos fatores de transcrição e fatores de crescimento cardiogênicos. Cada etapa da formação do coração está representada pelas caixas e os fatores de transcrição e fatores de crescimento envolvidos nestas etapas durante a cardiogênese estão indicados ao lado das flechas.

Fonte: Adaptado de SHIOJIMA e KOMURO, 2005.

1.2 CÉLULAS CARDÍACAS RESIDENTES

Como descrito anteriormente, o desenvolvimento do coração inicia-se com o comprometimento de células-tronco pluripotentes indiferenciadas que, ao final, dão origem a células miocárdicas altamente especializadas derivadas da linhagem mesodérmica, como cardiomiócitos, células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos (YANG *et al.*, 2008; SOUDERS *et al.*, 2009; CHRISTALLA *et al.*, 2011). Muito embora os miócitos cardíacos ocupem aproximadamente 75% do volume de tecido do miocárdio, eles perfazem apenas de 30-40% do número total de células (GOLDSMITH *et al.*, 2004). A maioria das células que compõem o coração são não-miocitos, predominantemente fibroblastos (SNIDER *et al.*, 2009), os quais são

encontrados em todo o tecido cardíaco, ao redor dos miócitos, conectando os espaços entre as camadas de tecido miocárdico (BELTRAMI *et al.*, 2001). Estas células são de extrema importância para a síntese e deposição de MEC, geração do arcabouço cardíaco, além de serem responsáveis por isolar eletricamente os átrios dos ventrículos. Durante o desenvolvimento cardíaco, estas células são fundamentais para o crescimento dos cardiomiócitos e expansão das câmaras ventriculares (SNIDER *et al.*, 2009). Os fibroblastos cardíacos respondem aos estímulos de diversas maneiras, incluindo a secreção de citocinas e fatores de crescimento, diferenciação em miofibroblastos, proliferação, migração e alteração na geração/degradação da MEC (FIGURA 1.2) (SOUDERS *et al.*, 2009).

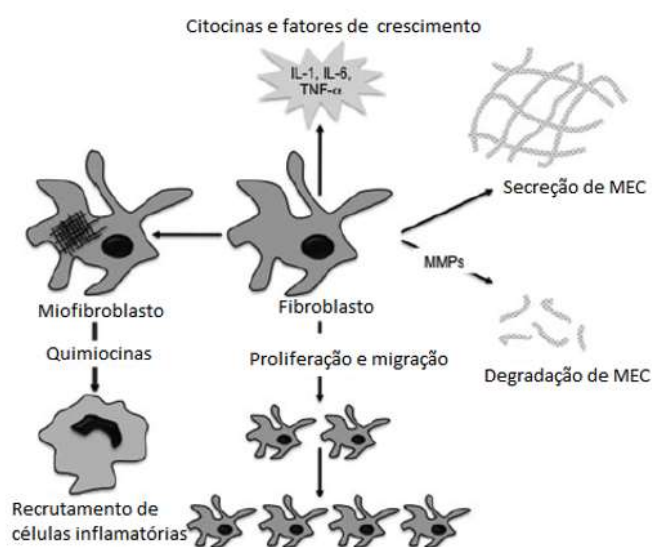


FIGURA 1.2: Representação das funções dos fibroblastos cardíacos.
 FONTE: Adaptado de SOUDERS *et al.*, 2009.

Dependendo do estágio do desenvolvimento do coração, os fibroblastos podem ser originados das mais diversas fontes. As células mesenquimais que dão origem a população de fibroblastos cardíacos derivam principalmente de duas fontes: do órgão pró-epicárdio e da transição epitélio-mesênquima durante a formação das valvas cardíacas. Inicialmente, durante o desenvolvimento embrionário, os fibroblastos possuem origem mesenquimal, estando intimamente ligados ao processo de formação do coração. Nesta fase, a maior fonte de fibroblastos cardíacos provém de células derivadas do epicárdio. Alguns estudos também já demonstraram que os fibroblastos podem ser originados de mesangioblastos, progenitores multipotentes que possuem a capacidade de se diferenciar em células vasculares (células endoteliais) ou tecidos mesodermiais, incluindo os fibroblastos.

Esses estudos ainda sugerem que há uma progressão dos mesangioblastos para células endoteliais e pericitos, os quais podem dar origem a miofibroblastos. Ainda, muitos estudos sugerem que pericitos e células-tronco mesenquimais da medula óssea possam contribuir para a manutenção da população de fibroblastos. Já no coração neonato e adulto, os fibroblastos são derivados de populações de células endógenas, através da transição epitélio-mesênquima e de células derivadas da medula óssea. Os fibroblastos são fundamentais para a rápida expansão do coração durante o desenvolvimento fetal e o crescimento neonatal, pelo fato de contribuírem para a construção da MEC de estruturas específicas do coração, como as válvulas, nodo atrioventricular, dentre outros. No coração adulto, a renovação dos fibroblastos cardíacos é baixa; nesta fase, estas células derivam-se de populações de fibroblastos endógenos e através da transição epitélio-mesênquima. Entretanto, sob condições patofisiológicas, como hipertrofia cardíaca ou infarto do miocárdio, os fibroblastos podem ser originados de células derivadas da medula óssea, gerando células denominadas fibrócitos. Estas células são responsáveis pela deposição de MEC durante a cicatrização de feridas e fibrose. Embora a identificação dos fibroblastos cardíacos tenha acontecido no final do século 19, pouco ainda se sabe acerca da origem e desenvolvimento dos mesmos (revisado por CAMELLITI *et al.*, 2005; SNIDER *et al.*, 2009; revisado por SOUDERS *et al.*, 2009).

Além dos miócitos, células endoteliais, células vasculares de músculo liso e fibroblastos cardíacos, o coração contém outros tipos celulares, como miofibroblastos, pericitos e células-tronco mesenquimais. Muito tem se estudado em relação à origem destas células e como elas se interrelacionam, haja visto que desempenham diferentes papéis na homeostasia cardíaca. Os miofibroblastos são células ativadas na fibrose reparativa, que, juntamente com células inflamatórias, desempenham uma resposta de cicatrização que envolve a fibrilogênese, culminando na formação de tecido cicatricial (WEBER *et al.*, 2013). Os pericitos contêm precursores multipotentes e são responsáveis pelo reparo e regeneração de tecidos defeituosos, principalmente músculo esquelético. Estudos apontam que o tratamento com este tipo celular é responsável pela redução da fibrose do miocárdio e diminuição da infiltração de células inflamatórias em áreas infartadas do coração, além de serem responsáveis pelo estímulo da angiogênese (CHEN *et al.*, 2013). Já as células-tronco mesenquimais são encontradas nos mais diversos tecidos, incluindo o coração. Estas células possuem a capacidade de regeneração, reparo e substituição do tecido danificado, permitindo o restabelecimento de sua função

através da modulação de processos como apoptose, angiogênese, fibrose e inflamação, favorecendo, dessa forma, os processos regenerativos endógenos iniciados pelo tecido danificado (BARTOLUCCI *et al.*, 2014). As células-tronco mesenquimais já foram isoladas de explantes teciduais cardíacos de aurícula e ventrículo. Esta população multipotente possui a capacidade de se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condroblastos, ao passo que possui a expressão de RNAs mensageiros de alguns marcadores de células progenitoras cardíacas, como GATA4, CD117, VEGF (fator de crescimento endotelial – do inglês “vascular endothelial growth factor”), Troponina T e ABCG2. Quando induzidas a diferenciação cardiomiogênica com 5-azacitidina, TGF- β e vitamina C estas células passam a apresentar GATA4 com localização nuclear aumentada (AGUIAR, 2011; AGUIAR *et al.*, 2011).

Embora o coração tenha sido considerado um órgão pós-mitótico por muito tempo, sabe-se que possui a capacidade de sofrer autorrenovação pelo fato de possuir uma população de células-tronco residentes responsáveis pela homeostase do tecido e pelo reparo cardíaco após a injúria (ANVERSA *et al.*, 2013), as denominadas células-tronco progenitoras cardíacas. Estas células têm sido amplamente estudadas quanto a suas funções e características, pois representam uma grande promessa em relação ao reparo do tecido cardíaco lesionado (LERI *et al.*, 2015). As células-tronco progenitoras cardíacas são responsáveis pela substituição da cicatriz por tecido miocárdico, pelo fato de darem origem a novos cardiomiócitos. O reparo cardíaco mediado por estas células ocorre através da síntese de metaloproteinases de matriz, que degradam as proteínas colágenas formando túneis no tecido fibrótico durante a sua migração pelo miocárdio cicatricial (ROTA *et al.*, 2008). Em 2003, Beltrami e colaboradores reportaram que estas células-tronco eram multipotentes e possuíam a habilidade de se diferenciar em cardiomiócitos, células de músculo liso e células endoteliais. Eles as caracterizaram como células c-kit⁺ e por muito tempo acreditou-se que estas eram as células-tronco cardíacas (BELTRAMI *et al.*, 2003; ELLISON *et al.*, 2013). Muito embora estas células já tenham sido utilizadas em diversos ensaios clínicos, hoje se sabe que as células c-kit⁺ minimamente contribuem para a geração de cardiomiócitos no coração – aproximadamente apenas 0,008% destas células se diferenciam de fato em miócitos (VAN BERLO *et al.*, 2014). Além disso, outras populações celulares já foram classificadas como progenitoras cardíacas, como os progenitores ISL1 os quais podem dar origem a cardiomiócitos, células de músculo liso e células

endoteliais (CAI *et al.*, 2003; BU *et al.*, 2009; MORETTI *et al.*, 2006); os progenitores epicárdicos que já foram demonstrados como sendo capazes de darem origem a cardiomiócitos (ZHOU *et al.*, 2008); os progenitores *side population* (SAINZ *et al.*, 2006; OYAMA *et al.*, 2007; UNNO *et al.*, 2012) os quais contribuem para a renovação dos cardiomiócitos durante o desenvolvimento; os progenitores Sca1 que possuem capacidade limitada de gerar cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo* (VALENTE *et al.*, 2014), dentre outros. Portanto, mais estudos acerca destas células se fazem necessários. Em suma, muitos são os tipos celulares que compõem o coração e estas diferentes células contribuem para a homeostasia do órgão. Apesar de existirem mecanismos intrínsecos de renovação do tecido cardíaco, eles não são suficientes para recuperar a funcionalidade total do órgão no caso de grandes lesões. Desta forma, é importante conhecer o papel dessas células e buscar novas estratégias terapêuticas. Uma vez que já foi comprovado que o coração isquêmico é capaz de apresentar proliferação celular de miócitos cardíacos (BELTRAMI *et al.*, 2003), os mecanismos que regulam esse processo e os tipos celulares envolvidos devem ser caracterizados, pois existe a possibilidade de que as próprias células residentes cardíacas modulem os sinais de reparo tecidual. Como previamente descrito, fomos capazes de isolar e caracterizar células cardíacas humanas a partir de explantes de aurícula e ventrículo (AGUIAR, 2011; AGUIAR *et al.*, 2011). Além das características já descritas anteriormente, essas células também foram descritas como secretoras de elementos de MEC como o colágeno 1 e também citocinas como o TGF- β . Desta forma, estas células poderiam representar importantes fontes de fatores com capacidade indutora/regulatória da cardiomiogênese ou outros processos celulares envolvidos com homeostase e reparo tecidual cardíaco.

1.3 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares consistem em um grupo de desordens que acometem o coração e os vasos sanguíneos, as quais incluem as doenças coronarianas, doenças cerebrovasculares, doenças arteriais periféricas, dentre outras. Segundo a organização mundial da saúde, as doenças cardiovasculares consistem na causa número um de mortes em todo o mundo. Estima-se que 17,3 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2008, representando 30% das mortes globais. Destas, cerca de 7,3 milhões das mortes

ocorreram por doenças coronarianas, enquanto 6,2 milhões das mortes ocorreram decorrentes de derrame. A maioria (80%) das mortes causadas por doenças cardiovasculares ocorrem em países de média e baixa renda, sendo que as proporções entre homens e mulheres são bastante parecidas. Estima-se que o número de mortes decorrentes de doenças cardiovasculares irá alcançar 23,3 milhões até 2030, permanecendo como a principal causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas no país no período de um ano, sendo que a alta frequência destas patologias coloca o Brasil entre os 10 países com o maior índice de mortes causadas por doenças cardiovasculares (PORTAL BRASIL, 2011).

Dentre as doenças cardiovasculares, tem-se o infarto do miocárdio (IM). O infarto consiste em uma área de necrose isquêmica causada pela oclusão do suprimento arterial ou da drenagem venosa em um tecido particular. Quase 99% de todos os infartos resultam de efeitos tromboembólicos ou embólicos, sendo que a maioria resulta da oclusão arterial. O infarto típico acontece devido ao rompimento de uma placa ateromatosa. Em seguida, ocorre a ativação das plaquetas, dando início ao processo de adesão, agregação, ativação e liberação de agentes agregadores. Logo após, ocorre o vasoespasm, havendo o aumento do trombo e levando conseqüentemente a oclusão do lúmen do vaso coronariano. Devido a esta obstrução, ocorre a perda do suprimento sanguíneo para o miocárdio, culminando em alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais. Após aproximadamente 30 minutos, dá-se início ao processo de necrose do miocárdio (KUMAR *et al.*, 2005).

Após a isquemia, os músculos esqueléticos e cardíacos sofrem respostas moleculares e celulares que determinam a função e o remodelamento do tecido isquêmico. Vias relacionadas a hipóxia, balanço imunoinflamatório, células progenitoras vasculares locais ou circulantes, bem como mudanças nas forças hemodinâmicas na parede vascular são o gatilho para os processos de regulação da homeostase vascular, incluindo vasculogênese, angiogênese, arteriogênese e crescimento colateral, que agem com o objetivo de estabelecer uma rede vascular funcional nas zonas isquêmicas. O processo de cicatrização após o insulto isquêmico é dividido em três fases. Na fase 1, devido aos eventos decorridos da isquemia, como hipóxia, hipoperfusão e desregulação metabólica, ocorre a morte celular por apoptose e necrose. Na fase 2, denominada fase inflamatória, ocorre a migração de neutrófilos, macrófagos, monócitos e linfócitos para o tecido necrótico

com o objetivo de remover as células mortas. Na fase 3, denominada fase de remodelamento e regeneração, ocorre a migração e diferenciação de miofibroblastos, deposição de proteínas de MEC, levando a formação do tecido cicatricial com o objetivo de substituir as células necróticas. Durante esta fase, ocorre a formação de novos vasos e/ou o remodelamento da vasculatura pré-existente, sobre o controle de um programa local pró-angiogênico, balanço imunoinflamatório e células progenitoras vasculares. A arteriogênese e o remodelamento da árvore vascular pré-existente provavelmente levam a um aumento no fluxo de sangue na área lesionada e o desenvolvimento de novos capilares (vasculogênese e angiogênese) previne a destruição massiva do tecido no território de hipóxia (FIGURA 1.3) (SILVESTRE *et al.*, 2013).

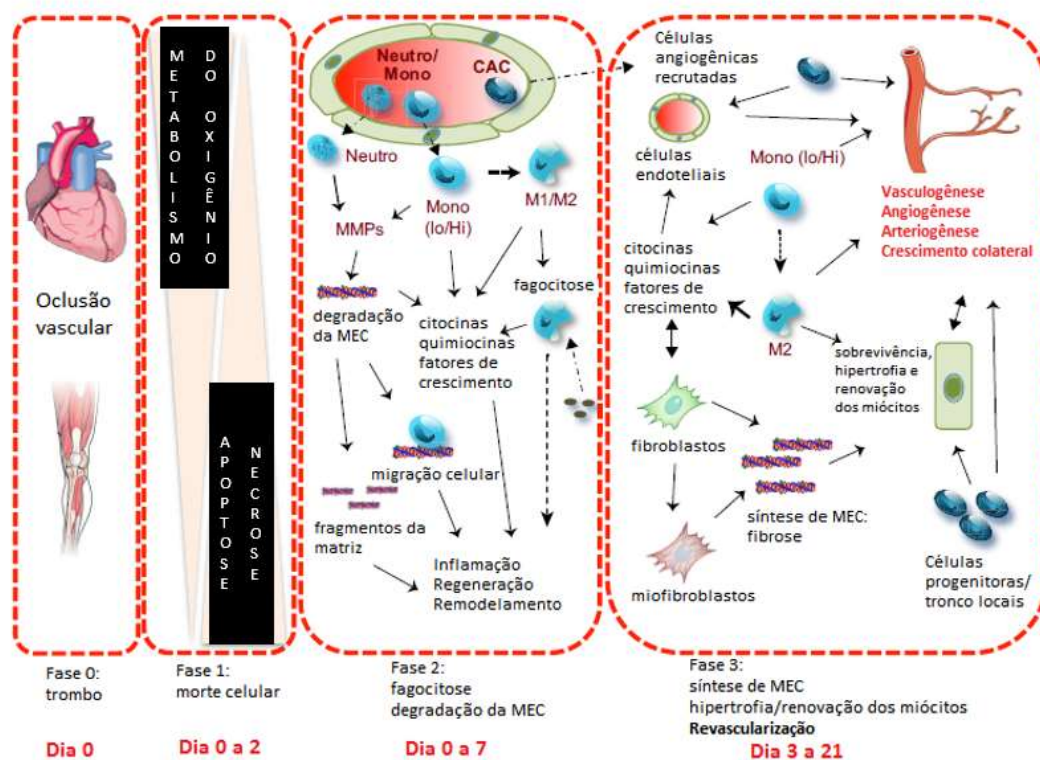


FIGURA 1.3: Eventos e fases envolvidas no remodelamento após o infarto. Legenda: Neutro – Neutrófilos; Mon – Monócitos; CAC – Células angiogênicas circulantes; M1/M2 – Macrófagos tipo 1 e 2; MMPs – Metaloproteínases; MEC – Matriz extracelular.

FONTE: Adaptado de SILVESTRE *et al.*, 2013.

Decorrido o infarto, uma série de complicações podem acontecer, como disfunção do tecido contrátil, arritmias, expansão da área do infarto devido ao enfraquecimento do músculo, insuficiência cardíaca progressiva, dentre outras; prejudicando a qualidade de vida dos pacientes que sofrem desta patologia (KUMAR

et al., 2005). Portanto, pesquisas buscando a regeneração cardíaca se fazem de suma importância.

1.4 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco possuem o potencial de se diferenciar em tipos celulares maduros no organismo durante a vida e o crescimento. Elas são distinguidas das demais populações celulares do organismo pelo fato de possuírem duas características: 1) autorrenovação: estas células não especializadas podem se renovar por meio da divisão celular, às vezes após longos períodos de inatividade; 2) diferenciação: sobre certas condições fisiológicas ou experimentais, elas podem ser induzidas a se tornarem células tecido ou órgão-específicas (FIGURA 1.4). Em alguns órgãos, como intestino e medula óssea, estas células se dividem regularmente com o objetivo de reparar e substituir os tecidos danificados. Em outros órgãos, como pâncreas e coração, a divisão ocorre apenas sobre condições especiais (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2002).

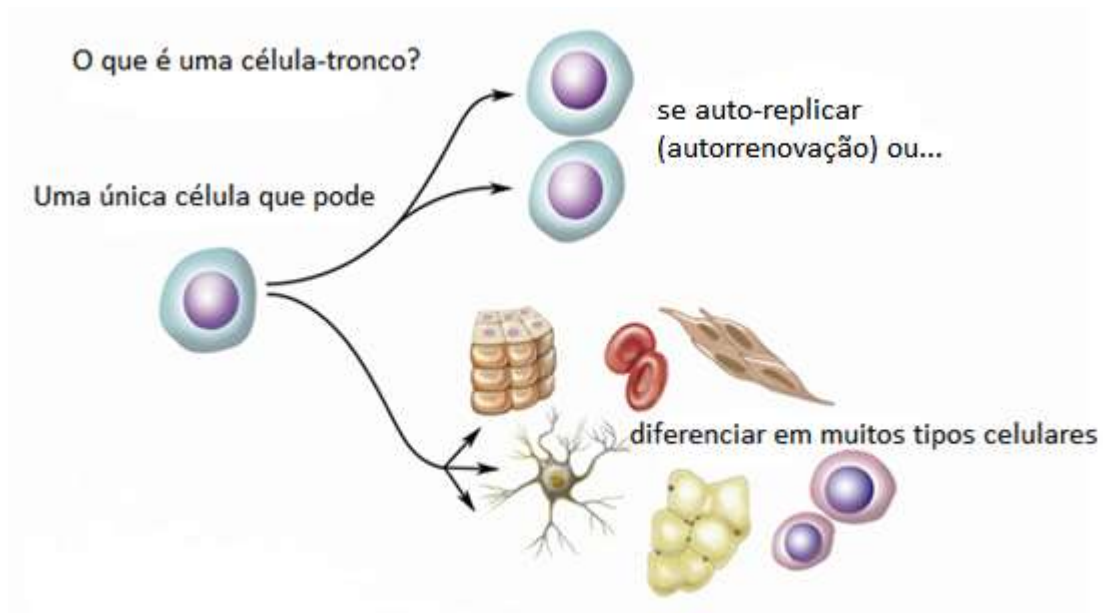


FIGURA 1.4: Características das células-tronco: autorrenovação e diferenciação.
FONTE: Adaptado de THE NATIONAL ACADEMIES.

As células-tronco podem ser classificadas com base no seu potencial de diferenciação e fonte de obtenção. Elas podem ser derivadas do embrião, constituindo as denominadas células-tronco totipotentes e as células-tronco

embrionárias, ou mesmo derivadas do adulto, as chamadas células-tronco adultas ou somáticas (FIGURA 1.5).

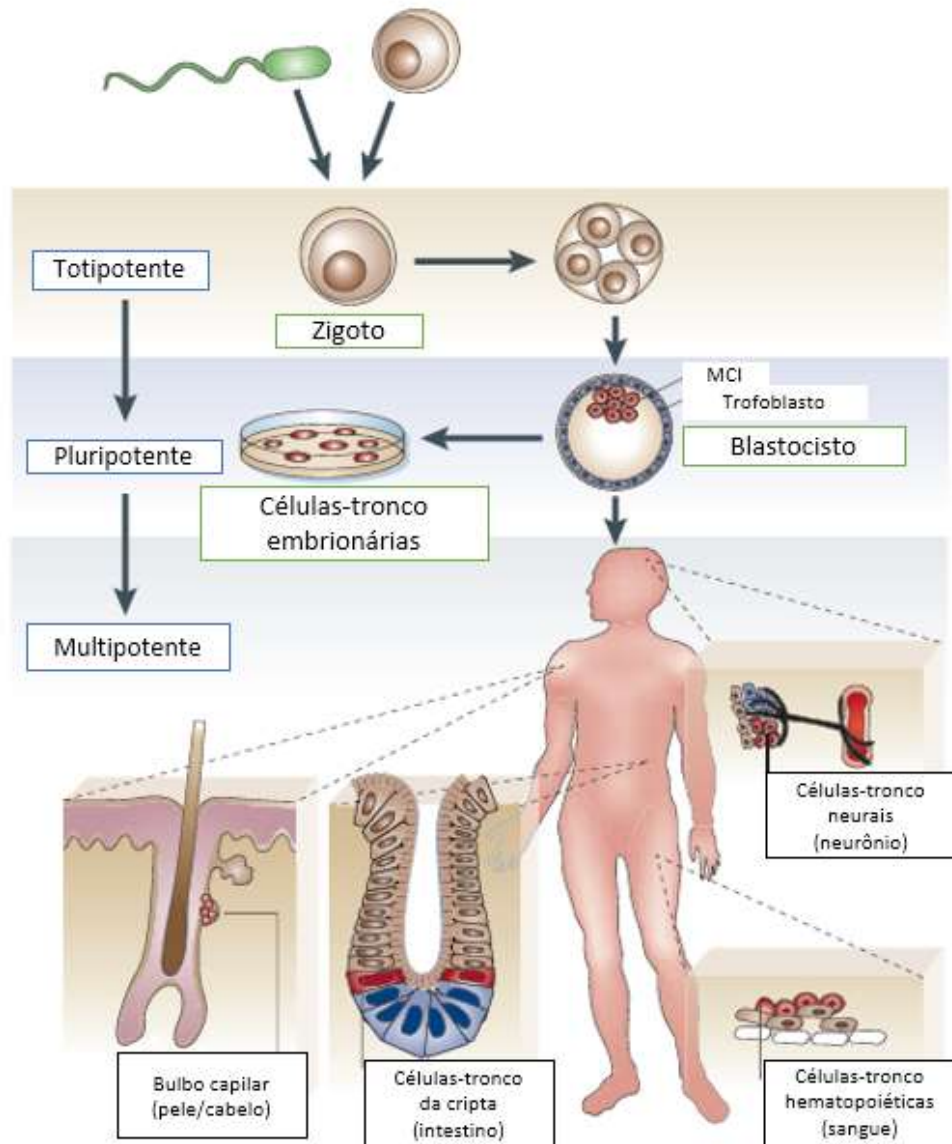


FIGURA 1.5: Diferentes tipos de células-tronco classificadas quanto a sua potencialidade. As células-tronco totipotentes são encontradas ainda na fase de mórula. Células-tronco embrionárias são obtidas da massa celular interna (MCI) do blastocisto e consideradas pluripotentes. As células tronco adultas são multipotentes, pois possuem uma capacidade de diferenciação mais restrita, dando origem a apenas alguns tipos celulares.

Fonte: Adaptado de ECKFELDT *et al.*, 2005.

As células embrionárias totipotentes aparecem nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, mesmo antes da formação do blastocisto e recebem esta classificação, pois são capazes de formar um organismo completo incluindo os anexos embrionários. Já as células embrionárias são derivadas da massa interna do

blastocisto (THOMSON *et al.*, 1998) e são classificadas como pluripotentes pois são capazes de diferenciar-se em qualquer tipo celular do organismo com exceção dos anexos embrionários (LIRAS, 2010). Porém, muito embora estas células representem uma grande promessa pelo fato de darem origem a tipos celulares dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme), elas possuem algumas desvantagens como restrições éticas em relação a sua obtenção e também a possibilidade de formar teratomas pós-transplante (TROUNSON, 2002). Em 2006, Takahashi e Yamanaka realizaram a reprogramação de células diferenciadas por meio da introdução de quatro fatores de transcrição – Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 – e desta forma obtiveram as chamadas células-tronco pluripotentes induzidas (TAKASHI e YAMANAKA, 2006; TAKASHI *et al.*, 2007). Estas células possuem a vantagem de serem pluripotentes e de não envolverem questões éticas em relação a forma de obtenção. Porém, estudos avaliando a segurança destas células ainda estão sendo realizados, já que estas células apresentam anormalidades genéticas resultantes do estresse oncogênico causados pelos quatro fatores de reprogramação (revisado por BUGANIM *et al.*, 2013).

Já as células-tronco adultas consistem em células parcialmente especializadas, consideradas multipotentes pelo fato de possuírem a capacidade de formar um número específico de tipos celulares (LIRAS, 2010). Dentre elas, existem as células-tronco mesenquimais, as quais consistem em uma população heterogênea de células estromais que apresentam a vantagem de poderem ser isoladas de vários tecidos adultos (UCCELLI *et al.*, 2008). Existem ainda as células unipotentes, as quais são encontradas por todo o organismo e apenas diferenciam-se em um único tipo celular, consistindo em reservatórios celulares nos mais diversos tecidos (LIRAS, 2010).

Devido às injúrias ou mesmo pelo processo de envelhecimento, muitos órgãos e tecidos do organismo humano perdem sua capacidade de funcionamento com o tempo. Desta forma, faz-se necessária a reposição do órgão injuriado e essa reposição é realizada principalmente por meio de transplante de órgãos. Porém, este procedimento é por muitas vezes incapaz de atender a toda a demanda, devido à escassez de doadores ou mesmo pela incapacidade da realização do transplante de alguns órgãos e tecidos. Neste contexto, as células-tronco representam uma grande esperança de tratamento e cura, pois constituem uma fonte potencialmente ilimitada de tecidos para transplante. Teoricamente, estas células poderiam ser cultivadas e expandidas em laboratório e então induzidas à diferenciação, com o objetivo de

serem transplantadas, regenerando o órgão em questão. Por isso, as células-tronco representam uma alternativa às terapias atuais caras e ineficientes como agentes terapêuticos, ao passo que também consistem em um excelente modelo de pesquisa em biologia básica (PASSIER e MUMMERY, 2003; PEREIRA, 2008).

1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Na década de 70, Friedenstein e colaboradores identificaram células precursoras estromais multipotentes isoladas da medula óssea. Eles constataram que estas células da medula óssea eram morfologicamente semelhantes à fibroblastos e que poderiam ser utilizadas como camada alimentadora para o cultivo de células-tronco hematopoiéticas, ao passo que possuíam a habilidade de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos *in vitro* e *in vivo* (revisado por UCCELLI *et al.*, 2008). Mais tarde, já na década de 90, Caplan e colaboradores nomearam estas células obtidas da medula óssea como células-tronco mesenquimais. Estas células passaram então a ser amplamente utilizadas em diversos estudos, porém, vários métodos de isolamento e expansão distintos estavam sendo empregados em todo o mundo. Por isso, com o objetivo de facilitar a comparação dos diversos estudos, Dominici e colaboradores (2006) definiram os critérios mínimos para caracterizar as células mesenquimais estromais multipotentes, ou células-tronco mesenquimais. Estes critérios incluem: 1) aderência ao plástico quando mantida sobre condições de cultivo padrão; 2) expressão ($\geq 95\%$ +) dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90; ausência ($\leq 2\%$ +) de expressão dos marcadores de superfície CD45, CD34, CD14, (CD11b), CD19 (CD79 α) e HLA-DR; 3) diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

As células-tronco mesenquimais podem ser definidas como células derivadas de tecido conectivo embrionário imaturo (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2012). Estas células estão presentes nos mais diferentes tecidos e podem ser obtidas de diversas fontes, como por exemplo, da medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, músculo, dentre outros tecidos (BEANE *et al.*, 2014; FATTORE *et al.*, 2014). Por isso, a sua obtenção torna-se mais viável que as células-tronco embrionárias, ao passo que podem também ser transplantadas de maneira autóloga.

Pelo fato de serem multipotentes, sabe-se que estas células possuem a capacidade de se diferenciar em células da linhagem mesodermal (adipócitos, condrócitos, osteócitos). Porém, já foram relatados estudos com células-tronco

mesenquimais que se diferenciaram em miócitos esqueléticos e cardiomiócitos e mesmo em células de origem não mesodérmica, como por exemplo hepatócitos, células beta e neurônios (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Acredita-se que estas células também possuam a capacidade de diferenciação em células de outras linhagens embrionárias pelo fato de sofrerem o processo de transdiferenciação, muito embora este processo *in vivo* ainda esteja sendo considerado controverso (FIGURA 1.6) (UCCELLI *et al.*, 2008).

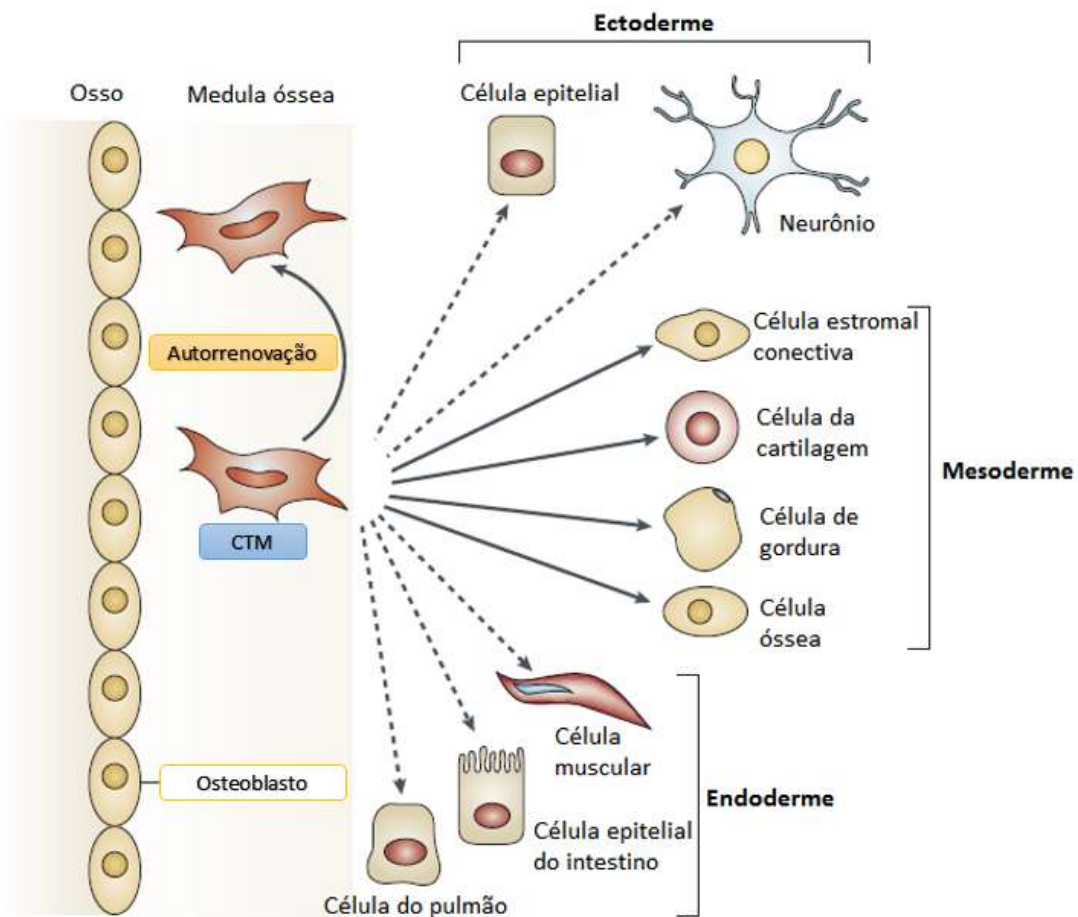


FIGURA 1.6: Multipotencialidade das CTMs (células-tronco mesenquimais). As linhas contínuas representam a diferenciação das CTMs em células da linhagem mesodermal. As linhas pontilhadas representam a transdiferenciação em células da linhagem ectodérmica e endodérmica.

Fonte: Adaptado de UCCELLI *et al.*, 2008.

As células-tronco mesenquimais podem interagir com células do sistema imune inato e adaptativo, alterando o perfil de secreção de citocinas de células dendríticas, células T efetoras, linfócitos *naive* e células *natural killer*, induzindo-as a um fenótipo anti-inflamatório ou tolerante. Por isso, acredita-se que, além da diferenciação, o papel destas células consista na sua atividade parácrina,

modulando respostas de reparo tecidual. Quando administradas *in vivo*, estas células induzem tolerância periférica e migram para tecidos injuriados, onde podem inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promover a sobrevivência de células danificadas (FIGURA 1.7). Da mesma forma, sabe-se que estas células secretam fatores de crescimento e citocinas, além de micro e nano-vesículas, as quais transferem proteínas, lipídeos e vários tipos de RNA para as células adjacentes, mediando uma infinidade de respostas biológicas (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; UCCELLI *et al.*, 2008; BAGLIO *et al.*, 2012).

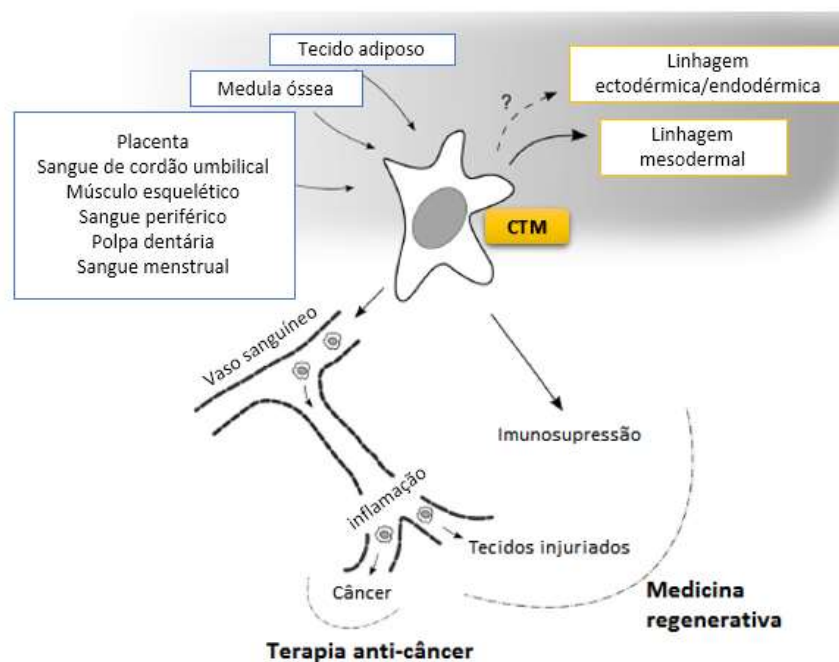


FIGURA 1.7: Propriedades das células-tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs podem ser isoladas de diferentes fontes (quadros em borda azul); estas células podem se diferenciar em células da linhagem mesodermal e acredita-se que possam diferenciar em células de linhagem ectodérmica e endodérmica. Além disso, estas células possuem a capacidade de entrarem na corrente sanguínea e se endereçarem a sítios de inflamação, ao passo que também podem agir na imunossupressão de processos inflamatórios.

FONTE: Adaptado de BAGLIO *et al.*, 2012.

Pelo fato das células-tronco mesenquimais possuírem um potencial de diferenciação em alguns tipos celulares, participarem da regeneração tecidual e agirem modulando respostas inflamatórias, acredita-se que elas sejam uma potencial estratégia para uma gama de aplicações terapêuticas. Estas células representam uma alternativa clínica, uma vez que podem ser utilizadas na terapia celular, sejam indiferenciadas ou diferenciadas a algum tipo celular específico, ou

mesmo em terapias acelulares, servindo como fonte de fatores parácrinos através de seu secretoma, rico em fatores de crescimento, citocinas e vesículas (PEREIRA, 2008; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; BAGLIO *et al.*, 2012).

1.6 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR

A falência cardíaca consiste em uma das principais causas de morte em todo o mundo. Ela está intimamente associada com o dano ao miocárdio, o qual ainda é irreversível com o uso das terapias médicas atuais. Porém, nos últimos anos, muitos experimentos e estudos clínicos tem aberto a possibilidade de resolver muitos dos problemas associados a esse dano, tornando essa uma meta possível. Uma potencial alternativa clínica para a medicina cardíaca regenerativa reside na terapia celular. Existem muitas fontes celulares potencialmente promissoras para esta terapia, como células-tronco mesenquimais de medula óssea, células progenitoras endoteliais, miócitos esqueléticos, células-tronco adultas cardíacas e células-tronco pluripotentes (YUASA e FUKUDA, 2008). Uma das estratégias terapêuticas consiste na geração de cardiomiócitos, os quais poderão ser transplantados visando recuperar o tecido danificado. Muitos avanços têm sido realizados no que se refere a diferenciação cardiomiogênica de células-tronco cardíacas e células-tronco pluripotentes através das mais diversas abordagens e estratégias. O número de evidências que demonstram que cardiomiócitos podem ser gerados a partir de células-tronco provenientes dos mais diversos tecidos fora do sistema cardiovascular (músculo esquelético, medula óssea, testículos, placenta, fluido amniótico e tecido adiposo) tem crescido bastante nos últimos anos (FIGURA 1.8). A geração de cardiomiócitos funcionais a partir da diferenciação de células-tronco poderia representar uma fonte de cardiomiócitos para a terapia celular e a engenharia tecidual no tratamento da falência cardíaca (LIU *et al.*, 2012).

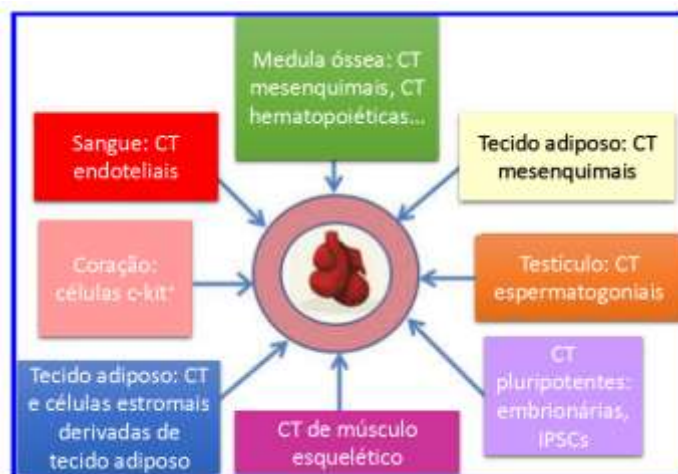


FIGURA 1.8: Diferentes fontes de células-tronco (CT) para a geração de cardiomiócitos *in vitro*. Legenda: CT – Células-tronco; iPSCs – Células-tronco pluripotentes induzidas.

FONTE: Adaptado de LIU *et al.*, 2012.

Com o objetivo de obter cardiomiócitos funcionais, diversos protocolos e estratégias têm sido realizadas. Essas estratégias envolvem a utilização de células-tronco das mais diversas fontes, sejam elas adultas ou pluripotentes. Para tanto, muitos biomateriais e moléculas tem sido estudadas quanto a seus possíveis papéis como indutores da cardiomiogênese, como polietilenoglicol, poli (ácido láctico co-glicólico), *poli* (L-lactídeo *co-ε-prolactona*), dentre outros polímeros, os quais podem levar a expressão de alguns genes cardíacos em células-tronco. Da mesma forma, algumas moléculas tem sido empregadas com o objetivo de diferenciar células-tronco, como 5-aza-2'-deoxicitidina, grelina, ácido ascórbico, DMSO, inibidores da via Wnt, FGF, membros da família do TFG- β 1, dentre outras (revisado por HENG *et al.*, 2004 e LIU *et al.*, 2012).

Em relação às células-tronco mesenquimais, não se sabe ao certo se estas células possuem a real capacidade de gerar cardiomiócitos funcionais. O que se tem na literatura, principalmente, é a geração de células semelhantes a cardiomiócitos (NESSELMANN *et al.*, 2008). Estas já foram obtidas por meio da indução da diferenciação com 5-azacitidina (FUKUDA, 2003; VAN DIJK *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012), DMSO (dimetilsufóxido) (OKURA *et al.*, 2010), TSA (trichostatina A) (CHOI *et al.*, 2010), meios complexos como o estabelecido por Planat-Bénard (2004) composto por SBF, albumina, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, insulina, transferrina, IL-3, IL-6, fator recombinante de células-tronco, assim como o utilizado no trabalho de Choi e colaboradores (2010), composto por SBF, insulina,

transferrina, selenito, ácido linoleico, ascorbato e dexametasona, co-cultivo com cardiomiócitos (ZENG *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2010;), dentre outros protocolos.

Nos últimos anos, as células-tronco pluripotentes tem sido as mais estudadas em relação a diferenciação cardíaca, ainda mais com o surgimento da possibilidade da geração de células-tronco pluripotentes induzidas, as quais eliminam algumas questões éticas, facilitando a pesquisa. No que se refere a estas células, diversas são as formas de indução da diferenciação que são empregadas. Duan e colaboradores, em 2011, realizaram a diferenciação cardiomiogênica de células-tronco pluripotentes através do cultivo destas células sobre hidrogéis compostos de MEC cardíaca, sem adição de fatores solúveis, obtendo ao final, cardiomiócitos pulsantes. Em 2013, Lian e colaboradores diferenciaram células-tronco pluripotentes humanas em cardiomiócitos apenas através da regulação temporal de moduladores da via canônica Wnt, gerando uma população composta por 80-98% de cardiomiócitos. Da mesma forma, Zhang e colaboradores (2012) também diferenciaram células-tronco pluripotentes em cardiomiócitos por meio da simulação de uma transição epitélio-mesênquima. Esta simulação foi realizada utilizando-se um “sanduíche” de matriz (Matrigel) e acrescentando-se ainda fatores de crescimento (Activina A, BMP-4, FGF). Já em 2013, Lu e colaboradores, além de diferenciarem células-tronco pluripotentes em células progenitoras cardiovasculares multipotentes através do uso de fatores (BMP4, Activina A, FGF, VEGF, DKK1), realizaram a perfusão e rescelularização de um coração murino com estas células, as quais migraram, proliferaram e diferenciaram *in situ* em cardiomiócitos, células de músculo liso e células endoteliais, reconstruindo, desta forma, o coração descelularizado.

Muito embora alguns mecanismos que regem a diferenciação cardiomiogênica de células-tronco e a regeneração cardíaca após o infarto ainda não tenham sido totalmente esclarecidos, alguns ensaios clínicos com células-tronco mesenquimais já foram realizados na tentativa de restabelecer o músculo lesionado pós-injúria. Desde 2002, vários ensaios clínicos já foram conduzidos na tentativa de assegurar a segurança e a eficácia de células mononucleares da medula óssea para o tratamento do infarto do miocárdio (revisado por NESSELLMANN *et al.*, 2008). Em 2002, Strauer e colaboradores realizaram um estudo clínico com 10 pacientes que receberam um transplante autólogo de células de medula óssea após sofrerem infarto do miocárdio. Decorridos 3 meses, foi observado que os pacientes que receberam o transplante haviam diminuído a área do infarto e melhorado o volume sistólico e a contratilidade do ventrículo esquerdo, bem como a perfusão do

miocárdio na área infartada. Ainda em 2002, Assmus e colaboradores realizaram um ensaio clínico com 20 pacientes que haviam sofrido infarto. Estes pacientes receberam infusão intracoronariana de células progenitoras sanguíneas e células-tronco mesenquimais de medula óssea. Após 4 meses de acompanhamento, observou-se que houve melhora da fração de ejeção, redução do tamanho do infarto e aumento do fluxo coronariano destes pacientes. Já em 2004, Fernández-Avilés e colaboradores realizaram um estudo clínico com células-tronco mesenquimais de medula óssea em pacientes que haviam sofrido infarto do miocárdio e observaram que após 6 meses, houve melhora da fração de ejeção e constituição da parede do miocárdio. Além destes, outros ensaios envolvendo estas células foram e estão sendo utilizados, porém basicamente todos os ensaios ainda encontram-se em estágios iniciais. De acordo com o site *clinical trials* (www.clinicaltrials.gov), alguns ensaios clínicos estão sendo realizados no momento. Um deles, chamado de ALCADIA (AutoLogous Human CArdiac-Derived Stem Cell to Treat Ischemic cArdyomyopathy) teve início em 2009 e encontra-se em fase I. Este ensaio tem como objetivo avaliar a segurança e a eficácia do transplante autólogo de células-tronco derivadas do coração com a liberação controlada de FGF-b para tratar pacientes com cardiomiopatia isquêmica. Até o momento, nenhum resultado foi gerado em relação a este estudo. Um outro estudo chamado “*Combined CABG and Stem-Cell Transplantation for Heart Failure*” também está sendo realizado e encontra-se em fase 2. Este estudo tem como objetivo assegurar a eficácia do transplante transmiocárdico de células-tronco mesenquimais de medula óssea em pacientes com baixa fração de ejeção ventricular. Este estudo foi iniciado em 2007, porém, até o momento, nenhum resultado foi ainda divulgado.

Em suma, vários são os protocolos realizados nos mais diferentes estudos e os avanços no que se refere a diferenciação de células-tronco estão acontecendo de maneira bastante rápida. Muito embora as análises funcionais dos cardiomiócitos obtidos pela diferenciação de células-tronco sugiram que estes possam ser utilizados como modelos de estudo, ainda estamos caminhando rumo ao estabelecimento de protocolos eficientes que levem a otimização da diferenciação cardiomiogênica, gerando células estáveis, homogêneas e em número suficiente, uma vez que o objetivo final é a terapia celular. Portanto, mais estudos que busquem a melhoria e a obtenção de métodos de indução mais robustos se fazem necessários (YAMASHITA, 2010; LIU *et al.*, 2012). A realização da regeneração cardíaca depende primeiramente dos resultados da pesquisa básica e sua

subsequente aplicação para a clínica. Ensaios clínicos usando diversas fontes de células-tronco devem avançar nesta área e ser conduzidos concomitantemente com investigações acerca dos mecanismos básicos que englobam os processos de diferenciação (YUASA e FUKUDA, 2008).

1.7 NICHOS TECIDUAIS E CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco se localizam em um microambiente específico denominado nicho (GATTAZZO *et al.*, 2014). O nicho consiste em um microambiente tecidual dinâmico que tem como função a manutenção do balanço da atividade das células-tronco para que realizem o reparo e mantenham a homeostase durante toda a vida de um organismo, assegurando que haja um equilíbrio entre a autorrenovação e diferenciação destas células. O termo “nicho” foi proposto em 1978 por R. Schofield após ter observado que células hematopoiéticas derivadas do baço apresentavam um potencial de proliferação menor do que células-tronco hematopoiéticas de medula óssea. Ele atribuiu este fenômeno ao fato de que as células hematopoiéticas do baço não estavam associadas com um complemento de células – o denominado “nicho” – o qual tem como função suportar a atividade celular. Dessa forma, um nicho não é definido somente pela presença de células-tronco mas também pela habilidade de regular o comportamento das mesmas (VOOG e JONES, 2010). Em suma, o nicho possui a função de regular o comportamento das células-tronco, mantendo um balanço entre quiescência, autorrenovação e diferenciação. Acredita-se ainda que o nicho seja responsável pela proteção das células-tronco em relação ao acúmulo de mutações gênicas as quais podem levá-las a uma transformação maligna em células cancerosas. Além de células-tronco, o nicho é composto por células estromais de suporte, as quais interagem com as células-tronco através de receptores de superfície celular, junções gap e fatores solúveis, além da MEC onde estão localizadas. Além disso, os vasos sanguíneos carregam sinais sistêmicos, permitindo com que células inflamatórias ou outras células circulantes cheguem até o nicho; da mesma forma, sinais neuronais são transmitidos para este microambiente com o objetivo de disparar certas respostas biológicas (FIGURA 1.9) (revisado por GATTAZZO *et al.*, 2014).

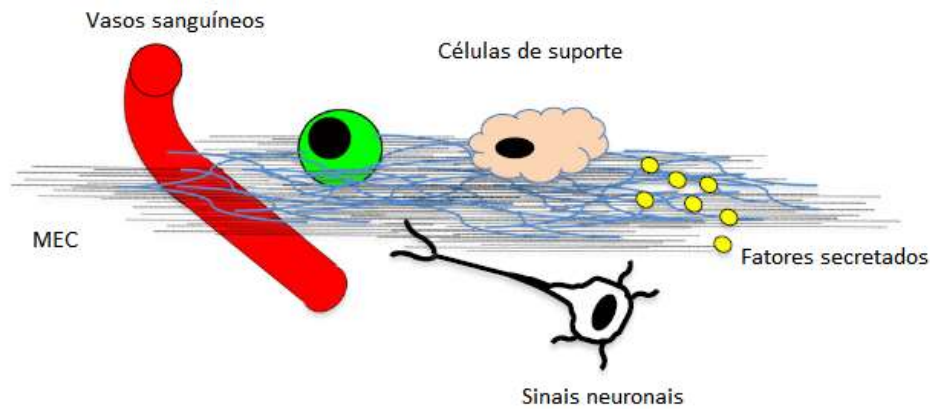


FIGURA 1.9: Componentes do nicho das células-tronco. O nicho é um microambiente especializado e dinâmico onde uma série de sinais levam a regulação do comportamento das células-tronco. Esses incluem sinais dos vasos sanguíneos, células de suporte, células neuronais, fatores secretados e proteínas de matriz extracelular (MEC).

FONTE: Adaptado de GATTAZZO *et al.*, 2014.

Diversos tipos de nichos já foram descritos em mamíferos, como por exemplo o nicho das células-tronco intestinais, células-tronco epidermais do folículo capilar, células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, dentre outros. É importante salientar que cada nicho possui suas características peculiares, porém todos possuem a mesma função: prover um ambiente apropriado que seja capaz de proteger as células-tronco de estímulos, sejam estes de diferenciação, apoptose ou mesmo quaisquer outros que possam vir a comprometer as reservas de células-tronco do organismo (MOORE e LEMISCHKA, 2006).

Um dos nichos que tem adquirido bastante destaque nos últimos anos é o nicho cardíaco. Este nicho consiste em um microambiente altamente dinâmico que possui diferentes funcionalidades dependendo do estágio do desenvolvimento, bem como do estado de saúde (normal *versus* doente) em que se encontra o coração. Muito embora os componentes do nicho cardíaco ainda não estejam totalmente definidos, sabe-se que eles incluem células diferenciadas (cardiomiócitos, células endoteliais), células progenitoras, células estromais, fatores parácrinos e a MEC, entre outros. A composição e a funcionalidade do nicho cardíaco sofrem mudanças durante o desenvolvimento com o objetivo de governar a formação do músculo cardíaco no embrião, diferenciar o tecido cardíaco no feto e garantir a homeostase cardíaca no coração pós-natal. Como descrito anteriormente no item 1.1 desta seção, os fibroblastos cardíacos são de extrema importância, sendo um dos principais constituintes do coração. Estas células possuem um papel chave na

manutenção do nicho cardíaco, já que são responsáveis pela “construção” de um microambiente de MEC cardioinstrutivo e secreção de importantes fatores de crescimento, bem como citocinas (FIGURA 1.10) (CHRISTALLA *et al.*, 2011). Os fibroblastos cardíacos se fazem imprescindíveis durante os primeiros estágios do desenvolvimento cardíaco, pois são responsáveis pela produção de uma MEC complexa que estimula a proliferação de cardiomiócitos maduros. Estas células também são responsáveis pela secreção de diversos fatores como HB-EGF (do inglês “heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor”) (responsável por estimular a proliferação de cardiomiócitos imaturos) (IEDA *et al.*, 2009), bem como de fatores envolvidos na cardiomiogênese, como os membros da família do FGF (medeiam a comunicação fibroblasto-cardiomiócito, levando ao crescimento dos miócitos), TGF- β 1 (envolvido na hipertrofia e fibrose do coração, bem como na diferenciação cardiomiogênica) e citocinas da família da IL-6 (possuem um importante papel no desenvolvimento cardíaco e no desenvolvimento pós-natal dos cardiomiócitos) (FIGURA 1.10) (revisado por CHRISTALLA *et al.*, 2011). Portanto, as mudanças realizadas pelos fibroblastos cardíacos no microambiente cardíaco são responsáveis pelos processos de especificação, integração e maturação dos cardiomiócitos e seus precursores, já que estas células controlam a proliferação dos miócitos nos estágios iniciais do desenvolvimento e promovem a hipertrofia dos mesmos em estágios mais avançados (IEDA *et al.*, 2009).

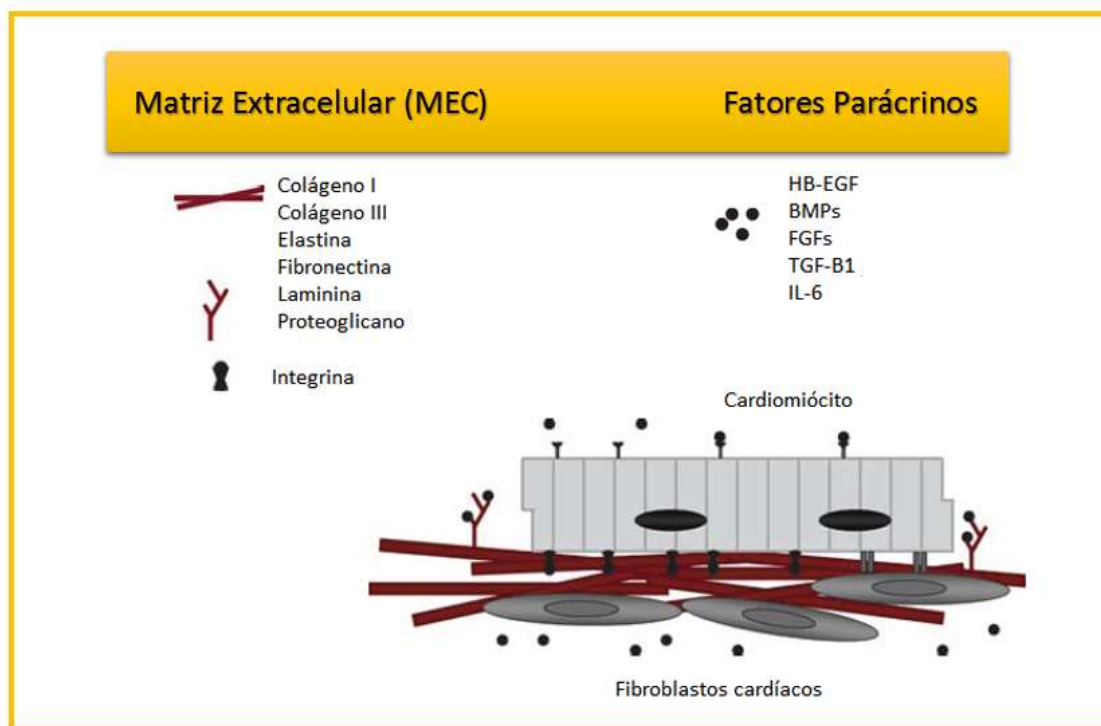


FIGURA 1.10: Componentes do nicho cardíaco secretados por fibroblastos. Legenda: HB-EGF – do inglês “heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor”; BMPs – do inglês “Bone morphogenetic proteins”; FGFs – do inglês “Fibroblast growth factor”; TGF-B1 – do inglês “Transforming growth factor beta 1”; IL-6 – Interleucina-6.

FONTE: Adaptado de CHRISTALLA *et al.*, 2011.

Um dos principais componentes não celulares do nicho cardíaco é a matriz extracelular (MEC). Ela é responsável por fornecer um arcabouço estrutural para cardiomiócitos e não-miócitos. Sua estrutura consiste em proteínas estruturais (como colágenos e elastina), proteínas adesivas (como laminina e fibronectina) e proteoglicanos, as quais, por meio de integrinas podem comunicar-se com células do miocárdio levando a ativação de cascatas de sinalização que regulam a proliferação, diferenciação, crescimento e sobrevivência das células componentes do miocárdio humano (SAMAREL, 2005; CHRISTALLA *et al.*, 2011). Além disso, as proteínas de MEC podem servir como importantes reguladores dos fatores de crescimento, através da incorporação dos mesmos à MEC, regulando, desta forma, a disponibilidade de ligação dos fatores de crescimento e ainda possibilitando o estabelecimento de gradientes morfogenéticos durante o desenvolvimento cardiovascular. Portanto, além das propriedades estruturais e mecânicas, a MEC possui um papel de regulação das vias de sinalização biológicas (SNIDER *et al.*, 2009; CHRISTALLA *et al.*, 2011).

Em suma, a especificação e proliferação, assim como a maturação dos cardiomiócitos são regulados por fatores do nicho. Embora muito se saiba acerca do nicho cardíaco nas fases embrionárias, a composição e funcionamento do nicho cardíaco adulto ainda não estão totalmente definidos. Acredita-se que o complexo nicho cardíaco embrionário transforma-se em um nicho menos definido onde ocorrem sinalizações para o controle do crescimento hipertrófico e da sobrevivência celular. Ainda, acredita-se que o controle parácrino inerente das fases iniciais seja substituído por um controle mais a nível neuro-humoral (FIGURA 1.11). Portanto, mais estudos que envolvam a compreensão do nicho cardíaco se fazem necessários para tornar possíveis os avanços da terapia celular envolvendo células-tronco, bem como as promessas do campo da engenharia tecidual, a qual tem buscado mimetizar *in vitro* as características inerentes aos nichos encontrados *in vivo* (CHRISTALLA *et al.*, 2011; GATTAZZO *et al.*, 2014).

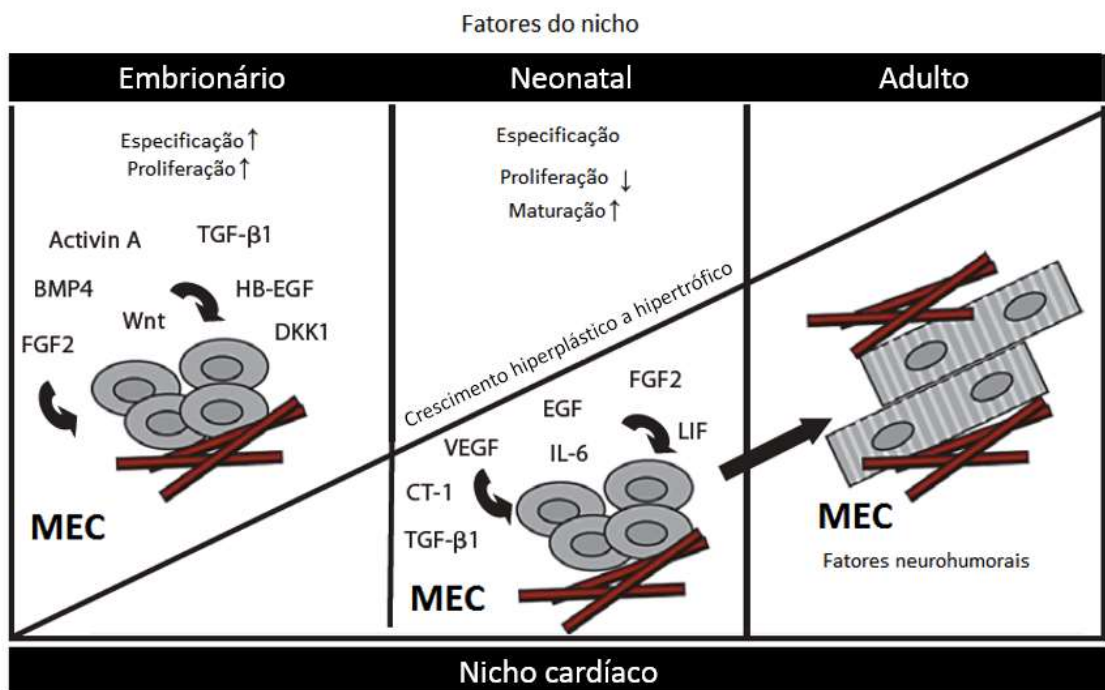


FIGURA 1.11: Revisão esquemática dos fatores do nicho cardíaco e do desenvolvimento do nicho do embrião ao adulto. Legenda: MEC – Matriz extracelular; Activin A – Activina A; BMP4 – do inglês “Bone morphogenetic protein 4”; TGF-β1 – do inglês “Transforming growth factor beta 1”; HB-EGF – do inglês “heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor”; FGF2 – do inglês “Fibroblast growth factor 2”; DKK1 – do inglês “Dickkopf-related protein 1”; VEGF – do inglês “Vascular endotelial growth factor”; IL-6 – Interleucina 6; EGF – do inglês “Epidermal growth factor”; LIF – do inglês “Leukemia inhibitory factor”; CT-1 – do inglês “Cardiotrophin-1”.

FONTE: Adaptado de CHRISTALLA *et al.*, 2011.

1.8 MATRIZ EXTRACELULAR E DESCELULARIZAÇÃO

A matriz extracelular (MEC) consiste em um conjunto complexo de proteínas e outras macromoléculas que tem como função além de estabelecer uma conexão entre as células e determinar as propriedades físicas de um tecido, influenciar a sobrevivência, desenvolvimento, forma, polaridade e o comportamento migratório celular (FIGURA 1.12) (DALEY *et al.*, 2008; ALBERTS *et al.*, 2010).

As macromoléculas que compõem a MEC são produzidas pelas células. Longe de ser uma estrutura estática, a MEC está em remodelamento constante, principalmente durante os processos de desenvolvimento, diferenciação e reparo tecidual. Este remodelamento é realizado pelas células que compõem o tecido (principalmente fibroblastos), as quais degradam e remontam esta MEC conforme for a necessidade. Este fenômeno pode acontecer em resposta a sinais transmitidos por receptores de MEC, como integrinas, sindecanas e receptores de laminina ou por meio de proteínas modificadoras de MEC, como as metaloproteinases (MMPs). A tensão celular e extracelular também pode afetar ou ser induzida pelo remodelamento da MEC (DALEY *et al.*, 2008; ALBERTS *et al.*, 2010). As proteínas da MEC possuem domínios múltiplos e independentes com sequências altamente conservadas. Alguns desses domínios se ligam a receptores de adesão como as integrinas que medeiam a adesão célula-matriz e ainda transduzem sinais para as células. As proteínas da MEC também se ligam a fatores de crescimento, regulando a sua distribuição, ativação e apresentação às células (HYNES, 2009).

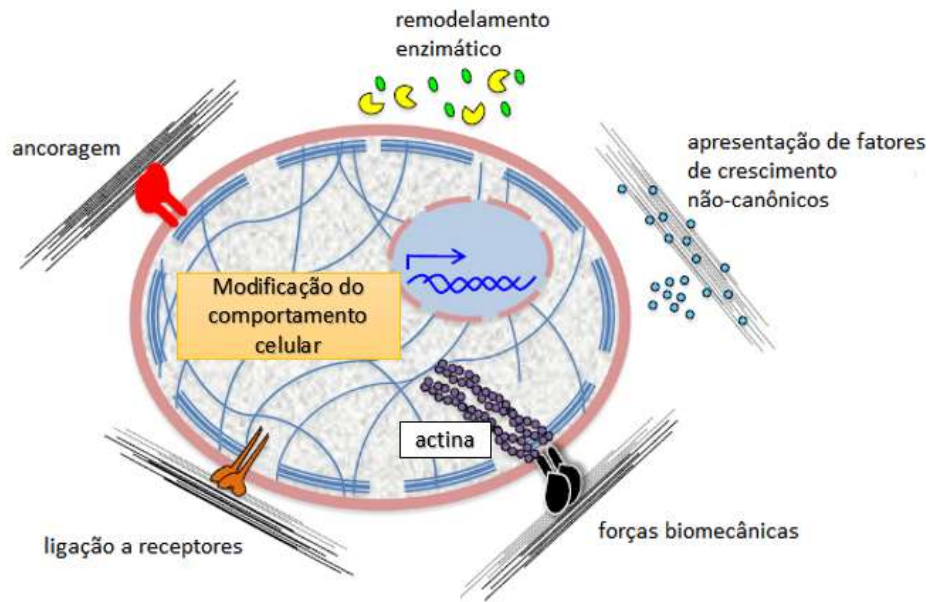


FIGURA 1.12: Regulação do comportamento das células pela matriz extracelular (MEC). A MEC pode se ligar diretamente a diferentes tipos de receptores de membrana ou co-receptores, mediando a ancoragem das células e regulando diversas vias envolvidas na sinalização intracelular e mecanotransdução. A MEC também pode apresentar fatores de crescimento não-canônicos e ser remodelada pela ação de enzimas.

FONTE: Adaptado de GATTAZZO *et al.*, 2014.

As principais macromoléculas constituintes da MEC são as cadeias de polissacarídeos de glicosaminoglicanos (GAGs) as quais normalmente se ligam a proteínas, formando proteoglicanos e as proteínas fibrosas, como os colágenos (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os GAGs consistem em um grupo heterogêneo de cadeias polissacarídicas não-ramificadas, compostas por unidades dissacarídicas repetidas. Esses heteropolissacarídeos são exclusivos de animais e bactérias e estão divididos de acordo com seus açúcares, tipo de ligação entre os açúcares e o número e localização dos grupos sulfato. Os GAGs possuem um papel importante na sinalização química entre as células e ligam moléculas sinalizadoras secretadas, como por exemplo fatores de crescimento, podendo aumentar ou inibir sua função sinalizadora. Também se ligam e regulam a atividade de outros tipos de proteínas secretadas, como as proteases e inibidores de proteases. Como um exemplo de proteoglicano, tem-se a decorina, a qual é secretada pelos fibroblastos e se liga às fibrilas de colágeno, regulando a união e o diâmetro das mesmas. Existem ainda proteoglicanos de superfície celular, como as sindecanas, as quais possuem um núcleo proteico que atravessa a membrana. Esse proteoglicano localiza-se na

membrana de diversos tipos celulares, como fibroblastos e células epiteliais, atuando como receptores para as proteínas de matriz (ALBERTS *et al.*, 2010).

Além dos GAGs, a MEC ainda é composta pelas proteínas fibrosas, as quais conferem força e resistência à MEC. Dentre estas proteínas estão os colágenos, os quais são encontradas em todos os animais multicelulares, sendo as proteínas mais abundantes encontradas nos mamíferos. Estas proteínas possuem uma estrutura longa e rígida, sendo classificadas em: 1. Formadores de fibrilas (Colágeno tipo I, II, III e V); 2. Associado a fibrilas (Colágeno tipo IX); 3. Formadores de rede (Colágeno tipo IV e VII); 4. Transmembrana (Colágeno tipo XVII) e 5. Núcleo proteico de preteoglicano (Colágeno XVIII). Dentro deste contexto, os fibroblastos possuem um papel chave na organização da MEC, pois sintetizam as fibrilas de colágeno e depositam-nas na orientação correta (ALBERTS *et al.*, 2010).

Na MEC existem ainda as fibras elásticas, compostas principalmente por elastina, as quais tem como função fornecer a resistência necessária de modo que possam voltar à forma original após uma distensão temporária. Já a fibronectina consiste em uma glicoproteína que possui um papel bastante importante nas interações célula-matriz. Esta proteína pode ser encontrada na forma solúvel, circulando no sangue e outros fluidos, ou na forma insolúvel, como fibrilas de fibronectina. É importante salientar que a fibronectina possui sítios de ligação a outras proteínas extracelulares e à membrana celular por meio do domínio RGD (arginina, glicina e aspartato), podendo desta forma, se ligar às integrinas. Existe ainda outra glicoproteína de extrema importância para a MEC, a laminina. Esta consiste em uma glicoproteína grande e flexível. Acredita-se que ela seja o organizador primário da estrutura de camadas, sendo que no início do desenvolvimento, é a principal formadora da lâmina basal (ALBERTS *et al.*, 2010).

Como descrito anteriormente, a MEC está intimamente ligada ao comportamento das células-tronco. Através de suas propriedades biofísicas, mecânicas e bioquímicas específicas de cada tecido, ela é capaz de regular o comportamento e o destino destas células (GATTAZO *et al.*, 2014). Portanto, entender a composição e a função da MEC torna-se fundamental para a compreensão dos mecanismos que regem as respostas biológicas ocorridas nestas células.

Com o objetivo de melhor compreender o papel da MEC no comportamento das células-tronco, bem como de avançar no campo da bioengenharia de tecidos, muitos estudos vêm sendo realizados com o uso de MECs, buscando agregar

algumas características fundamentais inerentes ao microambiente, como topografia, composição da MEC e rigidez em substratos mais complexos que possam mimetizar cada vez mais fielmente o ambiente *in vivo* (WATT e HUCK, 2013).

A obtenção da MEC é tipicamente derivada de processos que envolvam a sua síntese *in vitro* ou a descelularização de tecidos. Como o próprio nome sugere, o processo de descelularização tem como objetivo remover as células, restando ao final somente a estrutura da MEC. Diversas são as abordagens empregadas para remover estas células, como métodos físicos, químicos e biológicos. A eficiência da descelularização depende da origem do tecido e dos métodos utilizados. Muito embora seja desejável a preservação da complexa composição e até da ultraestrutura 3D do tecido, é sabido que praticamente todos os métodos de descelularização afetam a composição bioquímica, a arquitetura do tecido e o comportamento mecânico da MEC, podendo acarretar em uma potencial perda da composição e estrutura de superfície (GILBERT *et al.*, 2006; CRAPO *et al.*, 2011; MORONI e MIRABELLA, 2014).

Matrizes descelularizadas, quando preparadas corretamente, podem proporcionar um microambiente repleto de sinais moleculares capazes de mimetizar o microambiente em questão (MORONI e MIRABELLA, 2014). Órgãos, tecidos e monocamadas celulares são descelularizadas das mais diversas formas. Muitos estudos empregam agentes químicos para a remoção das células; estes agentes podem ser ácidos e bases, soluções hipo e hipertônicas, detergentes ou solventes (como álcool e acetona). A maioria dos estudos utilizam detergentes para a descelularização. Estes podem ser detergentes não-iônicos (como o Triton X-100), iônicos (como o SDS e Triton X-200) ou zwitteriônicos (como CHAPS). Porém, embora os detergentes possuam a vantagem de remover as células com bastante eficiência, eles trazem a desvantagem de influenciar na estrutura e composição da MEC após a descelularização (CRAPO *et al.*, 2011).

Pelo fato de muitos protocolos diferentes serem empregados para realizar o processo de descelularização, em 2011, Crapo e colaboradores estabeleceram alguns critérios mínimos para confirmar a eficiência deste processo. Estes critérios incluem: quantidade de DNA de dupla fita menor que 50 ng por mg de peso seco de MEC, tamanho de fragmentos de DNA menor que 200 pares de bases e ausência de material nuclear visível.

Diversos órgãos e tecidos já foram descelularizados com êxito, como fígado (UYGUN *et al.*, 2010), coração (LICHTENBERG *et al.*, 2006; OTT *et al.*, 2008;

EITAN *et al.*, 2010), pulmão (PETERSEN *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2012), pele (CHEN *et al.*, 2004), dentre outros. Da mesma forma, alguns trabalhos já realizaram a descelularização de monocamadas celulares. Diferentemente dos tecidos mencionados acima, os quais possuem um arcabouço pronto para descelularização, as monocamadas celulares requerem alguns dias de cultivo para que as células ali presentes secretem e construam a MEC circundante. Em 2007, Chen e colaboradores cultivaram células-tronco mesenquimais sobre uma MEC secretada por células de medula, com o objetivo de reconstituir o nicho das células-tronco. Eles observaram que a MEC proveniente da monocamada foi capaz de promover a replicação de progenitores mesenquimais e a retenção da sua multipotencialidade (CHEN *et al.*, 2007). Ainda em 2007, Hartmann e colaboradores descelularizaram cultivos de astrócitos, pericitos e células endoteliais e cultivaram células endoteliais cerebrais sobre estas MECs com o objetivo de acompanhar a formação da barreira hematoencefálica. Dessa forma, eles observaram que as MECs secretadas por astrócitos e pericitos levaram a uma maior ligação das células endoteliais, sugerindo que uma MEC derivada da glia se faz necessária para promover a formação da barreira hematoencefálica (HARTMANN *et al.*, 2007). Já em 2012, Lin e colaboradores cultivaram células-tronco mesenquimais sobre a MEC proveniente de células-tronco mesenquimais de medula óssea com o objetivo de verificar a bioatividade destas células quando cultivadas sobre esta MEC. Neste estudo, eles observaram que a MEC foi capaz de promover maior proliferação, adesão, migração e diferenciação das células-tronco mesenquimais do que quando comparadas com os cultivos realizados sobre colágeno tipo I (controle).

Portanto, a MEC, bem como os fatores solúveis que constituem o nicho, representam uma importante estratégia na modulação da atividade das células-tronco. Desta forma, o presente trabalho caracteriza a MEC e os fatores solúveis (Meio condicionado - MC) derivados de células cardíacas humanas e avalia o potencial desses elementos em modular o comportamento das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, principalmente em relação à diferenciação cardiomiogênica. A grande motivação para o estudo da diferenciação das células-tronco em cardiomiócitos consiste no fato das doenças cardiovasculares representarem uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo todo. Dentro deste contexto, as células-tronco mesenquimais vêm sendo empregadas para os mais diversos fins, seja para a obtenção de células cardíacas através da indução da diferenciação cardiomiogênica, seja como fonte de fatores

parácrinos que medeiam as repostas inflamatórias no organismo. Estas células, como descrito anteriormente, estão intimamente relacionadas ao nicho onde estão inseridas. Desta forma, buscando mimetizar o microambiente cardíaco, utilizamos a MEC derivada de células de explantes cardíacos, bem como fatores solúveis secretados por estas células com o objetivo de avaliar sua influência no cultivo de células-tronco mesenquimais, analisando respostas biológicas de proliferação, adesão, migração e diferenciação celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização de células cardíacas residentes humanas quanto a seu fenótipo, secreção de fatores solúveis e proteínas de matriz extracelular, a fim de avaliar sua aplicação para indução da diferenciação cardiomiogênica, proliferação, adesão e migração de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, cultivar e caracterizar imunofenotipicamente células cardíacas humanas derivadas de cultivo de explante tecidual de aurícula e ventrículo;
- Caracterizar fatores solúveis (citocinas, fatores de crescimento) presentes no meio condicionado pelo cultivo de células cardíacas humanas derivadas de aurícula e ventrículo;
- Caracterizar elementos da matriz extracelular secretados pelas células cardíacas humanas derivadas de aurícula e ventrículo;
- Avaliar a viabilidade e morte celular de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em cultivo com o meio condicionado e/ou matriz extracelular derivados de células cardíacas humanas provenientes de aurícula e ventrículo;
- Avaliar a influência dos fatores solúveis e matriz extracelular secretados pelas células cardíacas humanas em relação a proliferação, adesão, migração e diferenciação cardiomiogênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

As etapas experimentais deste trabalho, representadas na figura 3.1, incluem: isolamento de células cardíacas das porções teciduais da aurícula e ventrículo direitos; caracterização imunofenotípica destas células cardíacas; obtenção e caracterização da matriz extracelular e do meio condicionado provenientes das mesmas; e realização de testes funcionais de diferenciação, adesão, proliferação e migração de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (aCTMs) em cultivo com a matriz extracelular (MEC) e/ou o meio condicionado (MC) derivados das células cardíacas.

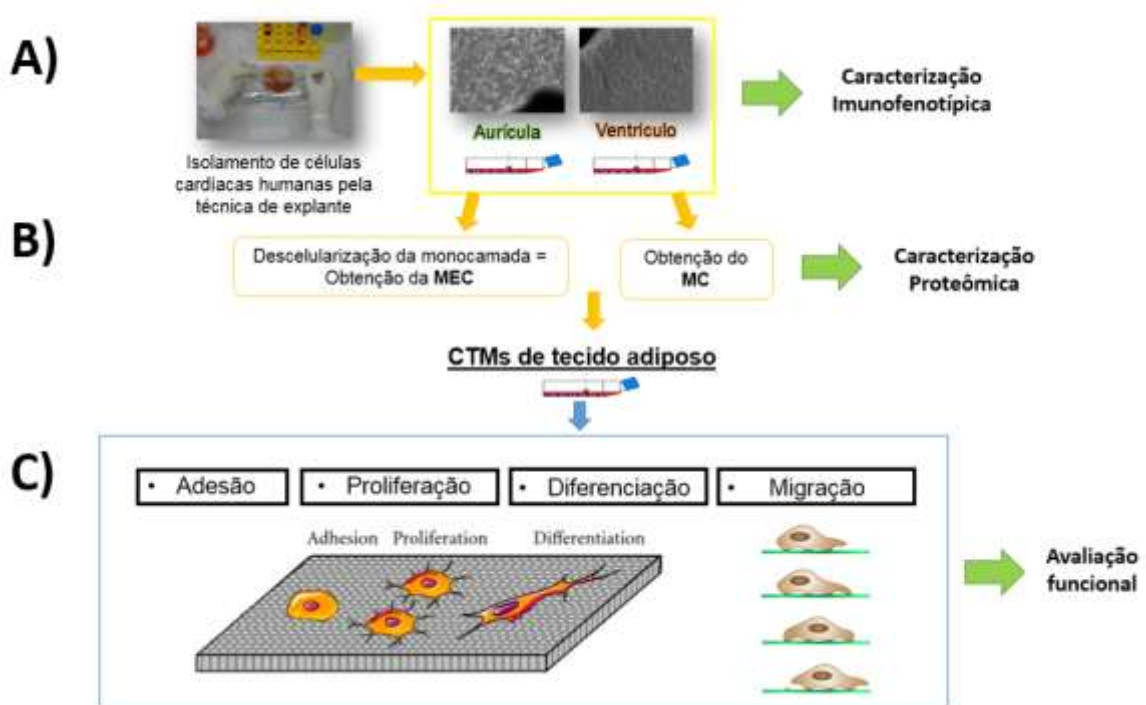


Figura 3.1: Fluxograma representativo das etapas experimentais. (A) Isolamento e cultivo de células cardíacas humanas pela metodologia de cultura de explantes, (B) obtenção da matriz extracelular (MEC) e meio condicionado (MC) secretado por estas células e (C) ensaios funcionais com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo utilizando MEC e MC de células cardíacas.

FONTE: A autora, 2014.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho consiste em uma das etapas do projeto de pesquisa intitulado "Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de

células-tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular", o qual foi submetido no dia 20 de setembro de 2007 ao CEP/FIOCRUZ e aprovado pelo comitê de ética na reunião do dia 15 de setembro 2007 sob o número 419/07 (Anexo I).

3.3 COLETA DO TECIDO CARDÍACO

Os fragmentos de miocárdio humano foram obtidos a partir de material excedente da dissecação de válvulas cardíacas realizado pelo Banco de Hemoenxertos da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (BHSC). Para este estudo, foram utilizadas amostras teciduais da aurícula direita e do ventrículo direito provenientes de um doador de órgãos. Este material é descartado após dissecação das valvas cardíacas e pode ser utilizado para fins de pesquisa de acordo com a Legislação Brasileira vigente, Portaria GM nº 263 de 31 de março de 1999, na qual define-se que tecidos, órgãos ou partes do corpo humano podem somente ser utilizados para fins científicos quando esgotadas todas as possibilidades de utilização em transplantes (aprovado pelo comitê de ética da FIOCRUZ).

Os fragmentos de tecido utilizados foram recolhidos em meio de cultura nutriente F12 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/ml de penicilina, e 0,1 mg/ml streptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As amostras foram então mantidas a 4°C por um período de até 48 h antes do processamento, conforme protocolo realizado anteriormente em nosso grupo (AGUIAR, 2011; AGUIAR *et al.*, 2011).

3.4 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS

Para o isolamento das células cardíacas humanas realizou-se a metodologia de cultura de explantes. Para tanto, cerca de 100 mg de explantes cardíacos foram transferidos para frascos de cultivo de 25 cm² com superfície recoberta com filme de colágeno tipo I (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). A fim de que os explantes aderissem à superfície de cultura, o frasco de cultivo foi incubado com o lado onde foram plaqueados voltado para cima, sendo o meio de cultura adicionado ao lado apostro, sem entrar em contato direto com os explantes. Os frascos de cultivo foram então incubados nesta condição de 30 a 60 minutos a temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em estufa úmida Modelo HEPA Class 100, series II

(Thermo Scientific). Decorrido esse tempo de incubação, a garrafa de cultivo foi cuidadosamente invertida para que o meio de cultura cobrisse os explantes que estavam aderidos (FIGURA 3.2). Para o cultivo dos explantes, utilizou-se o meio de cultura Dulbecco's Mega Cell ® (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-Glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não-essenciais, 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) conforme protocolo descrito por Dellavalle e colaboradores (DELLAVALLE *et al.*, 2007). Os cultivos dos explantes foram realizados de 15 a 30 dias a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, realizando-se a troca do meio de cultura periodicamente. Se até 30 dias de cultivo houvesse a migração das células, estas eram mantidas para estabelecimento dos cultivos, caso contrário, os cultivos eram descartados.

Decorrida a migração celular, as células foram repicadas, a suspensão celular foi filtrada em “cell strainer” com membrana de nylon com poros de 40 μM (BD Falcon™, San Jose, California, EUA) a fim de remover possíveis restos de explantes e as células foram então mantidas em cultivo (AGUIAR, 2011; AGUIAR *et al.*, 2011).

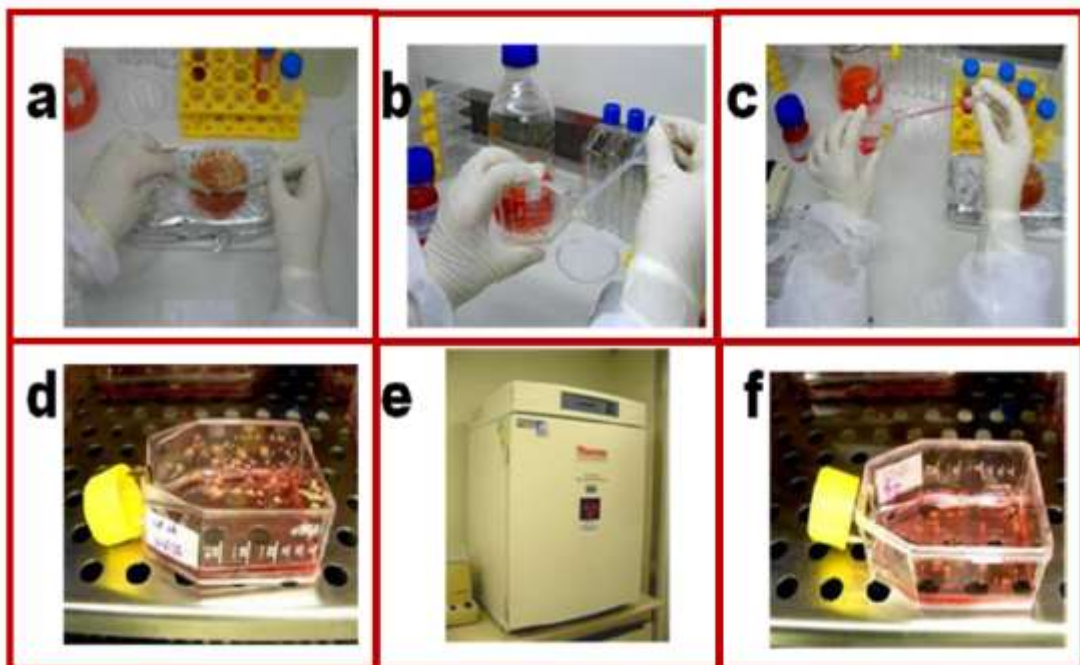


Figura 3.2: Cultivo de explantes para o isolamento de células cardíacas humanas. Primeiramente, os fragmentos de tecido foram dissociados mecanicamente com bisturi (a), transferidos para frascos de cultivo de 25 cm² (b), onde o meio de cultura foi adicionado (c). Por um período de 30 a 60 minutos, os frascos de cultivo foram incubados com o lado de baixo da garrafa virado para cima (d) em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (e). Passado o período de incubação, os frascos eram

virados novamente para o lado de cultivo e seguiam-se trocas de meio de cultura semanais (f).

FONTE: Fotos de Itamar Crispin (2008), adaptado de Aguiar (2011).

3.5 MANUTENÇÃO E REPIQUE CELULAR

Os cultivos das células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo foram realizados da mesma forma que o cultivo de explantes descrito anteriormente.

Os cultivos das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (aCTMs) (Lonza, Walkersville, EUA) foram mantidos em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de SBF, 2 mM de L-Glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em garrafas ou placas conforme protocolo estabelecido em nosso laboratório. Ambos os cultivos foram mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, havendo trocas periódicas do meio de cultivo (a cada 3-4 dias).

O repique celular era realizado quando o cultivo atingisse 80% de confluência da monocamada. Para tanto, o meio de cultivo era retirado, a cultura lavada com uma solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS-CMF) a fim de facilitar a individualização celular e em seguida uma solução de 0,025% de tripsina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) em 0,02% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) era adicionada ao cultivo. Após 3 minutos de incubação em estufa a 37°C, as culturas eram observadas em microscópio óptico para assegurar a individualização celular; meio de cultivo contendo SBF era então adicionado com o objetivo de inativar a ação da enzima tripsina, seguindo-se com homogeneização da suspensão celular. Um banco de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo e de aCTMs criopreservadas foi criado com o objetivo de utilizar as células conforme a necessidade e em passagens controladas. Para tanto, após a tripsinização, a suspensão celular era centrifugada a 720 x g, o meio de cultivo era descartado e as células eram então ressuspensas em uma solução composta de 95% de SBF e 5% de DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). A criopreservação foi realizada com no mínimo 10⁶ células por ampola, sendo armazenadas em uma caçapa de criopreservação (NALGENE™ Cryo 1°C Freezing Container) a -20°C por algumas horas. Em seguida, as ampolas foram transferidas para freezer -80°C por aproximadamente 16-20 horas e então estocadas em nitrogênio líquido.

3.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS CARDÍACAS DERIVADAS DE AURÍCULA E VENTRÍCULO

As células cardíacas provenientes de aurícula e ventrículo foram caracterizadas por imunomarcção de superfície. Para tanto, células entre as passagens 4 a 8 foram tripsinizadas conforme protocolo padrão e submetidas a centrifugação a 720 x g por 5 minutos. O meio de cultivo foi então descartado e as células foram ressuspensas e bloqueadas em uma solução de PBS/BSA 1% por 60 minutos. Decorrido o período de incubação, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas nas soluções de anticorpos (diluídos em PBS/BSA 1%). Foram utilizados marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90, CD105, CD73), marcadores de células hematopoiéticas (CD34, CD11b, CD45, CD19, HLA-DR), marcadores de pericitos e células musculares lisas (CD146, ALPL, CD140b), bem como um marcador de células endoteliais (CD31) e ainda outro marcador de fibroblastos cardíacos (DDR-2). As seguintes marcações foram realizadas:

- 1) IgG FITC + IgG PE + IgG APC (Controles isotípicos)
- 2) anti-CD90 FITC + anti-CD105 PE + anti-CD73 APC
- 3) anti-CD34 FITC + anti-CD11b PE + anti-CD45 APC
- 4) anti-CD19 FITC + anti-CD140b PE + anti-HLA-DR APC
- 5) anti-CD31 FITC + anti-CD117 PE
- 6) anti-ALPL PE
- 7) anti-CD146 PE
- 8) anti-SCA-1 PE
- 9) anti-CD56 PE
- 10) anti-DDR-2 + anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488
- 11) IgG2a + anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (controle negativo da marcação 10)

*Detalhes sobre os anticorpos no apêndice A;

Após a incubação, as células foram lavadas e fixadas com PFA 4% por 10 minutos. Em relação ao marcador DDR-2 e seu controle negativo (IgG2a), a marcação foi realizada de forma distinta, baseado nas recomendações do fabricante. Desta forma, as células foram fixadas primeiramente e depois bloqueadas e marcadas, seguindo-se por uma segunda incubação com anticorpo secundário anti-

IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 na concentração de 1:300 por 60 minutos.

As marcações foram analisadas por citometria de fluxo no equipamento FACS Canto II (Becton Dickinson, Sam Jose, EUA) e a análise dos dados realizada com o auxílio do programa FlowJo versão 7.5 (Flowjo, USA).

3.7 OBTENÇÃO DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS

Para a obtenção do MC, as células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo foram plaqueadas em garrafas recobertas com colágeno tipo I na densidade de $0,2 \times 10^4$ células/cm² e mantidas por 5 dias. Quando as monocamadas se encontravam com 70-80% de confluência, o meio de cultivo foi removido e descartado e as garrafas lavadas com PBS [1x] estéril duas vezes a fim de remover quaisquer resíduos do meio de cultivo onde as células foram mantidas. Após as duas lavagens, 14 mL de meio de cultivo para coleta do meio condicionado (Dulbecco's Mega Cell ® suplementado com 2 mM de L-Glutamina, 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não-essenciais, 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomina) foram adicionados a cada garrafa. Após aproximadamente 16 horas (*overnight*), este meio foi coletado e submetido a duas centrifugações: a primeira a 1620 x g por 5 minutos a fim de baixar debris celulares; e a segunda a 4000 x g por 20 minutos com o objetivo de eliminar possíveis debris celulares restantes e corpos apoptóticos (CRESCITELLI *et al.*, 2013). O meio coletado foi então guardado e armazenado a 4°C, enquanto as garrafas receberam meio de cultivo padrão. Este procedimento foi realizado por 3 dias consecutivos, gerando um *pool* de MCs, o qual foi então aliqotado e estocado em freezer -80°C para posteriores experimentos (FIGURA 3.3). Para uso como controle nos experimentos, o meio de cultivo para coleta do meio condicionado (Controle MC) foi também aliqotado e mantido a -80°C.

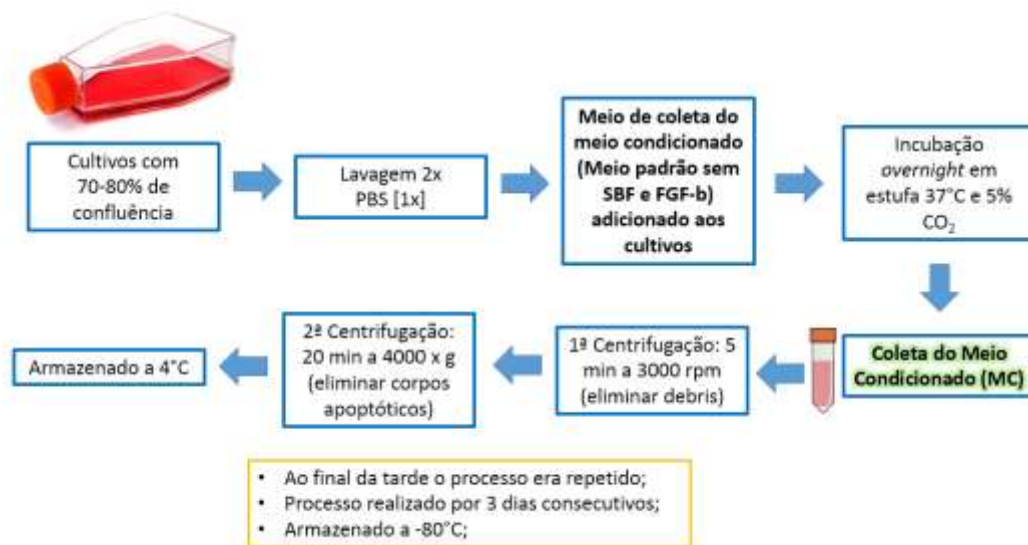


FIGURA 3.3: Esquema do protocolo de coleta do meio condicionado (MC).
 Fonte: A autora, 2014.

3.8 DESCELULARIZAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS CARDÍACAS PARA OBTENÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR

Para a obtenção da matriz extracelular (MEC) secretada pelas células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo, as células foram cultivadas em monocamada por 7 dias (o plaqueamento foi realizado na proporção de $0,2 \times 10^4$ células/cm²), momento o qual as os cultivos atingiam confluência de 90-100%. Diversos protocolos foram testados até a padronização da técnica, como por exemplo a descelularização com o uso de água MiliQ (MARTINI *et al.*, 2013), Nonidet-P40 1% (HARTMANN *et al.*, 2007) e SDS 1% (OTT *et al.*, 2008; DEQUACH *et al.*, 2010) por diferentes tempos. Ao final, o protocolo utilizado foi realizado com uma solução de 0,5% de Triton X-100, baseado em diversos trabalhos anteriormente realizados (EITAN *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012).

A descelularização das monocamadas celulares foi realizada através de cinco lavagens iniciais dos cultivos com PBS por 2 minutos sob agitação constante e posterior incubação com uma solução de Triton X-100 0,5% e 20 mM NH₄OH em PBS por 10 minutos sob agitação. Após novas lavagens com PBS por 3 minutos sob agitação constante, a fim de eliminar resíduos da solução de detergente previamente utilizada, a cultura foi tratada com DNase I tipo IV (Sigma Chemical Co, St. Louis,

MO, EUA) por 1 hora (30 minutos sob agitação constante e 30 minutos a 37°C), seguindo-se de novas lavagens com PBS por 2 minutos. Desta forma, obteve-se a MEC para os ensaios realizados neste trabalho (FIGURA 3.4).

A seguir, realizou-se a confirmação da descclularização, a qual, segundo CRAPO e colaboradores (2011), deve ser confirmada pelos seguintes critérios: ausência de núcleos e fragmentos de DNA de tamanho menor que 200 pares de bases.

Uma vez confirmada a descclularização, seguiu-se a caracterização das proteínas através de imunofluorescência.

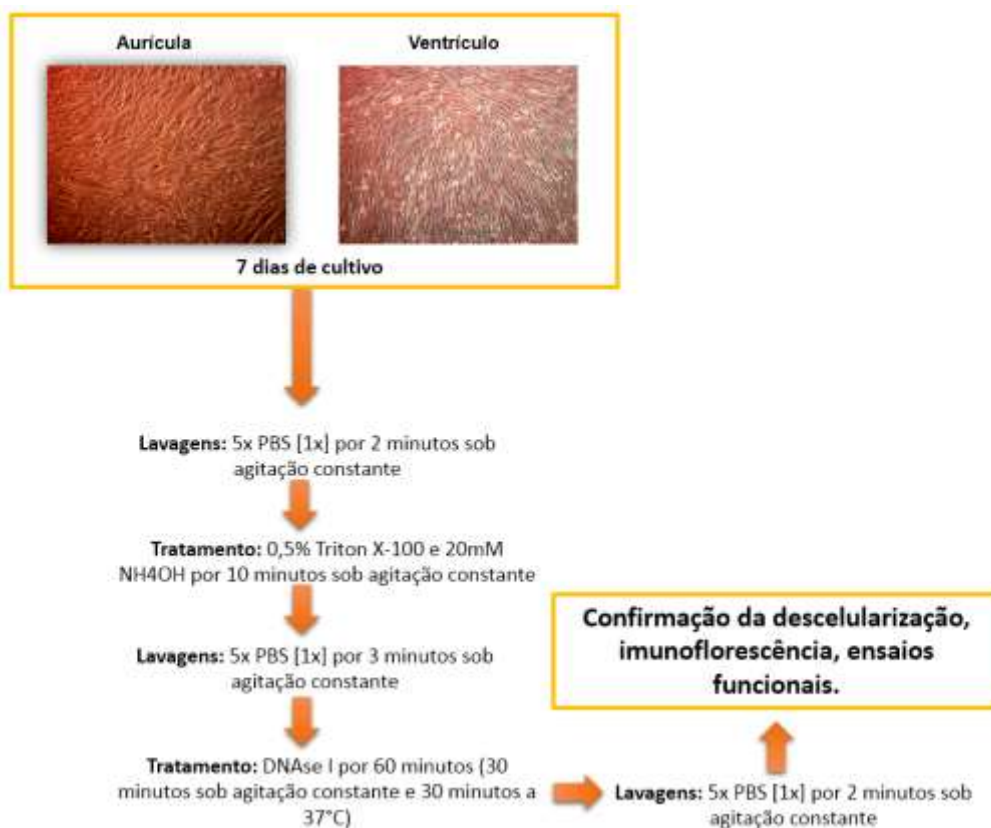


FIGURA 3.4: Esquema do protocolo de descclularização.
Fonte: A autora, 2014.

3.9 CONFIRMAÇÃO DA DESCCLULARIZAÇÃO

3.9.1 DETECÇÃO DE NÚCLEOS POR FLORESCÊNCIA

Com o objetivo de verificar a presença de núcleos nas culturas descclularizadas, realizou-se a marcação com 4'6-diamidina-2'-fenilindola (DAPI) 1 µg/ µL por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se então com 3 lavagens com PBS para eliminar resíduos de DAPI. Como controle, foram utilizadas as

culturas não-descelularizadas. As imagens foram capturadas em microscópio de epifluorescência óptica Nikon E-80i.

3.9.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA PARA CONFIRMAÇÃO DA DESCCELULARIZAÇÃO

Para a confirmação da descclularização realizou-se a extração do DNA genômico das culturas descclularizadas e não-descclularizadas (controle). Para tanto, utilizou-se o kit Qiamp DNA mini (Qiagen Inc, Austin, TX, EUA). As culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas em microtubo. Seguiu-se com a adição de 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL (inclusos no kit) e homogeneização por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C por 10 minutos e centrifugadas. Adicionou-se 100 µL de etanol 100% e realizou-se novamente a homogeneização por 15 segundos, seguindo-se de uma breve centrifugação. As amostras foram então aplicadas em uma coluna acoplada a um tubo de coleta (inclusos no kit) e centrifugadas a 6000 x g por 1 minuto. A coluna foi então acoplada a um novo tubo de coleta limpo, ao qual adicionou-se 500 µL do tampão AW1 (incluso no kit) e realizou-se uma nova centrifugação a 6000 x g por 1 minuto. A coluna foi novamente acoplada a um novo tubo de coleta, ao qual adicionou-se 500 µL do tampão AW2 (incluso no kit), seguindo-se por uma centrifugação das amostras a 20000 x g por 3 minutos. Acoplou-se a coluna a outro novo tubo de coleta, realizando-se uma nova centrifugação a 20000 x g por 1 minuto. Ao final, acoplou-se a coluna a um tubo de coleta de 1,5 mL, adicionando-se 200 µL do tampão AE. As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e o DNA foi eluído por meio de centrifugação a 6000 x g por 1 minuto. As amostras foram dosadas utilizando-se o espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenadas a -20°C.

3.10 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR POR IMUNOFLORESCÊNCIA

Com o objetivo de caracterizar morfológicamente e quantificar algumas proteínas de MEC presentes nas amostras descclularizadas e não-descclularizadas (controle), realizou-se a marcação por imunofluorescência. Para tanto, as amostras foram pré-fixadas com vapor de formaldeído por 15 minutos e posteriormente fixadas

com paraformaldeído (PFA) a 4% por 15 minutos. Em seguida, realizou-se a permeabilização em solução de PBS contendo 0,2% de Triton X-100 por 30 minutos e bloqueio com 1% de PBS/BSA por 60 minutos. As amostras bloqueadas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpos anti-laminina, anti-fibulin-2, anti-colágeno I, anti-lumican, anti-colágeno IV, anti-sindecin IV, anti-decorina, anti-colágeno III, anti-fibronectina diluídos 1:100 em solução de PBS/BSA 1%. Decorrida a incubação com os anticorpos primários, as amostras foram lavadas por 3 vezes com PBS e incubadas por 60 minutos com anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor-488 e Alexa Fluor-594 diluídos 1:800 em PBS/BSA 1% a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e foi realizada a marcação com DAPI 1 µg/ µL por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se então com 3 lavagens com PBS para eliminar resíduos de DAPI. Para ambas as condições, foram realizados controles para os anticorpos secundários. Para tanto, ao invés dos anticorpos primários, as células foram incubadas com uma solução de PBS/SBA 1% e em seguida as demais etapas foram realizadas. As amostras foram então fotografadas utilizando-se o microscópio de fluorescência LEICA DMI6000B.

3.11 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTIFICAÇÃO

As proteínas presentes no MC foram resolvidas em gel SDS-PAGE por meio de eletroforese de proteínas. Para tanto, 15 µL das amostras acrescidos de 4 µL de tampão de amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida a 10% e submetidas a uma corrente elétrica de 30 mA e voltagem de 200V por aproximadamente 2 horas. Para a visualização das proteínas no gel, realizou-se a coloração com *Comassie Blue R-250* por 30 minutos sob agitação. O gel foi então descorado posteriormente com solução de descoloração (metanol 30%, ácido acético 10%) até a visualização das bandas de proteínas.

As proteínas presentes nos MCs foram quantificadas pelo seu conteúdo proteico através do fluorômetro Qubit® 2.0 (LifeTechnologies™, Invitrogen, NY, USA) conforme instruções do fabricante.

3.12 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS SECRETADAS E PRESENTES NO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS

Com o objetivo de caracterizar o MC, três metodologias distintas foram realizadas: citometria de fluxo, arranjos de anticorpos e espectrometria de massas.

3.12.1 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR CITOMETRIA DE FLUXO

O MC proveniente das culturas de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo, bem como o meio de cultura *in natura* utilizado para obtenção do meio condicionado (controle do MC) foram analisados pelo ensaio baseado na ligação imunológica entre compostos solúveis no meio condicionado e anticorpos específicos que recobrem esferas (*Cytometric Bead Array* – CBA).

As diferentes amostras de meio foram incubadas com as esferas à temperatura ambiente por 3 horas. Decorrido o período de incubação, as esferas foram lavadas e recuperadas em tampão específico. Seguiu-se então com a detecção das amostras por citometria de fluxo, utilizando-se o kit *Human Inflammatory Cytokine Kit* (BD Biosciences), o qual permite a detecção de IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12p70, IL-17A e IFN-g. Os ensaios foram realizados no equipamento FACS Canto II e os dados analisados com o auxílio do programa FCAP Array v3.0 a fim de obter as concentrações das diferentes citocinas nos meios condicionados e meio controle.

3.12.2 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR ARRANJOS DE ANTICORPOS

Os MCs pelas células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo e o meio controle também foram analisados por meio da interação antígeno-anticorpo em arranjos de anticorpos customizados (RayBio™ Raybiotech, Norcross, GA, EUA) para o reconhecimento de fatores de crescimento e citocinas. Para tanto, os meios foram dialisados duas vezes por 3 horas a 4°C em PBS e posteriormente incubados por 30 minutos a temperatura ambiente com reagente que induz a ligação das proteínas da amostra à biotina. As amostras foram então filtradas a fim de retirar a biotina não ligada. Concomitantemente, as membranas contendo o arranjo de

anticorpos foram bloqueadas por 60 minutos em um tampão específico fornecido pelo fabricante. Os meios foram então adicionados sob as membranas (no volume de 1 mL) e incubados por 15 horas a 4°C sob suave agitação. Decorridas algumas lavagens, as membranas foram incubadas por 2 horas com estreptavidina conjugada com peroxidase em temperatura ambiente sob suave agitação. Foram realizadas mais algumas etapas de lavagem, seguindo-se da incubação das membranas com 1 mL de reagente de detecção por 2 minutos. As membranas foram então expostas ao filme Kodak x-omat (Kodak, Rochester, NY, EUA) para revelação dos pontos fluorescentes, sendo que o tempo de exposição variou entre 5-40 segundos. É importante salientar que para cada amostra foi realizada uma duplicata técnica, ou seja, foram feitas duas membranas de cada amostra.

Nas membranas, os anticorpos para os seguintes fatores foram testados (TABELA 3.1):

Anticorpos presentes nas membranas:
Albumina
Angiopoetina 1
Angiostatina
APRIL
bFGF
BLC
BMP-2
BMP-4
BTC
CCL28
CT-1
CTAK
CXCL16
CXCL14
EFG
ENA-78
Esclerotina
FGF-6
Flt-3L
GCP-2
G-CSF
GM-CSF
GRO
HB-EGF
HGF
IGF-1
IGFBP-1
IGFBP-2
IGFBP-4

IL-16
IL-6
IL-8
IP-10
I-TAC
LIF
MCP-1
MCSF
MIP-1 α
MMP-1
MMP-13
MMP-2
MMP-3
MPIF-1
Oncostatina
PDGF-AB
RANTES
SCF
SDF-1
TARC
TECK
TFG- α
TGF- β
Trompoietina
TSLP
TWEAK
VEGF
VWF
WISP

TABELA 3.1: Anticorpos testados para o reconhecimento de fatores de crescimento e citocinas nos MCs.

A figura 3.5 ilustra como funciona esta técnica. Para fins de análise e normalização dos resultados, as membranas possuem pontos correspondentes a controles positivos, controles negativos e pontos “vazios” com o objetivo de determinar os valores de *background*.

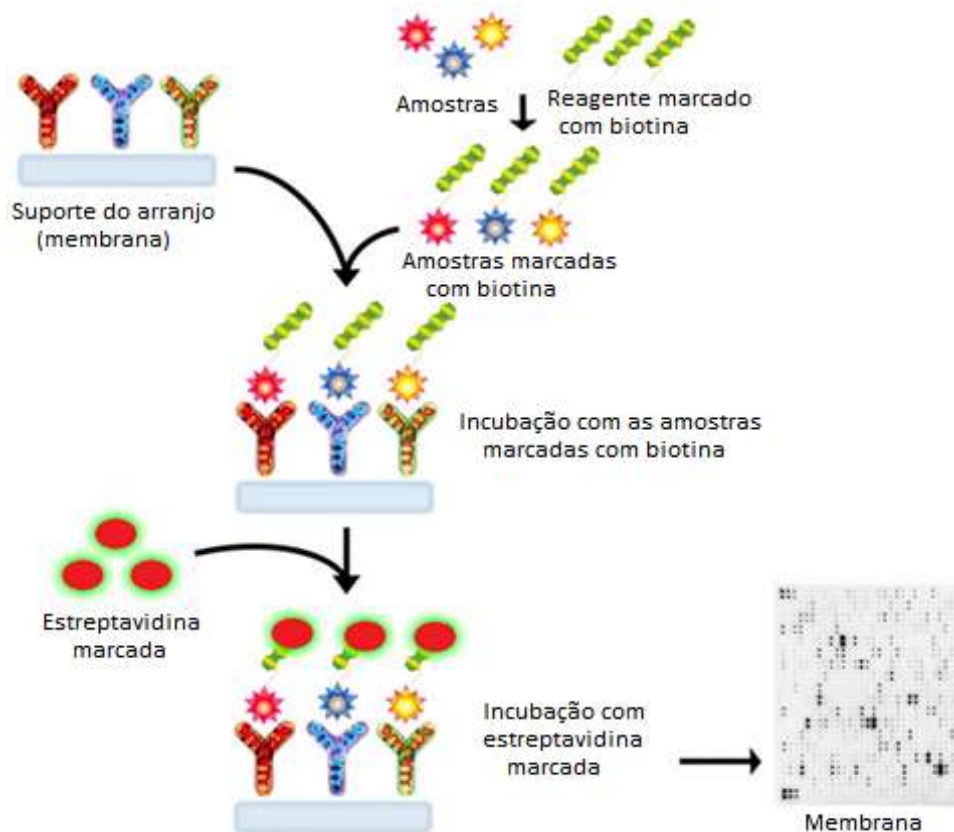


FIGURA 3.5: Modelo esquemático da metodologia de arranjo de anticorpos

FONTE: adaptado de RayBio™ (2014).

Legenda: Esquema geral de uso do RayBio™ Raybiotech, demonstrando como funciona a marcação das amostras e sua interação com o arranjo de anticorpos (membrana com anticorpos).

Os filmes Kodak x-omat sensibilizados foram escaneados e as imagens (.TIFF) foram analisadas com o auxílio do *software* ImageJ para quantificação da intensidade dos pontos; os valores das intensidades foram então importados do ImageJ para o *software* de análise fornecido pelo fabricante dos arranjos (Raybio® Analyzis Tool *software*). Em suma, os cálculos realizados pelo *software* subtraem os valores de *background* e os normalizam com a média dos controles positivos. Por fim, os valores gerados pelo *software* foram normalizados e copiados para o *software* estatístico GraphPad Prism 6 e a análise estatística foi realizada.

3.12.3 CARACTERIZAÇÃO DO MEIO CONDICIONADO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Ainda, para caracterizar de forma mais abrangente as proteínas dos MCs, os MCs pelos cultivos de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo foram

analisadas por espectrometria de massas. A preparação ocorreu de acordo com o método de “*filter aided proteome preparation*” (FASP) (WISNIEWSKI *et al.*, 2009), que consiste em um método para geração de peptídeos trípticos para posterior análise por meio de espectrometria de massas, fazendo o uso de um sistema de filtração (Amicon 10kDa, Milipore) para o preparo das amostras. Esta metodologia permite a análise de células e tecidos lisados com detergente, sendo possível retirar resíduos do mesmo, resultando portanto em uma análise mais acurada da amostra.

O protocolo foi iniciado partindo-se de 30 µg de proteína por amostra. Em cada uma das amostras foi adicionado inibidor de protease (Roche, cat.: 04693159001; concentração final = [1x]), ditioneitol (DTT, concentração final = 1mM) e SDS 25% (concentração final = 4%), seguido de incubação por 20 minutos a 37°C sob agitação. Em seguida, transferiu-se as amostras para o sistema de filtração Amicon 10k para o restante do procedimento. Seguiram-se várias lavagens com uréia 8M e posterior incubação com iodocetamida (IAA) e solução de bicarbonato de amônio 50 mM por 20 minutos no escuro, seguindo-se com a adição da tripsina na proporção 1:1000 (tripsina:proteína, relação de massa) e incubação em câmara úmida 37°C por 12-18 horas. Em seguida, foram realizadas novas lavagens com a solução de bicarbonato de amônio e a inativação da tripsina foi realizada com a adição de uma solução de 5% de acetonitrila e 1% de ácido trifluoroacético. Finalmente, as amostras foram inseridas nos “*stage-tips*” (membrana C18 Empore em ponteira P200 da Eppendorf) e armazenadas a 4°C até o momento de serem eluídas e analisadas. Os peptídeos foram analisados pelo espectrômetro de massas Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL, sendo que a identificação ocorreu através do programa MaxQuant platform. Todas as análises foram realizadas em relação ao meio de cultura *in natura* utilizado para obtenção do MC (Controle do MC).

3.13 ENSAIOS FUNCIONAIS

Após a obtenção da MEC e do MC pelo cultivo de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo, estes foram testados em ensaios funcionais envolvendo células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (aCTMs) derivadas de tecido adiposo. Para estes ensaios, 5 foram as condições testadas (YING *et al.*, 2013):

- 1) Controle (aCTMs cultivadas sobre filme de colágeno I em DMEM 10% SBF, 1% L-Glutamina, 1% PS);

- 2) MEC (aCTMs cultivadas sobre MEC derivada de células cardíacas em DMEM 10% SBF, 1% L-Glutamina, 1% PS);
- 3) MEC + MC (aCTMs cultivadas sobre MEC derivada de células cardíacas em meio composto por: 50% de DMEM 10% SBF, 1% L-Glutamina, 1% PS e 50% de MC);
- 4) MC (aCTMs cultivadas sobre filme de colágeno I em meio composto por: 50% de DMEM 10% SBF, 1% L-Glutamina, 1% PS e 50% de MC);
- 5) CM (aCTMs cultivadas sobre filme de colágeno I em meio composto por: 50% de DMEM 10% SBF, 1% L-Glutamina, 1% PS e 50% do meio de cultura *in natura* utilizado para obtenção do MC – Controle do MC);

É importante salientar que para todos os experimentos, tanto as células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo, quanto as aCTMs foram utilizadas somente nas passagens entre 4 e 8.

3.13.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Com o objetivo de avaliar a viabilidade celular relativa das aCTMs cultivadas sobre MEC e/ou com o MC obtidos de células cardíacas, foi realizado ensaio de captação do Vermelho Neutro (VN) (ICCVAM, 2006). O objetivo deste ensaio é avaliar a viabilidade relativa por meio da incorporação do corante pelos lisossomos. Desta forma, é possível avaliar se um determinado tratamento interfere com a viabilidade celular, servindo portanto como indicador de citotoxicidade.

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica decorridos 3 dias de cultivo em placas de 96 poços. O meio de cultivo foi retirado e as células lavadas com 250 µL de D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; PBS [1x] acrescido de cloreto de magnésio e cloreto de cálcio). Em seguida, 250 µL da solução de VN (solução estoque diluída em DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado com 5% SBF, 2 mM de L-Glutamina e 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomina) foi adicionada aos poços. As amostras foram então incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 3 horas. Decorrido o período de incubação, a solução de VN foi retirada dos poços e os mesmos foram lavados com 250 µL de D-PBS. Então, adicionou-se 100 µL de solução dessorbante (50% etanol, 1% ácido acético, 49% de água miliQ) aos poços. As placas foram mantidas sob agitação por 20-40 minutos sob proteção da luz, seguindo-se com 5 minutos de

repouso e posterior leitura das absorbâncias a 540 nm em multileitora Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek). As tabelas geradas em Excel foram exportadas e todos os valores foram verificados em relação a presença de *outliers* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem em relação ao controle, exportados para o programa GraphPad Prism 6 e analisados.

3.13.2 ANÁLISE DA MORTE CELULAR POR MARCAÇÃO DE ANEXINA-V E 7-AMINOACTINOMICINA D

A avaliação da morte celular por apoptose ou necrose nos cultivos com as MECs e os MCs consiste em um importante parâmetro a ser avaliado, visto que as condições de cultivo das células podem induzir ou inibir a morte celular. A fim de avaliar este parâmetro, realizou-se ensaio utilizando marcação dupla com anexina-V e 7-AAD (BD Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. A anexina-V é utilizada como marcador de células em processo de apoptose, quando ocorre exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática. O 7-AAD tem alta afinidade pelo DNA e se intercala a ele marcando células em processo de morte celular que apresentam perda da seletividade de membrana. Portanto, visando analisar se os cultivos sobre MEC e/ou com o MC poderiam levar as células a morte, além de corroborar os dados indicados pelo ensaio do VN, realizou-se o ensaio de anexina-V e 7-AAD após 7 dias de cultivo. Os cultivos de aCTMs foram realizados em placas de 6 poços em uma densidade de $0,2 \times 10^4$ células/cm² no momento do plaqueamento. Foram utilizados 2 poços para cada condição e o ensaio foi realizado em triplicata biológica. Decorridos os 7 dias de cultivo, as aCTMs foram dissociadas enzimaticamente com o uso de tripsina, lavadas e incubadas com anexina-V (2,5 µL) e 7-AAD (1 µL) durante 20 minutos. Ao final, 300 µL de reagente de marcação foram adicionados a amostra, seguindo-se com leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience). Os dados obtidos foram então analisados com o auxílio do programa FlowJo 7.5 (Flowjo, USA) e ao final, as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 6.

3.13.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de avaliar se a MEC e/ou o MC obtidos de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo poderiam levar a alterações na taxa de proliferação celular de aCTMs, foi realizada a marcação das células com um nucleosídeo análogo a timidina – Edu (Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Kit – Invitrogen, NY, USA). Para tanto, as aCTMs (triplicata biológica) foram cultivadas em placas de 6 poços. Decorridas 24 horas após o plaqueamento das células, as aCTMs foram marcadas com EdU. Após 48 horas transcorridas do início do ensaio, as aCTMs foram submetidas a lavagem por 2 vezes com PBS, tripsinizadas, fixadas (15 minutos) e permeabilizadas (15 minutos), sendo o fixador e o permeabilizante fornecidos pelo kit. As células foram então incubadas com o coquetel Click-iT contendo Alexa fluor 647 por 30 minutos sob proteção da luz e os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (FACSCanto II – BD Bioscience). Os dados obtidos foram analisados com o programa FlowJo 7.5 (Flowjo, USA) e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

3.13.4 AVALIAÇÃO DA ADESÃO CELULAR

A fim de avaliar se as MECs obtidas de células cardíacas derivadas de explantes de aurícula e ventrículo poderiam levar a mudanças na capacidade de adesão das aCTMs, realizou-se o ensaio de adesão celular. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade de 5×10^4 células por poço. Os cultivos foram então mantidos em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 10, 20 e 40 minutos. Decorridos estes períodos, as células foram submetidas à agitação (100rpm) e então fixadas com PFA 4% por 15 minutos, seguindo-se de duas lavagens com PBS. Os poços foram então corados com DAPI por 10 minutos. A fim de quantificar o número de células aderidas, 5 fotos de cada poço foram registradas com o uso do microscópio de fluorescência LEICA DMI6000B. A quantificação foi então realizada através do programa ImageJ 1.46. Por fim, realizou-se a verificação de *outliers* (<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) dos valores obtidos e foi calculada a média da triplicata biológica. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

3.13.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de avaliar o efeito da MEC e/ou do MC no processo de migração celular, utilizou-se o modelo experimental de “cicatrização de feridas” (*scratch-wound assay*). Neste ensaio, há a remoção de células por meio da realização de um risco na monocamada celular confluenta com o uso de uma ponteira estéril. Desta forma, avalia-se a eficiência celular em migrar para a região onde as células foram anteriormente removidas, analisando-se se há maior ou menor eficiência no fechamento da “cicatriz”. Para tanto, aCTMs (triplicata biológica) foram plaqueadas na quantidade de 2×10^4 células/poço em placas de 6 poços. Após os cultivos atingirem a confluência de 100%, realizou-se o risco na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 10 μ L. Em seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com BSS.CMF a fim de remover os restos celulares provenientes da possível ruptura de células. As monocamadas foram então mantidas com meio de cultivo padrão.

As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por até 24 horas. A progressão da migração foi fotografada imediatamente após a realização do risco na monocamada (tempo 0), e em seguida após 12 e 24 horas. Para cada condição, 5 fotos foram obtidas; a aquisição das mesmas foi realizada sempre no mesmo campo com o auxílio de microscópio invertido NIKON ECLIPSE E600. A eficiência de migração foi então avaliada através da contagem de células entre a região da monocamada riscada originalmente (tempo 0) e após 12 e 24 horas de cultivo. A contagem foi realizada manualmente e os valores foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

3.13.6 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA – Avaliação de marcadores de diferenciação cardíaca por imunofluorescência

As aCTMs (triplicata biológica) foram plaqueadas na proporção de $0,2 \times 10^4$ células/cm² e cultivadas sobre MEC e/ou MC obtidos de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo por 7 dias em placas de 24 poços. Estas foram pré-fixadas com vapor de formaldeído por 15 minutos e fixadas com PFA 4% por 15 minutos. O fenótipo das aCTMs cultivadas com MEC e/ou MC foi avaliado através da imunomarcagem de proteínas relacionadas à diferenciação cardíaca (GATA-4 e troponina I).

Para tanto, conforme explanado anteriormente no protocolo de imunofluorescência de proteínas de MEC (Item 3.10), realizou-se a permeabilização dos cultivos, seu bloqueio com 1% de PBS/BSA e incubação com anticorpos policlonais anti GATA-4 e anti troponina I, diluídos 1:100 em solução de PBS/BSA 1%. As amostras foram então incubadas com o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Fluor 594 diluído na proporção 1:800 em PBS/BSA 1% a temperatura ambiente protegidos da luz. Após, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e foi realizada a marcação com DAPI 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ por 10 minutos a temperatura ambiente. Para cada amostra, 25 fotos foram adquiridas com auxílio do microscópio ImageXpress (Molecular Devices), o qual captura fotos automaticamente nos mesmo sítios. Para análise dos dados, utilizou-se o programa MetaXpress (Molecular Devices), onde tabelas em formato Excel foram geradas. Os valores foram então verificados quanto a presença de *outliers* ([http://graphpad.com/quickcalcs/ Grubbs1.cfm](http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm)) e a análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6. É importante salientar também que através desta análise, foi possível obter o número de células (através da quantificação dos núcleos) decorridos 7 dias.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados extraídos dos ensaios foram plotados e analisados no programa estatístico Graphpad Prism versão 6, utilizando-se o teste ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet. Desta forma, foi possível uma comparação de todas as condições experimentais em relação aos controles (Controle e Controle do MC). Os valores considerados significativos foram aqueles que tiveram um $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS CARDÍACAS DERIVADAS DO CULTIVO DE EXPLANTES DE AURÍCULA E VENTRÍCULO – População celular heterogênea

Para os ensaios de caracterização celular, foram realizados ensaios de imunofenotipagem utilizando células derivadas do cultivo de explantes de aurícula e ventrículo cardíaco de um mesmo doador. O objetivo de se utilizar as células provenientes de apenas um doador, em passagens controladas de cultivo, foi o de obter MEC e MC homogêneos para avaliação de seus efeitos biológicos sobre os cultivos de aCTMs. Pelo fato de trabalharmos com células de cultivo primário criopreservadas, avaliamos o fenótipo das populações celulares, entre as passagens 4 e 8. Além disso, as células cardíacas derivadas de explantes de aurícula e ventrículo utilizadas neste trabalho foram previamente caracterizadas enquanto cultivos primários em outro trabalho de nosso laboratório. De acordo com este trabalho, estas células compõem uma população heterogênea que expressa marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90, CD105), de pericitos (CD140b, fosfatase alcalina) e células progenitoras cardíacas residentes (CD117), além de expressar também marcadores de fibroblastos como colágeno 1A e FSP1 (proteína específica de fibroblastos) (AGUIAR *et al.*, 2011).

De acordo com nossos resultados, as populações celulares derivadas de aurícula e ventrículo são heterogêneas, assim como distintas entre si (TABELA 4.1). Estas populações apresentam células com marcadores de células-tronco mesenquimais – CD90, CD105, CD73 – e ausência de marcadores hematopoiéticos – CD34, CD11b, CD45, CD19 e HLADR. Considerando este fenótipo e os resultados de Aguiar e colaboradores (2011), nos quais se observa (ao menos para as células derivadas de aurícula) o potencial de diferenciação celular, pode-se dizer que esta população é composta por células-tronco mesenquimais. Em relação ao marcador CD90, semelhante ao que foi observado na caracterização prévia destas populações (AGUIAR *et al.*, 2011), encontra-se mais expresso nas populações derivadas de aurícula do que de ventrículo (TABELA 4.1).

Marcadores Imunofenotípicos	% de células positivas na aurícula	% de células positivas no ventrículo	
CD90	59,48	29,6	Células-tronco mesenquimais
CD105	99,68	94,32	
CD73	99,91	99,25	
CD34	2,01	2,49	Células hematopoiéticas
CD11b	1,77	1,66	
CD45	1,61	1,15	
CD19	1,95	1,1	
HLADR	1,76	0,74	
CD31	1,72	1,91	Células endoteliais
CD146	5,81	14,32	Pericitos/ células musculares lisas
ALPL	2,1	3,79	
CD140b	5,96	9,99	
CD117	2,34	1,66	Células progenitoras
SCA-1	1,53	1,33	
CD56	1,59	1,12	
DDR-2	38,23	17,75	Fibroblastos cardíacos

TABELA 4.1: Percentual de células positivas para diferentes marcadores de superfície celular dentro das populações celulares derivadas de explantes cardíacos de aurícula e ventrículo. As imunofenotipagens celulares foram realizadas através de citometria de fluxo. Legenda: as cores na tabela definem os grupos de marcadores relacionados a uma determinada linhagem celular. Azul: células-tronco mesenquimais, fibroblastos; Laranja: células hematopoiéticas; Amarelo: células endoteliais; Verde: pericitos, células musculares lisas; Rosa: células progenitoras e possivelmente progenitoras cardíacas; Roxo: fibroblastos cardíacos.

Da mesma forma, ambas as populações possuem marcação positiva para CD146 e CD140b, os quais são presentes em pericitos e em outros tipos celulares, como células de músculo liso.

Em relação aos marcadores de células progenitoras, CD117, SCA-1 e CD56, assim como para o marcador de células endoteliais, CD31, a expressão foi baixa, semelhante ao controle isotípico. Sendo assim, não se pode afirmar que houve expressão destes marcadores nestas populações. No que se refere ao marcador de

fibroblastos cardíacos DDR-2, houve significativa marcação em ambas as populações, sendo mais presente na população de células derivadas de aurícula. Embora os fibroblastos também possuam a presença do marcador de superfície CD105, observamos que apenas uma parte da população que expressa este marcador teve marcação positiva para DDR-2, o que indica que grande parte da população é composta por células-tronco mesenquimais.

Portanto, de acordo com nossos resultados, confirmamos que ambas as populações são heterogêneas e distintas entre si. Isto torna o uso destas células ainda mais interessante, visto que poderiam mimetizar o microambiente cardíaco, o qual é composto por diferentes tipos celulares. Em nossos resultados, observamos também a possível presença de pericitos/miofibroblastos em ambas as populações celulares (presença dos marcadores CD146 e CD140b). Levando-se em consideração que os pericitos e miofibroblastos estão relacionados ao reparo de lesões teciduais (SILVESTRE *et al.*, 2013), a possível presença destas células nas populações derivadas do cultivo de explantes cardíacos poderia sugerir a secreção de fatores relacionados a imunorregulação, regeneração do músculo cardíaco e estímulo da angiogênese (CHEN *et al.*, 2013).

Confirmamos também a presença de células-tronco mesenquimais, que participam da regulação da resposta imune e contribuem para processos de reparação tecidual em diferentes condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares e músculo-esqueléticas. De fato, estas células fornecem um microambiente repleto de sinais tróficos e de sobrevivência, incluindo fatores de crescimento e citocinas, além de micro e nano-vesículas (BAGLIO *et al.*, 2012). Pelo fato de as células-tronco mesenquimais estarem presentes em ambas as populações, acreditamos que haja a secreção de moléculas com atividade parácrina pelos cultivos de células cardíacas.

Da mesma forma, confirmamos a presença de fibroblastos cardíacos nos cultivos de aurícula e ventrículo. Estas células desempenham um papel crucial na manutenção das funções cardíacas, bem como no remodelamento cardíaco durante condições patológicas, como no infarto do miocárdio; são responsáveis pela síntese e deposição de matriz extracelular, comunicação célula-célula com os miócitos, sinalização célula-célula com outros fibroblastos assim como com células endoteliais (SOUDERS *et al.*, 2009). Portanto, a presença destas células em ambas as populações sugere que haja a secreção de fatores relacionados ao remodelamento, bem como secreção de MEC por estes cultivos.

Dessa maneira, a heterogeneidade das populações celulares derivadas de explantes de aurícula e ventrículo pode permitir com que se tenha um microambiente que, de certa forma, mimetize o microambiente cardíaco. Pelo fato destas populações serem compostas de diferentes tipos celulares, as proteínas de MEC e os fatores solúveis secretados por estas diferentes células podem levar ao disparo das mais diversas vias de sinalização, as quais influenciariam o comportamento biológico das células-tronco mesenquimais.

4.2 DESCELULARIZAÇÃO DAS MONOCAMADAS CELULARES – Padronização de protocolo combinado de Triton X-100, NH₄OH e DNase 1

Com o objetivo de se obter as proteínas de MEC provenientes dos cultivos de células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo, realizamos a descелularização das monocamadas conforme protocolo descrito anteriormente na seção Material e Métodos. Ao final das etapas dos protocolos de descелularização, confirmamos a eficiência do método através da ausência de marcação dos núcleos por DAPI e da drástica redução do conteúdo de DNA após extração, seguindo os critérios mínimos descritos por Crapo e colaboradores (CRAPO *et al.*, 2011).

Alguns protocolos de descелularização foram realizados até a padronização do método descrito neste trabalho. Esta padronização prévia teve como objetivo manter a MEC o mais íntegra possível e garantir a remoção total dos núcleos celulares. Portanto, iniciamos os protocolos de descелularização da forma mais branda possível.

Primeiramente, testamos a descелularização das monocamadas com o uso de água miliQ (MARTINI *et al.*, 2013). Porém, utilizando este protocolo, a remoção total dos núcleos ou dos fragmentos nucleares não foi eficiente (FIGURA 4.1). O mesmo foi observado em outras tentativas de descелularização com Nonidet-P40 1% (HARTMANN *et al.*, 2007) (FIGURA 4.2) e SDS 1% (DEQUACH *et al.*, 2010) (FIGURA 4.3).

Baseado em trabalhos anteriores (EITAN *et al.*, 2010; LAI *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012), padronizamos a descелularização das monocamadas com uma solução de Triton X-100 0,5% e 20 mM NH₄OH e posterior tratamento com DNase I. Neste caso, como forma de confirmar a eficiência da descелularização, em um primeiro momento, realizamos a coloração dos núcleos com DAPI. Através desta

técnica e considerando sua sensibilidade, constatamos a completa ausência de DNA na cultura descelularizada (FIGURA 4.4).

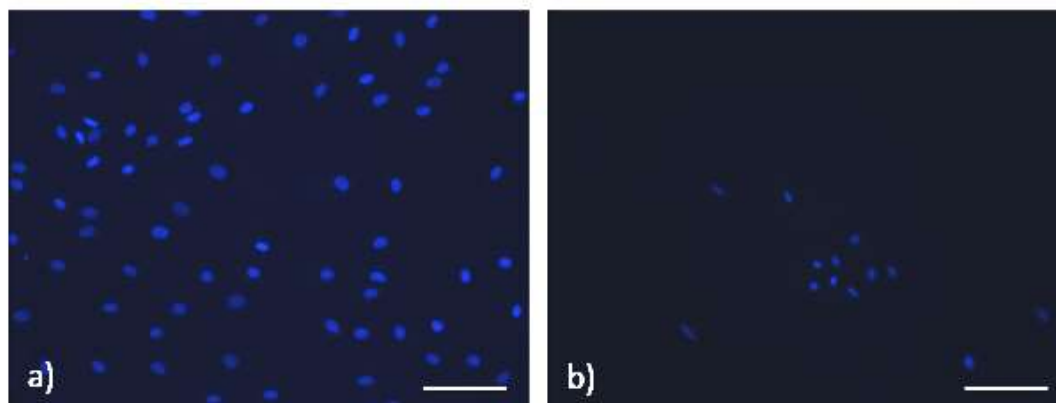


FIGURA 4.1: Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo MARTINI e colaboradores (2013). Coloração com DAPI das culturas de células cardíacas de aurícula antes (a) e após o processo de descelularização com água miliQ (b). Aumento de 20x. A barra corresponde a 100 μ m. FONTE: A autora, 2013.

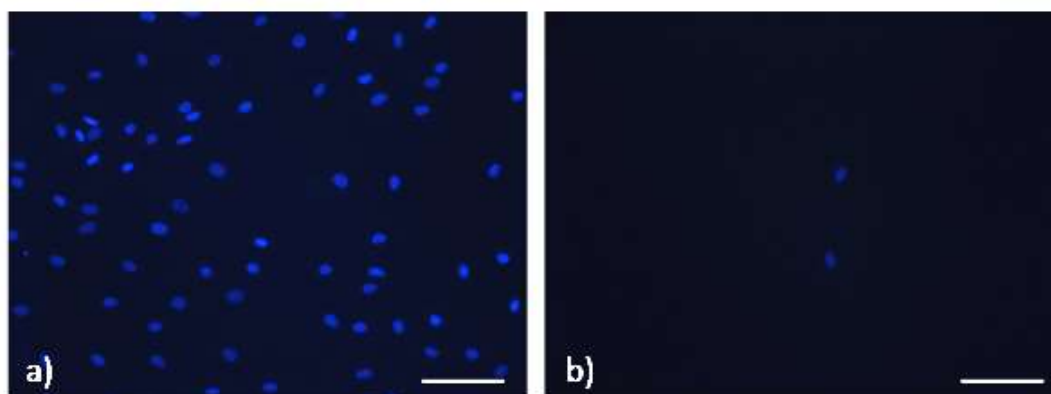


FIGURA 4.2: Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo HARTMANN e colaboradores (2007). Coloração com DAPI das culturas de células cardíacas de aurícula antes (a) e após o processo de descelularização com Nonidet-P40 1% (b). Aumento de 20x. A barra corresponde a 100 μ m. FONTE: A autora, 2013.

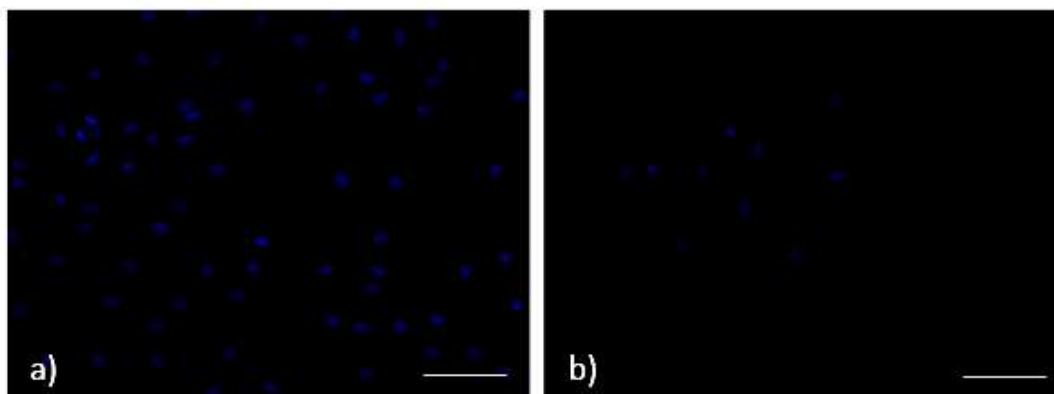


FIGURA 4.3: Imagens ilustrativas do processo de descelularização de monocamadas celulares segundo DeQuach e colaboradores (2010). Coloração com DAPI das culturas de células cardíacas de aurícula antes (a) e após o processo de

descelularização com SDS 1% (b). Aumento de 20x. A barra corresponde a 100 μm .
 FONTE: A autora, 2013.

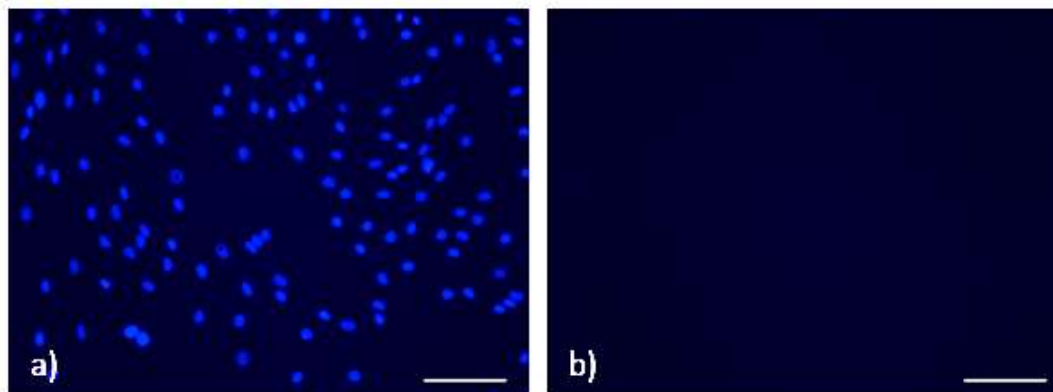


FIGURA 4.4: Imagens ilustrativas do processo de descclularização de monocamadas celulares padronizado para uso neste trabalho. Coloração com DAPI das culturas de células cardíacas de aurícula antes (a) e após o processo de descclularização com Triton X-100 0,5% e 20 mM NH_4OH (b). Aumento de 20x. A barra corresponde a 100 μm . FONTE: A autora, 2013.

Em um segundo momento, para a confirmação final da descclularização, amostras controle e descclularizadas foram submetidas à extração de DNA a fim de se verificar a quantidade e o tamanho dos possíveis fragmentos de DNA remanescente na cultura. A quantificação do DNA por espectrofotometria demonstrou redução drástica de pelo menos 75% na quantidade de DNA após a descclularização (TABELA 4.2). Confirmando estes resultados, após avaliação das amostras em gel de DNA, não foi observada presença de bandas nas amostras descclularizadas, diferentemente das amostras controle (FIGURA 4.5).

Amostra	[DNA] ng/μL	Absorbância 260/280 nm
A	41,9	2,17
AD 1	6,3	1,32
AD 2	1,9	4,60
V	23,5	2,25
VD 1	2,6	1,24
VD 2	2,9	2,25

TABELA 4.2: Quantidade de DNA encontrada antes (Aurícula, Ventrículo) e depois da descclularização (AD1, AD2, VD1, VD2). Legenda: A – Aurícula fresca; AD – Aurícula Descclularizada; V – Ventrículo fresco; VD – Ventrículo Descclularizado.

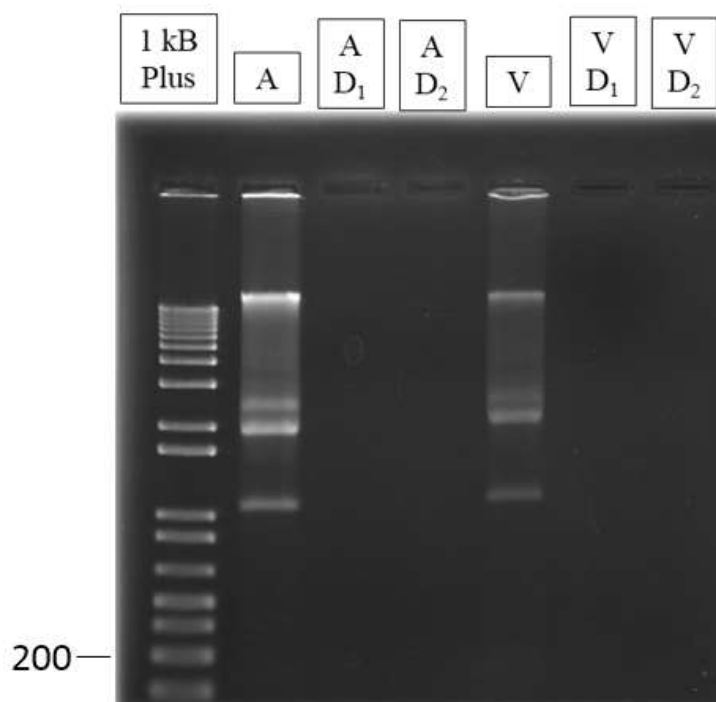


FIGURA 4.5: Gel de DNA (agarose 1%) para amostras não-descelularizadas (A, V) e descelularizadas (AD1, AD2, VD1, VD2). Legenda: A – Aurícula fresca; AD – Aurícula Descelularizada; V – Ventrículo fresco; VD – Ventrículo Descelularizado; 200 – corresponde a 200 pares de bases do 1 kb plus.
 FONTE: A autora, 2013.

Portanto, considerando os resultados acima, julgamos que o protocolo de descclularização das monocamadas de células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo foi padronizado. Este protocolo obedece aos critérios mínimos de descclularização descritos por Crapo e colaboradores (2011), que são a ausência de núcleos e de fragmentos de DNA maiores que 200 pares de bases nas amostras descclularizadas. Desta forma, esta metodologia foi empregada para os demais ensaios.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR – Descclularização altera a composição da MEC

Com o objetivo de caracterizar as proteínas de MEC secretadas e depositadas pelos cultivos celulares na superfície de cultura, assim como validar o método de descclularização padronizado, avaliamos por imunofluorescência a presença de algumas proteínas de MEC (laminina, fibulina-2, colágeno tipo I, lumican, colágeno tipo IV, sindecan 4, decorina, colágeno tipo III e fibronectina). As imunomarcações foram realizadas antes (controle positivo) e após a descclularização.

Os dados obtidos demonstram que o processo de descelularização foi capaz de preservar algumas proteínas adsorvidas na superfície de cultivo, ainda que, de forma geral, a disposição destas proteínas na placa não seja a mesma daquela observada nos cultivos íntegros (FIGURAS 4.6 e 4.7). Observamos ainda que nem todas as proteínas de MEC avaliadas permaneceram adsorvidas na placa de cultivo após a descelularização. Laminina, lumican, sindecan 4 e colágeno tipo III foram detectados apenas nas amostras controle (FIGURA 4.8). Além disso, considerando as imunomarcações após o processo de descelularização, observamos que decorina 4 permaneceu apenas nos cultivos de células derivadas de aurícula e que colágeno tipo IV esteve presente apenas nos cultivos de células de ventrículo. Desta forma, acreditamos que a ausência de algumas proteínas nos cultivos descelularizados esteja relacionada ao processo de descelularização em si. Em nosso protocolo de descelularização utilizamos o detergente Triton X-100, que é o detergente não-iônico mais utilizado em protocolos de descelularização, sendo responsável pela quebra de interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína e deixando as interações proteína-proteína intactas e em uma conformação funcional (SEDDON *et al.*, 2004). Entretanto, alguns trabalhos já relataram haver alterações na estrutura da MEC após a descelularização com Triton X-100, como mudanças na distribuição de colágeno, retirada quase total de glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina, laminina e fibronectina (GRAUSS *et al.*, 2005). Embora a utilização deste detergente permita a descelularização eficiente das monocamadas, ao contrário de métodos enzimáticos e osmóticos, observou-se que o tratamento com Triton X-100 pode levar à perda de proteínas de MEC (MEYER *et al.*, 2006).

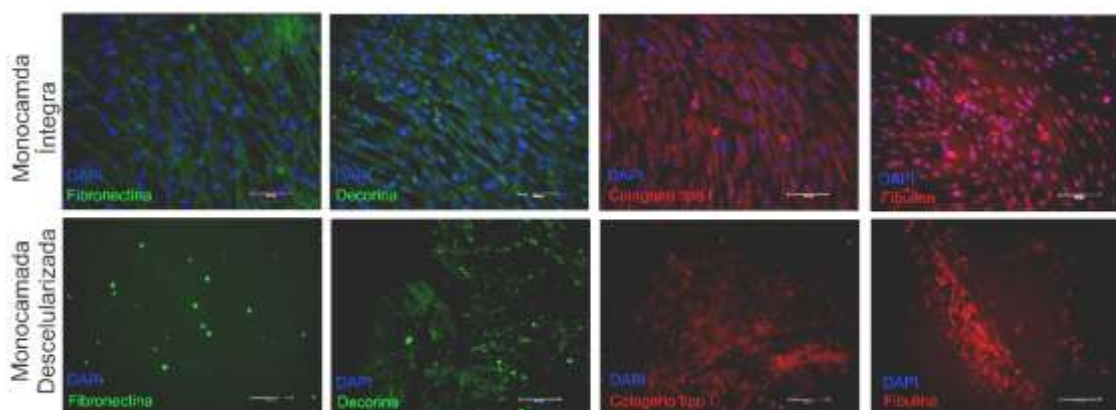


FIGURA 4.6: Identificação de proteínas de MEC em cultivos de células cardíacas humanas derivadas de aurícula (Fibronectina, Decorina, Colágeno tipo I, Fibulina-2), controle e descelularizados. A barra corresponde a 100 μ m.

FONTE: A autora, 2013.

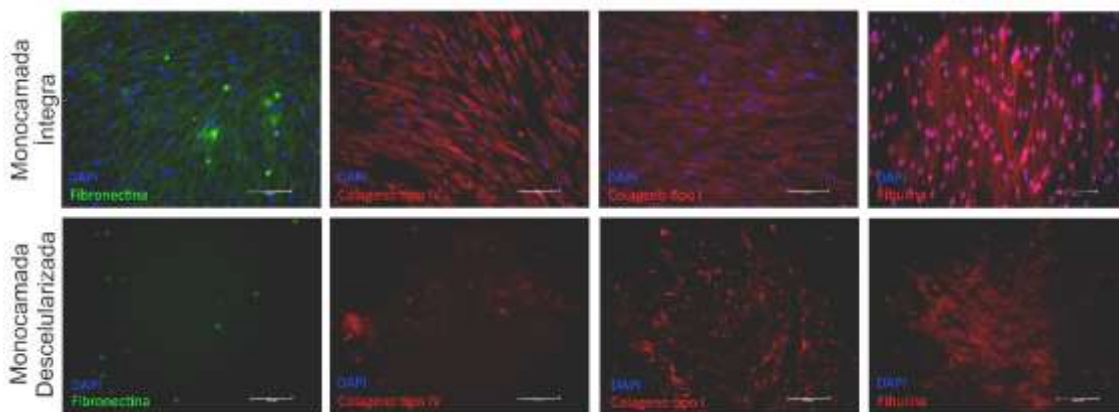


FIGURA 4.7: Identificação de proteínas de MEC em cultivos de células cardíacas humanas derivadas de ventrículo (Fibronectina, Colágeno tipo IV, Colágeno tipo I, Fibulina-2), controle e descelularizados. A barra corresponde a 100 μ m.

FONTE: A autora, 2013.

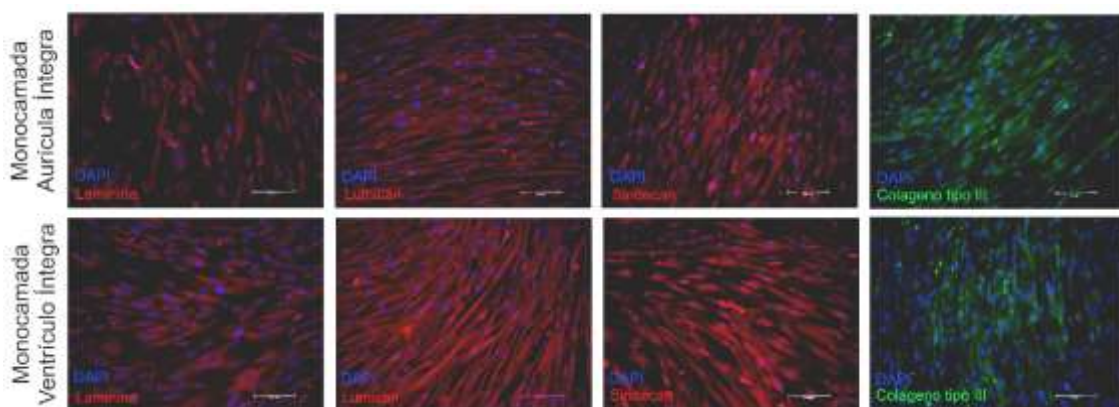


FIGURA 4.8: Imagens representativas das imunomarcações para as proteínas de MEC (Laminina, Lumican, Sindecan 4, Colágeno tipo III) nos cultivos íntegros de células de aurícula e ventrículo. A barra corresponde a 100 μ m.

FONTE: A autora, 2013.

No trabalho realizado por Xing e colaboradores (2014) já foi relatado haver mudanças na estrutura da MEC após descelularização de monocamadas com o uso do detergente SDS. Neste caso, ao mesmo tempo em que o detergente promoveu a descelularização eficiente no que tange a remoção de resíduos celulares, levou ao comprometimento na quantidade de proteínas e na força mecânica da MEC remanescente após o processo de descelularização. Foi observado também que a ultraestrutura das fibras da MEC se tornou diferente após a descelularização e a quantidade de colágeno, fibronectina, elastina, glicosaminoglicanos e fatores de crescimento ligados a MEC decresceu significativamente. No presente trabalho, buscou-se empregar outro método de descelularização mais brando através de choque térmico. Porém, neste caso, embora a MEC tenha se mantido mais íntegra, uma grande quantidade de componentes celulares permaneceu após a descelularização (88% da quantidade de DNA). Portanto, ao passo que o uso de

detergentes traz desvantagens como diminuição do conteúdo de proteínas de MEC, ele é capaz de promover de fato a descelularização eficiente, dentro dos critérios estabelecidos por Crapo e colaboradores (2011) (CRAPO *et al.*, 2011).

No estudo realizado por Lin e colaboradores (2012), a metodologia de descelularização de monocamadas celulares foi realizada de maneira muito semelhante a deste trabalho. Muito embora o detergente Triton X-100 tenha sido empregado para a descelularização, os autores demonstram que a atividade biológica da MEC foi mantida. Neste caso, observou-se que a MEC secretada por CTMs foi capaz de induzir maior proliferação, adesão, migração e diferenciação destas células (LIN *et al.*, 2012). Em outro trabalho, realizado por Chen e colaboradores (2007), no qual o processo de descelularização foi realizado pelo mesmo protocolo, observou-se que a MEC derivada de células de medula óssea também teve influência sob o comportamento celular, induzindo a expansão de CTMs derivadas de medula e prevenindo-as da diferenciação em osteoblastos (CHEN *et al.*, 2007).

Portanto, embora nem todas as proteínas de MEC tenham permanecido após o processo de descelularização, constatamos que algumas destas se mantêm adsorvidas à superfície de cultivo. Desta forma, procedemos a avaliação da atividade biológica da MEC através da análise do comportamento das células cultivadas sobre esta.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS – Elementos relacionados ao reparo cardíaco e regeneração tecidual

O meio condicionado é uma complexa mistura de diversos fatores como proteínas, lipídeos, vesículas, citocinas, fatores de crescimento, dentre outros e corresponde ao conjunto de fatores secretados pelas células durante o período em que foi coletado (CAPLAN e DENNIS, 2006; TIMMERS *et al.*, 2011). Dados prévios de nosso grupo indicam que o meio condicionado de tecido cardíaco humano apresenta diversas proteínas relacionadas a resposta imune, regeneração e cicatrização tecidual (SCHITTINI *et al.*, 2010; ROBERT, 2014). Desta forma, uma questão levantada por nosso grupo foi avaliar se as células cardíacas obtidas de explantes de tecido cardíaco humano também poderiam secretar elementos bioativos importantes para a regeneração cardíaca, inclusive com menor presença

de proteínas relacionadas ao processo mecânico e a restos celulares, uma vez que a obtenção do meio condicionado não ocasiona rompimento celular. Para a caracterização de algumas proteínas presentes no meio condicionado (MC) por células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo, realizamos três metodologias: identificação por citometria de fluxo, arranjo de anticorpos e espectrometria de massas, conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

Com o objetivo de identificar algumas citocinas pró e anti-inflamatórias, as quais podem influenciar a diferenciação, proliferação, migração e até morte das células cultivadas com MC, o ensaio denominado CBA (*Cytometric bead array*) foi realizado para as seguintes citocinas: hIL-1b, hIL-2, hIL-4, hIL-6, hIL-8, hIL-10, hIL-12p70, hIL-17A, hTNF, hIFN-g.

Algumas citocinas foram detectadas nos MCs por células derivadas de explantes de aurícula (MCa) e ventrículo (MCv) quando comparadas com o meio controle (controle do MC). A citocina pró-inflamatória IL-1b foi detectada em ambos os MCs coletados, tendo uma maior concentração no MCv (FIGURA 4.9). Sabe-se que essa interleucina, juntamente com o TNF- α , são reconhecidas como as principais mediadoras no processo de reparo vascular. Muito embora seja considerada uma citocina pró-inflamatória, a IL-1b possui um papel chave na angiogênese, ao mesmo tempo que promove a proliferação, migração e adesão de células progenitoras endoteliais, fundamentais na regeneração e no reparo vascular (ZHANG *et al.*, 2013). Sabe-se que esta interleucina também possui um importante papel de estimulação e inibição de células primárias em cultura e de células intersticiais e parenquimais em órgãos como o coração. Ela é capaz de induzir a hipertrofia de miócitos cardíacos ao passo que exerce um efeito anti-proliferativo em fibroblastos cardíacos (PALMER *et al.*, 1995).

Outra citocina pró-inflamatória, a IL-17A foi detectada em ambos os MCs (FIGURA 4.9). Esta citocina pró-inflamatória é conhecida como sendo de extrema importância na auto-renovação de células cancerígenas semelhantes a células-tronco, sendo encontrada em nichos de inflamação, como por exemplo, o microambiente tumoral (XIANG *et al.*, 2015).

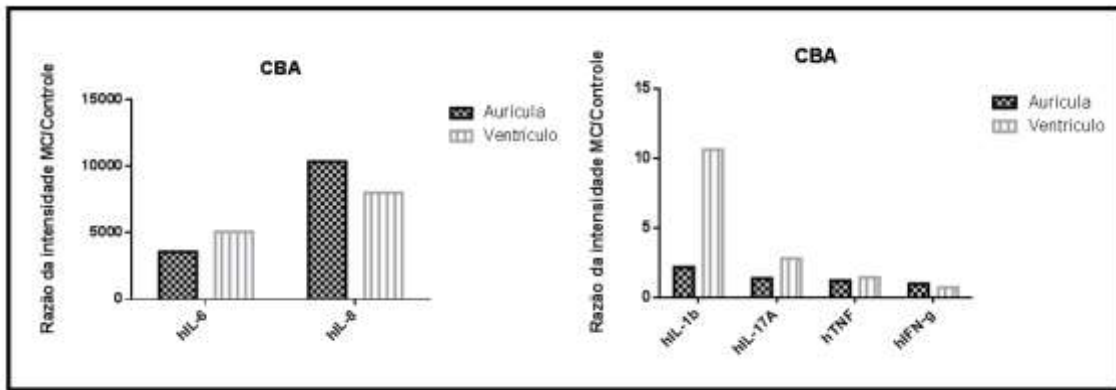


FIGURA 4.9: Perfil de citocinas detectadas por CBA em amostras de meio condicionado coletados de células cardíacas de aurícula e de ventrículo. Os valores estão expressos em proporção da expressão das citocinas encontradas no meio em relação ao meio controle. Legenda: hIL-6 – Interleucina 6; hIL-8: Interleucina 8; hIL-1b: Interleucina 1b; hIL-17a: Interleucina 17a; hTNF: fator de necrose tumoral, do inglês “Tumor necrosis factor”; hIFN-g: Interferon gama.

FONTE: A autora, 2013.

As citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN-g e as interleucinas IL-6 e IL-8 foram também encontradas em ambos os MCs (FIGURA 4.9). Sabe-se que diferentes citocinas possuem diferentes papéis, podendo ativar respostas de proliferação, migração, morte ou até mesmo diferenciação de células-tronco. Elas também são de fundamental importância na regeneração cardíaca; sabe-se que cardiomiócitos que sofreram injúria liberam moléculas de padrão molecular associados a danos, levando a sinalização à cardiomiócitos circundantes para que estes produzam mediadores inflamatórios, como IL-1b, IL-6, MCP-1 e TNF- α , os quais são capazes de ativar redes de sinalização entre os cardiomiócitos sobreviventes, bem como recrutar e ativar leucócitos (GHIGO *et al.*, 2014).

Portanto, através desta técnica empregada, observamos que ambos os cultivos de células de aurícula e ventrículo são responsáveis pela secreção das mesmas citocinas (IL-6, IL-8, IL-1b, IL-17a, TNF e IFN-g), muito embora as concentrações detectadas sejam diferentes entre os MCs, sugerindo diferenças no comportamento secretório entre ambos os cultivos de aurícula e ventrículo.

Após a detecção de algumas citocinas, com o intuito de analisar um maior número de proteínas, optamos por caracterizar os MCs através de um arranjo de anticorpos customizado conforme descrito na seção Materiais e Métodos. A intensidade de marcação dos diferentes pontos de ligação dos anticorpos pode ser visualizada na figura 4.10.

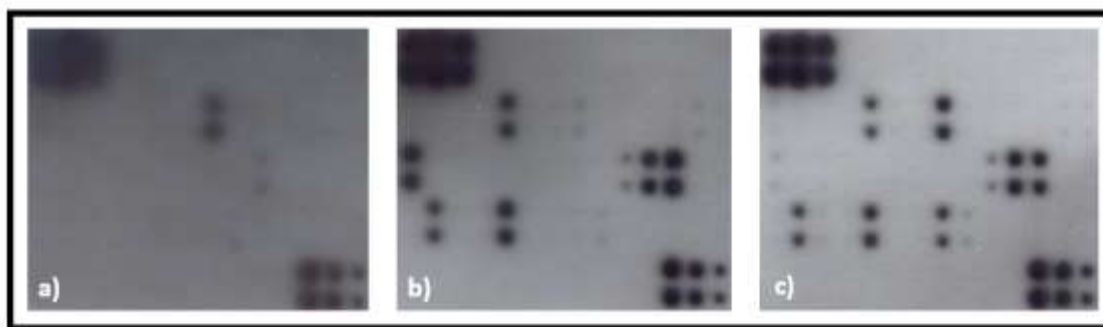


FIGURA 4.10: Detecção de proteínas por arranjo de anticorpos. Representação das membranas de anticorpos. Legenda: a) Controle do MC; b) Meio condicionado de células de aurícula (MCA); c) Meio condicionado de células de ventrículo (MCv). FONTE: A autora, 2013.

As membranas são compostas por 60 anticorpos. Destes, 8 identificaram proteínas no MCA e 7 identificaram proteínas no MCv. As proteínas encontradas em ambos os MCs estão representadas em forma de gráficos (FIGURA 4.11).

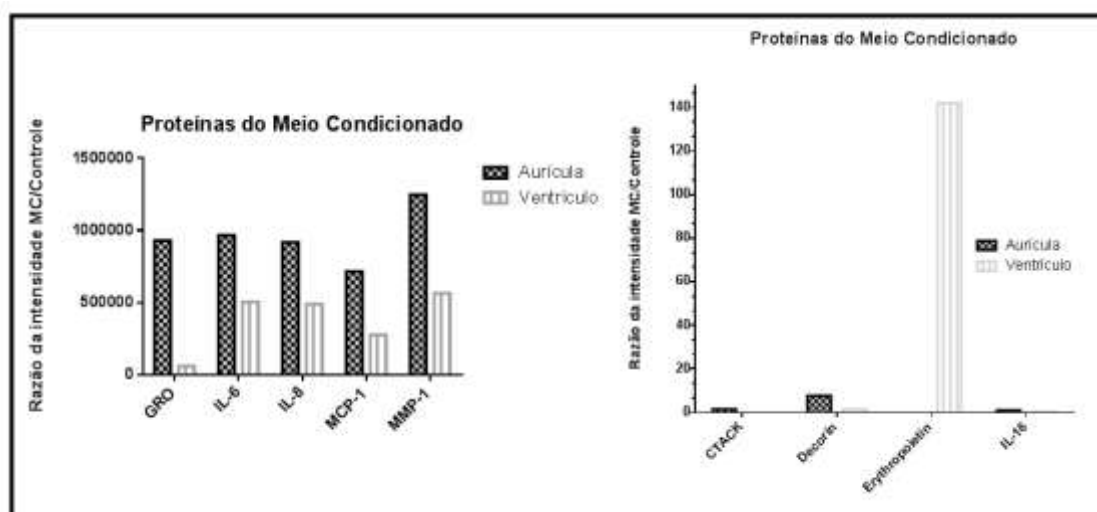


FIGURA 4.11: Proteínas detectadas por arranjo de anticorpos em amostras de meio condicionado coletados de células cardíacas de aurícula e de ventrículo. Os valores estão expressos em proporção da expressão das citocinas encontradas no meio em relação ao meio controle. Legenda: GRO – proteína regulatória de oncogene, do inglês “Growth-regulated oncogen”; IL-6 – interleucina 6; IL-8 – interleucina 8; MCP-1 - proteína quimioatratante de monócitos 1, do inglês “Human monocyte chemoattractant protein-1”; MMP-1 – metaloproteinase 1; CTACK – quimiocina atrativa de células T cutâneas, do inglês “Cutaneous T-Cell Attracting Chemokine”; IL-16 – Interleucina 16. FONTE: A autora, 2013.

Embora algumas proteínas tenham sido detectadas em ambos os MCs, a intensidade da detecção foi distinta para o MCA e MCv. As proteínas IL-6, IL-8, GRO, MCP-1, MMP-1 e decorina foram encontradas em uma concentração maior no MCA do que no MCv. Já as proteínas CTACK e IL-16 foram encontradas apenas no MCA, enquanto a proteína eritropoietina foi encontrada apenas no MCv. Estas

mesmas proteínas já foram detectadas em outro trabalho de nosso grupo, o qual procurou caracterizar o MC a partir de explantes cardíacos. Com exceção da IL-16, todas as outras proteínas também foram encontradas neste trabalho (ROBERT, 2014).

Cada uma destas proteínas detectadas possui uma função no que se refere a processos inflamatórios e a maioria delas possui relação com funções de reparo cardíaco. As proteínas IL-6 e IL-8 já haviam sido detectadas através de citometria de fluxo e, como descrito anteriormente, estão relacionadas com regeneração cardíaca. Já foi demonstrado que as proteínas IL-8 e GRO sofrem aumento significativo após a isquemia aguda do miocárdio, provendo um ambiente quimioatrativo para progenitores endoteliais, os quais induzem a neovascularização do miocárdio, protegem os cardiomiócitos de entrarem em apoptose e influenciam positivamente na resolução do reparo tecidual (KOCHER *et al.*, 2006).

A proteína MCP-1, detectada em ambos os MCs, consiste em um quimioatraente potente de células mononucleares com propriedades angiogênicas e pró-fibróticas, sendo presente em uma variedade de condições patológicas associadas com inflamação e infiltração de células mononucleares (FRANGOIANNIS *et al.*, 2008). A expressão desta proteína leva a proliferação de células de músculo liso e síntese de metaloproteinases. Sua repressão é crucial para que o processo de cicatrização seja eficiente, já que os processos inflamatórios induzidos por ela resultam em remodelamento adverso do ventrículo infartado (FRANGOIANNIS, 2007). Além da MCP-1, a metaloproteinase 1, também detectada em ambos os MCs, é secretada por fibroblastos cardíacos estimulados pela IL-17 (vista em nossos resultados de citometria de fluxo) e tem como função degradar colágeno e mediar o remodelamento do tecido (CORTEZ *et al.*, 2007).

Outra proteína encontrada em ambos os MCs foi o proteoglicano decorina, o qual possui atividade anti-fibrótica e está envolvido no remodelamento reverso do miocárdio, pois inibe a via do TGF- β envolvida em eventos pró-fibróticos no coração humano (JAHANYAR *et al.*, 2006; ENGBRETSEN *et al.*, 2013).

Dentre as proteínas encontradas exclusivamente em um dos MCs, CTAK e IL-16 estavam presentes apenas no MCa. A CTACK ou CCL27 consiste em uma quimiocina envolvida na resposta inflamatória, possui atividade quimiotática para CTMs derivadas de medula óssea e leva a migração de fibroblastos. Esta proteína está envolvida no aumento da secreção de fatores inflamatórios e angiogênicos por CTMs derivadas de tecido adiposo (VAN DEN BROEK *et al.*, 2014). Já a IL-16 é

descrita como uma proteína que medeia a inflamação cardíaca, promovendo a fibrose e aumentando a rigidez do miocárdio (TAMAKI *et al.*, 2013). Por outro lado, a proteína eritropoietina foi encontrada apenas no MCv. Muito embora o principal efeito desta proteína seja o estímulo da hematopoiese, hoje se sabe que ela está relacionada com a redução da área do infarto, pois possui atividade pró-angiogênica em células endoteliais (VAN DER MEER *et al.*, 2004). Sabe-se ainda que a eritropoietina leva a proteção contra a injúria causada pela isquemia/reperfusão em diferentes tecidos, pois é associada com a inibição da apoptose (LIPSIC *et al.*, 2004).

Portanto, embora os diferentes MCs sejam muito parecidos entre si, os dois possuem algumas peculiaridades, tanto em relação a concentração das proteínas encontradas, quanto a presença de proteínas exclusivas em cada um deles. É possível que esta diferença no secretoma das células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo esteja relacionada às diferenças nestas populações celulares, como descrito no item 4.1 desta seção.

As duas populações celulares mais abundantes presentes nos cultivos de células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo foram as CTMs e os fibroblastos cardíacos. Alguns estudos já mostraram que as CTMs têm como papel principal a regulação do sistema imune através da sua atividade parácrina (BAGLIO *et al.*, 2012). O secretoma destas células já foi caracterizado por PEREIRA e colaboradores (2014) e é composto pelos mais importantes fatores de proliferação, quimiotaxia e imunomodulação, como TGF- β , G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6, IL-8. Nesse trabalho, observou-se que as CTMs de cordão umbilical foram responsáveis pela secreção de citocinas imunomodulatórias/imunossupressoras, como IL-17a e quimiocinas como GRO, MCP-1 e IL-8, semelhante ao que observamos em nosso trabalho (PEREIRA *et al.*, 2014). A segunda população mais abundante encontrada em ambos os cultivos foi a de fibroblastos cardíacos. Sabe-se que estas células são responsáveis pela secreção de IL-6 e TNF. Estas mesmas células podem se diferenciar em miofibroblastos, os quais estão relacionados com a secreção de citocinas responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias (SOUDERS *et al.*, 2009). Portanto, o fato de observarmos tantas moléculas relacionadas a respostas imunes e de regeneração, está possivelmente associado com as populações celulares encontradas nos cultivos. Acreditamos que estas células migrem dos explantes por estarem ativadas devido aos procedimentos metodológicos da técnica de cultivo de explantes, a qual se assemelha a uma lesão tecidual. De fato

poderíamos correlacionar os cultivos de explantes aos eventos de fase 3 do infarto cardíaco, durante o qual os fibroblastos secretam citocinas, quimionas, fatores de crescimento e proteínas de MEC, com o objetivo de ativar células endoteliais e promover a fibrose, levando ao recrutamento de células-tronco e células progenitoras para a regeneração da lesão causada (SILVESTRE *et al.*, 2013). Uma das hipóteses é que essas células mantenham *in vitro* a memória de seu papel *in vivo* durante a lesão tecidual, hipótese reforçada pelo perfil do secretoma identificado. Desta forma, o meio condicionado de células cardíacas humanas apresenta um perfil de proteínas compatível com o tecido de origem e com processos biológicos presentes neste tecido durante o remodelamento cardíaco.

Por fim, com o objetivo de obter uma avaliação mais global das proteínas presentes nos MCs, independentemente de serem citocinas ou proteínas metabólicas, realizamos a análise do conteúdo proteico das amostras de MCa e MCv através de espectrometria de massas. Ao total, foram identificadas 74 proteínas nos MCs, as quais não foram detectadas no meio não condicionado (Controle MC). Somente as proteínas com pelo menos dois peptídeos únicos foram consideradas (maior confiabilidade). Destas, 72 proteínas foram encontradas no MCa e 67 encontradas no MCv (TABELA 4.3). A maioria das proteínas foram comuns a ambos os MCs, porém, algumas foram exclusivamente encontradas em um ou outro MC. Com o auxílio da ferramenta GOrilla (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>), buscamos traçar alguns processos biológicos nos quais estas proteínas estejam envolvidas (FIGURAS 4.12 e 4.13), com o objetivo de entender melhor o papel destas proteínas em conjunto e as peculiaridades de cada MC.

Proteína	Aurícula	Ventrículo
TIMP1	X	X
DCN	X	X
SERPINE2	X	X
IL6	X	X
ECM1	X	X
COL1A2	X	X
DCAF5	X	X
COL3A1	X	X
LAMA4	X	X
COL1A1	X	X
COL1A1	X	X
HEL-S-7	X	X
VASN	X	X
IGFBP7	X	X
TNC	X	X

LIF	X	X
PCOLCE	X	X
PLTP	X	X
SPARC	X	X
LGALS3BP	X	X
SERPINF1	X	X
VIM	X	X
HEL-S-270	X	X
FN1	X	X
MMP2	X	X
SERPING1	X	X
BGN	X	X
TALDO1	X	X
PXDN	X	X
TRA1	X	X
CLEC11A	X	X
COL6A3	X	X
LAMC1	X	X
FSTL1	X	X
EFEMP1	X	X
HSPG2	X	X
FBN1	X	X
FLNA	X	X
LAMB1	X	X
ANXA1	X	X
NUCB1	X	X
PLOD2	X	X
P4HB	X	X
ENO1	X	X
TGFBI	X	X
KPNB1	X	X
ACTN1	X	X
PLS3	X	X
MYH13	X	X
COL6A2	X	X
PRDX1	X	X
SERPINE1	X	X
HEL107	X	X
GML	X	X
PTX3	X	X
PSAP	X	X
COL6A1	X	X
THBS1	X	X
POSTN	X	X
MMP1	X	X
PRDX6	X	X
hCG_1811539	X	X
MMP3	X	X
STC2	X	
COL5A2	X	

LUM	X		
TNFAIP6	X		
COL12A1		X	
CCT6A		X	
CCDC88A		X	
SERPINH1			X
POGZ			X

TABELA 4.3: Proteínas identificadas por espectrometria de massas em MC por células derivada de explantes de aurícula (coluna 1) e ventrículo (coluna 2).

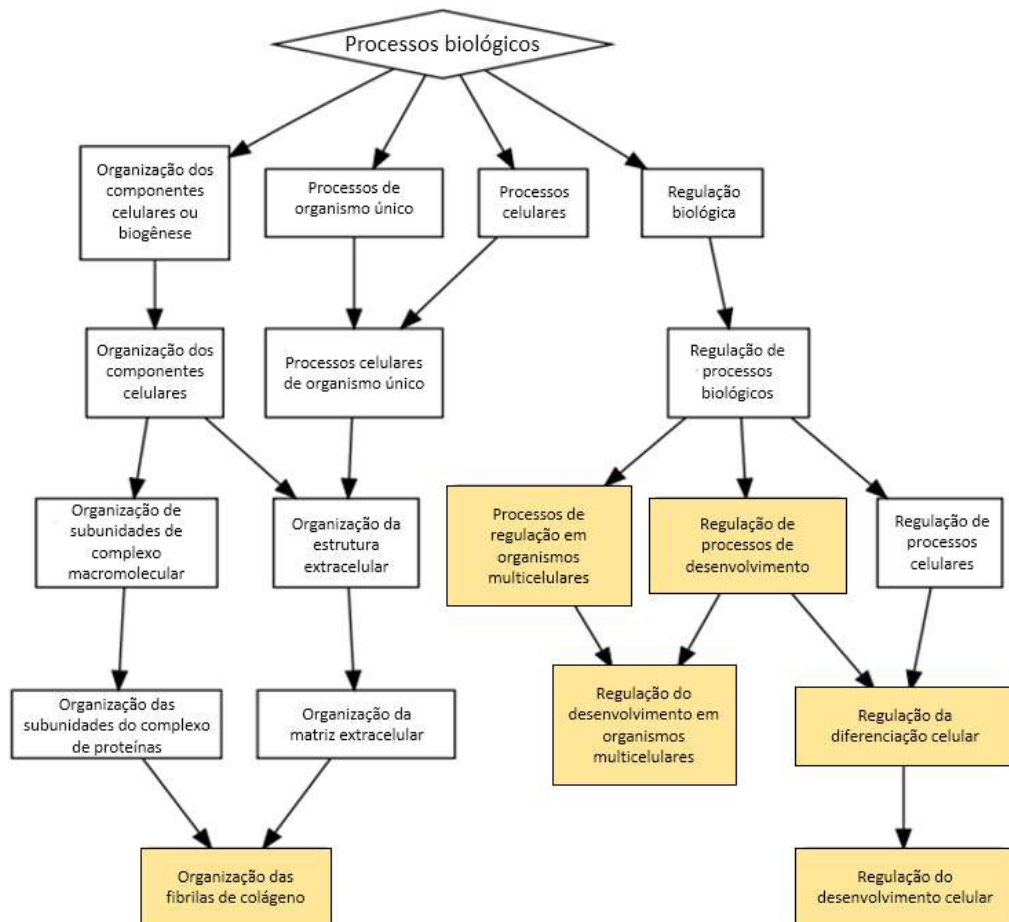


FIGURA 4.12: Processos relacionados com as proteínas encontradas no MC por células derivadas de explantes de aurícula. Os quadros em branco representam processos com um valor de $p > 10^{-3}$. Os quadros em laranja representam processos com um valor de p de 10^{-3} a 10^{-5} . Análise realizada por meio da ferramenta GOrilla. FONTE: A autora, 2014.

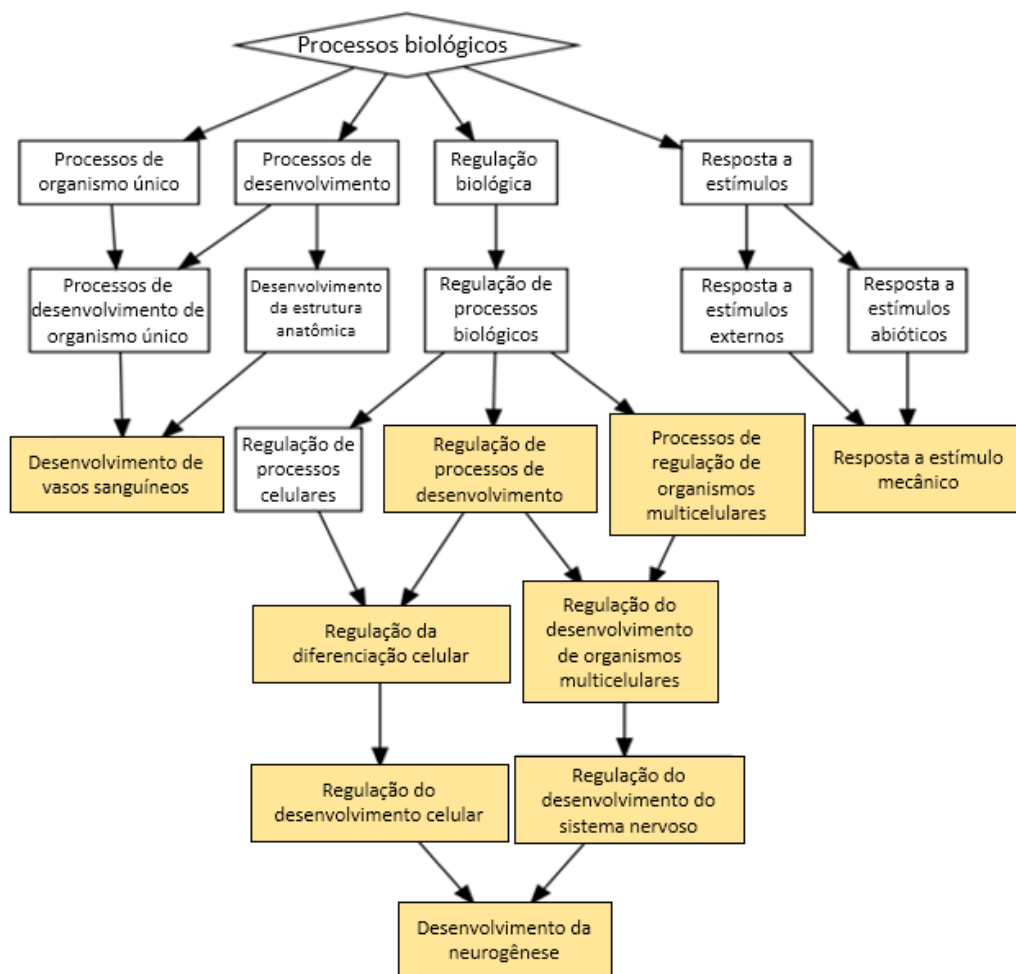


FIGURA 4.13: Processos relacionados com as proteínas encontradas no MC por células derivadas de explantes de ventrículo. Os quadros em branco representam processos com um valor de $p > 10^{-3}$. Os quadros em laranja representam processos com um valor de p de 10^{-3} a 10^{-5} . Análise realizada por meio da ferramenta GOrilla. FONTE: A autora, 2014.

As análises de ontologia gênica demonstraram que as proteínas presentes no MCa estão relacionadas a processos de regulação. Estes processos apontam que o MCa é uma fonte de fatores solúveis que pode levar a respostas celulares de diferenciação e desenvolvimento celular, já que muitas das proteínas encontradas estão relacionadas a estes processos (COL1A1, CCDC88A, SERPINE2, COL3A1, FN1, VASN, VIM, SERFINF1, COL5A2, LIF e IL-6). Ao analisarmos as proteínas encontradas em MCa por meio da ferramenta *g profiler* (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>), observamos ainda outros processos nos quais estas proteínas estão relacionadas ($p < 10^{-3}$), como a organização da matriz extracelular, secreção de exossomos, adesão focal e celular, resposta a ferimentos, desenvolvimento do sistema

circulatório e cardiovascular, migração celular, dentre outros. Estes processos estão envolvidos, direta ou indiretamente, com o reparo e regeneração cardíaca.

Já as proteínas identificadas no MCv estão relacionadas a processos de regulação, assim como desenvolvimento de vasos sanguíneos, resposta a estímulos mecânicos e desenvolvimento da neurogênese. Da mesma forma que realizamos com o MCa, analisamos o MCv utilizando a ferramenta *g profiler*. Através desta análise, observamos que as proteínas encontradas no MCv relacionam-se a processos como organização da matriz extracelular, secreção de exossomos, cicatrização de feridas, coagulação, desenvolvimento do sistema circulatório e cardiovascular, migração celular, excitose, regulação da proliferação celular, angiogênese, regulação da adesão celular, dentre outros.

Através das três metodologias empregadas, foi possível identificar em ambos os MCs, diversas proteínas relacionadas a processos interessantes do ponto de vista da regeneração cardíaca. Várias proteínas de MEC e relacionadas com a síntese/degradação de MEC como decorina, laminina, tenascina, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL6A2, COL6A2, COL6A1, MMP1, MMP2 (colagenase IV), MMP3, TIMP1, ECM1 foram encontrados em ambos os MCs e mais algumas encontradas exclusivamente no MC de células de aurícula (COL5A2, lumican) e ventrículo (COL12A1) (FIGURAS 4.14 e 4.15), indicando que essas células participam ativamente na secreção e regulação da MEC, as quais desempenham um papel muito importante no remodelamento cardíaco. Interessantemente, através das três técnicas empregadas, detectamos a presença de IL-6 em ambos os MCs (FIGURAS 4.14 e 4.15). Como citado anteriormente, esta citocina pró-inflamatória está intimamente envolvida no processo de diferenciação e desenvolvimento celular, sendo de fundamental importância no processo de desenvolvimento cardíaco (CHRISTALLA *et al.*, 2011). Outra proteína encontrada em ambos os MCs foi a vasorina. Esta consiste em uma proteína de membrana predominantemente expressa em células vasculares de músculo liso. Esta proteína é responsável pela modulação de respostas celulares a estímulos patológicos nas paredes dos vasos, representando um alvo terapêutico potencial para desordens vasculares fibroproliferativas (IKEDA *et al.*, 2004). É sabido que após a oclusão vascular e a morte celular causada pelo processo de infarto, alguns eventos ocorrem com o objetivo de recuperar o tecido lesionado. Na fase 2 pós-infarto, eventos como fagocitose e degradação da matriz extracelular ocorrem. Dentro deste contexto, há a secreção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, elementos de matriz

extracelular, ao mesmo tempo que ocorre a migração celular e a geração de fragmentos de matriz, os quais, em conjunto, levam a respostas de inflamação, regeneração e remodelamento. Na fase 3, ocorre a síntese de matriz extracelular e eventos de vasculogênese, angiogênese, arteriogênese e crescimento lateral, ao passo que ocorre a hipertrofia e renovação dos miócitos na tentativa de regenerar o tecido que sofreu injúria (SILVESTRE *et al.*, 2013). Os processos que ocorrem nestas duas últimas fases estão relacionados às proteínas encontradas nos MCs, tornando-os bastante interessantes do ponto de vista da regeneração e restabelecimento do tecido cardíaco.

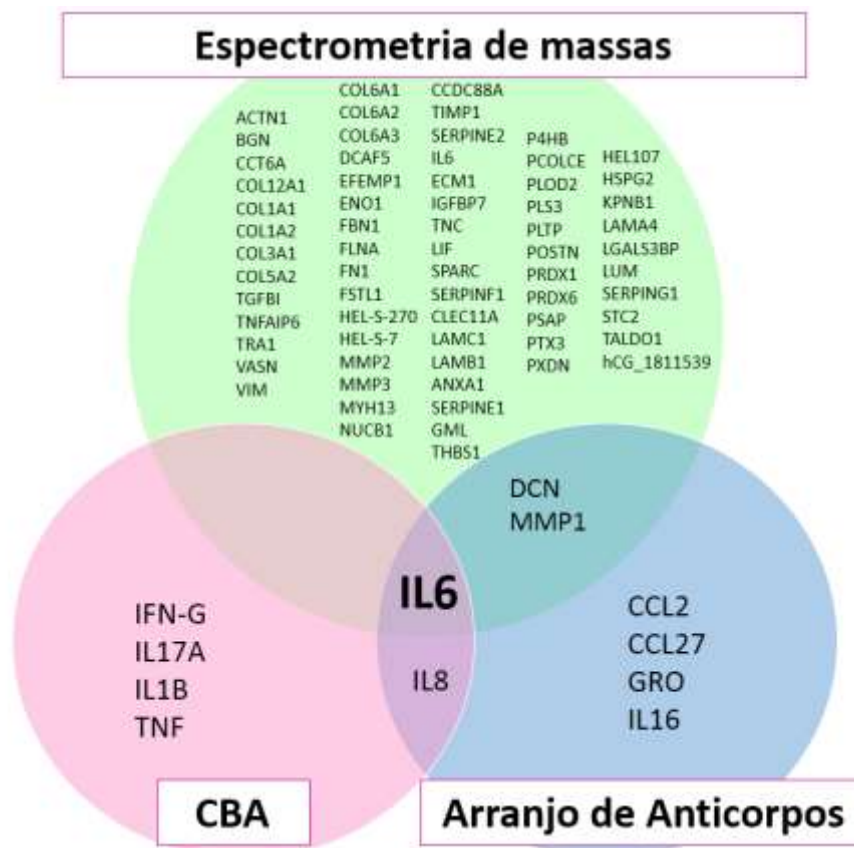


FIGURA 4.14: Representação das proteínas detectadas no MC por células derivadas de explantes de aurícula através de espectrometria de massas (verde), CBA (rosa) e arranjo de anticorpos (azul).

Fonte: A autora, 2015.

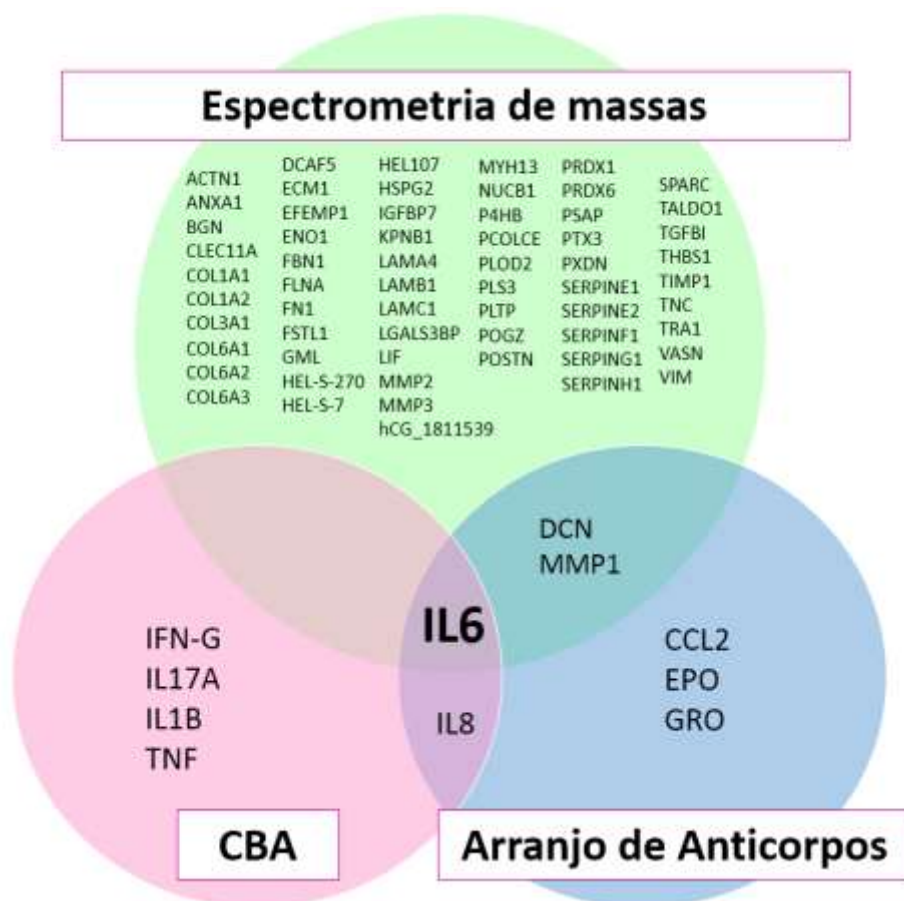


FIGURA 4.15: Representação das proteínas detectadas no MC por células derivadas de explantes de ventrículo através de espectrometria de massas (verde), CBA (rosa) e arranjo de anticorpos (azul).

Fonte: A autora, 2015.

Como mencionado anteriormente, acreditamos que as duas populações mais abundantes nos cultivos (células-tronco mesenquimais e fibroblastos) sejam as principais responsáveis pela secreção das proteínas identificadas nos MCs. O secretoma de fibroblastos cardíacos já foi explorado em outros trabalhos, como no de Abonnec e colaboradores (2013), onde realizou-se a análise proteômica de fibroblastos cardíacos murinos. Dentre várias proteínas identificadas no secretoma, proteínas como ECM1, FBN1, FSTL1 (fibrilina-1), LAMA4 (laminina), LAMB1, LAMC1, LIF, LUM (lumican), MMP2, MMP3, PLTP, POSTN, PTX3, PXDN e TIMP1 foram encontradas, semelhantemente ao que encontramos em nossos resultados. Muito embora a abordagem de Abonnec seja em relação a fibroblastos cardíacos murinos, podemos sugerir que estas proteínas, em comum nos dois trabalhos, sejam secretadas pela população de fibroblastos cardíacos encontradas em ambos os cultivos de células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo. Em outro trabalho, realizado por Castaldo e colaboradores (2013), foi observado que culturas de fibroblastos cardíacos descelularizadas apresentavam a deposição de proteínas

como fibronectina, colágeno, laminina e tenascina (CASTALDO *et al.*, 2013), assim como foi detectado nos MCs. Sabe-se que a população de fibroblastos cardíacos é a grande responsável pela secreção de proteínas de MEC, portanto, a detecção destas proteínas nos MCs é compatível com o fato de grande parte das populações celulares serem compostas por fibroblastos cardíacos. A população de CTMs perfaz uma grande parte das células encontradas em ambos os cultivos de células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo; sabe-se que estas células secretam diversas moléculas responsáveis pela supressão das respostas imunes e inflamatórias, estimulando processos de reparo do tecido normal. Vários trabalhos já buscaram caracterizar o secretoma das CTMs; sabe-se que CTMs de medula óssea são responsáveis pela secreção de diversas proteínas, dentre as quais se incluem TFG- β , TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1, PTX3, POSTN (periostina), IL-8, fibronectina, além exossomos (revisado por LAVOIE *et al.*, 2013), semelhantemente ao que observamos em nossos resultados.

Em suma, nossos resultados sugerem que ambos os MCs consistem em um conjunto de proteínas de interesse bastante relevante, pois as proteínas neles contidas podem desempenhar diversas respostas relacionadas ao remodelamento e regeneração cardíaca, além de outros processos biológicos importantes e relacionados ao reparo tecidual.

ENSAIOS FUNCIONAIS

Uma vez caracterizadas as amostras de MECs e de MCs, a principal questão a ser respondida era se essas amostras teriam efeito biológico promissor para uso em terapias do sistema cardiovascular. Primeiramente foram realizados ensaios a fim de avaliar se essas amostras não eram citotóxicas, principalmente as amostras de MECs, uma vez que sua obtenção utilizou reagentes como detergentes e que poderiam permanecer na forma de resíduos e interferir com a viabilidade celular. Posteriormente foram realizados ensaios funcionais visando avaliar a proliferação, adesão, migração e a diferenciação celular.

Nos ensaios funcionais foram escolhidas as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (aCTMs) devido a sua multipotencialidade, inclusive de diferenciação em células semelhantes a cardiomiócitos (PLANAT-BÉNARD *et al.*, 2004; VAN DIJK *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2010; OKURA *et al.*, 2010;). Além disso, estas células possuem a vantagem de serem facilmente obtidas de material de

descarte, como o lipoaspirado, e assim mais disponíveis do que as células-tronco derivadas de medula óssea (BAER, 2014).

Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições. Os cultivos de aCTMs foram realizados sobre colágeno tipo I, pelo fato de os cultivos de células derivadas de explantes de aurícula e ventrículo necessitarem deste *coating* para o cultivo. Portanto, já que as MECs derivadas destes cultivos foram utilizadas, optamos por utilizar o colágeno I em todas as condições, assegurando que as respostas biológicas observadas fossem derivadas das MECs de fato, e não do colágeno I. Em relação ao MC, a coleta deste foi realizada na ausência de soro bovino fetal (SBF). Para todos os cultivos, o meio de cultivo utilizado foi DMEM acrescido de 10% de SBF. Como nas condições que envolviam MC (MC, MEC e MC e controle do MC), foi utilizado 50% de DMEM 10% SBF e 50% MC (sem SBF), a concentração final de SBF nestas condições caiu para 5% (inclusive no controle do MC, já que o meio não condicionado também não possuía SBF).

4.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR RELATIVA - MEC e MCs não são citotóxicos

Com o objetivo de avaliar se as MECs e/ou os MCs poderiam alterar a viabilidade celular relativa dos cultivos de aCTMs, sendo conseqüentemente citotóxicos, o ensaio de captação do Vermelho Neutro foi realizado decorridos 3 dias (72 horas) de cultivo (ICCVAM, 2006). O intuito deste ensaio é avaliar a viabilidade celular relativa por meio da incorporação do corante pelos lisossomos. Desta forma, é possível avaliar se um determinado tratamento interfere com a viabilidade celular, em comparação com controle sem tratamento e que corresponde a 100% da viabilidade celular. Este ensaio mensura a dinâmica da população celular, servindo como indicador de citotoxicidade, muito embora outros ensaios devam ser realizados a fim de confirmar se há indução de morte ou proliferação celular.

Nossos resultados demonstram que a viabilidade celular relativa das aCTMs não foi alterada após 3 dias de cultivo nestas condições, com exceção das células cultivadas sobre a MEC derivada de células de ventrículo, as quais apresentaram viabilidade celular significativamente aumentada em relação ao controle ($p < 0,0001$), como podemos observar na figura 4.16.

Viabilidade celular relativa - Vermelho Neutro

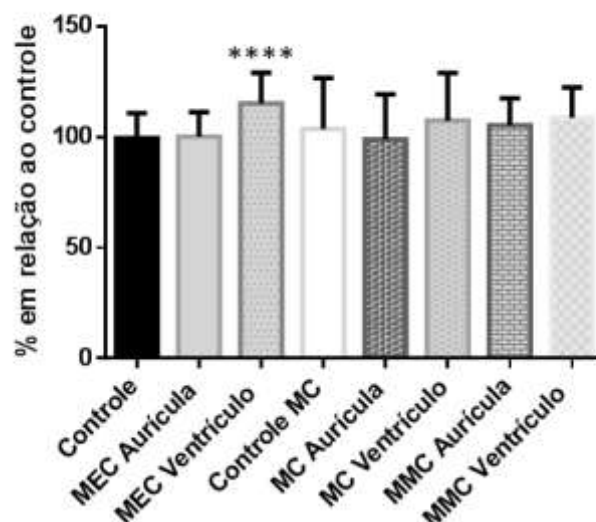


FIGURA 4.16: Viabilidade celular relativa (% viabilidade em relação ao controle) de aCTMs quando cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo) após 3 dias de cultivo. (n=3) ****: $p > 0,0001$.

FONTE: A autora, 2014.

Pelo fato do processo de descclularização envolver o uso de detergentes e outras substâncias químicas e o MC não possuir SBF, este ensaio era de suma importância para assegurar que os ensaios funcionais de adesão, proliferação, migração e diferenciação pudessem ser realizados. Sendo assim, não havendo diminuição da viabilidade celular relativa com os diferentes tratamentos, podemos inferir que a MEC de ambas as células e seus respectivos MCs não foram tóxicos para os cultivos de aCTMs. Como este ensaio mensura a dinâmica da população, outros ensaios para confirmação de morte foram realizados, como será descrito no próximo item desta seção. Desta forma, confirmamos que as MECs e os MCs não são tóxicos e estes poderiam ser utilizados para os demais ensaios funcionais.

Em relação as aCTMs cultivadas sobre MEC de células derivadas de ventrículo, nas quais observamos haver uma viabilidade celular aumentada em relação ao controle, concluímos que possivelmente a MEC isoladamente tenha levado a este aumento, pois não observamos este mesmo fenômeno nos cultivos de aCTMs sobre MEC associada ao MC de células derivadas de ventrículo. A MEC possui um papel fundamental na regulação das funções celulares, fornecendo um microambiente físico para a sobrevivência das células, proporcionando um substrato

para ancoragem das células e servindo como suporte para os tecidos. Além disso, a MEC transmite sinais às células, afetando diversos aspectos inerentes a vida da célula, como proliferação, diferenciação e morte (HUANG e INGBER,1999; KATZ *et al.*, 2000).

Este fenômeno de aceleração da proliferação e aumento da viabilidade já foi observado em outros trabalhos (CHEN *et al.*, 2007; EITAN *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012), indicando o papel da matriz como um suporte bioativo, controlando a forma e a geometria da célula e auxiliando na transdução de vários sinais via interações específicas ligante-receptor (ENGLER *et al.*, 2006; GUILAK *et al.*, 2009). Eitan e colaboradores (2010) observaram que a MEC cardíaca de porcos foi capaz de prolongar a viabilidade de fibroblastos cardíacos, cardiomiócitos e CTMs após 3 semanas de cultivo, reforçando o uso potencial de MEC cardíaca como um biomaterial para regeneração cardíaca (EITAN *et al.*, 2010). Chen e colaboradores (2007) constataram que a MEC de CTMs de medula óssea possibilitou uma maior replicação de unidades formadoras de colônia de CTMs quando comparadas com o controle, sugerindo um papel da MEC como parte do nicho que regula o balanço entre replicação e diferenciação em resposta aos sinais apropriados (CHEN *et al.*, 2007). Mais recentemente, Lin e colaboradores (2012) observaram que a MEC obtida de cultivos de CTMs de medula óssea foi capaz de acelerar a taxa de proliferação de CTMs em até 4 vezes mais que nos controles (LIN *et al.*, 2012).

Portanto, podemos concluir que a MEC de células derivadas de ventrículo levou a um aumento da viabilidade celular relativa das aCTMs, nos dando indícios de que essa MEC possa ativar a proliferação das CTMs.

4.6 ANÁLISE DA MORTE CELULAR - MECs e MCs não levam a morte celular por necrose ou apoptose

Adicionalmente ao ensaio da viabilidade celular (conforme descrito anteriormente no item 4.5), com o objetivo de assegurar que as MECs e/ou MCs não estariam induzindo a morte dos cultivos de aCTMs por necrose ou apoptose, realizamos o ensaio de marcação dupla de Anexina-V e 7-AAD (7-aminoactinomicina D) após 7 dias de cultivo. Observamos que a marcação tanto para anexina, quanto para 7-AAD foi baixa (valores menores que 4%) e que não houve diferença significativa entre as diferentes condições de cultivo testadas (FIGURA 4.17), corroborando a hipótese de que as MECs e os MCs não são citotóxicos. Neste caso, o sétimo dia foi escolhido

pelo fato das culturas se encontrarem com 100% de confluência neste dia e pelo fato dos marcadores de diferenciação celular serem avaliados decorrido o mesmo período de tempo.

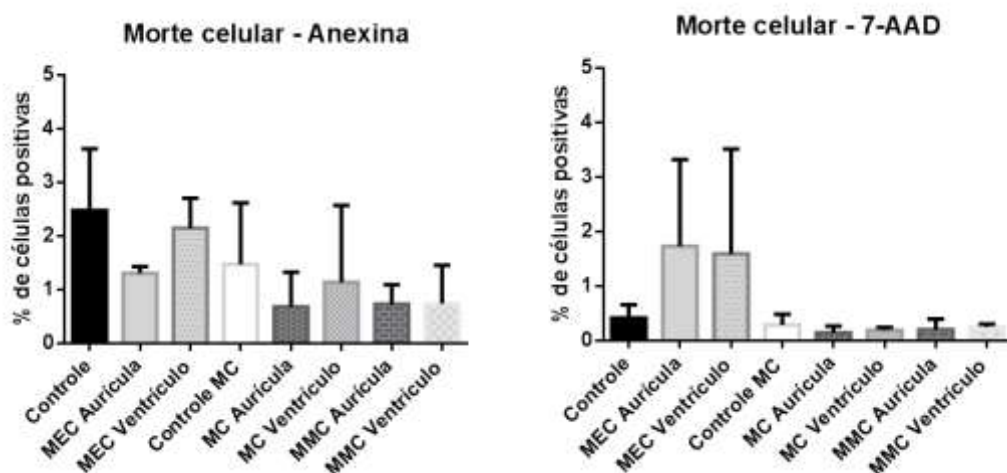


FIGURA 4.17: Avaliação da morte celular pela marcação com Anexina-V e 7-AAD de aCTMs cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo) após 7 dias de cultivo. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

Como não houve morte celular em nenhum dos tratamentos, concluímos que os demais ensaios biológicos (adesão, proliferação, migração e diferenciação) poderiam ser realizados. French e colaboradores (2012) já observaram que a MEC cardíaca não levou a morte de células progenitoras cardíacas por necrose ou apoptose, assim como foi ainda capaz de aumentar a resistência destas células a apoptose após a depleção de soro. Nakanishi e colaboradores (2008) também observaram que o MC de CTMs foi capaz de inibir a apoptose de células progenitoras cardíacas submetidas a hipóxia e depleção de soro. Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo (ROBERT, 2014), observou-se que a MEC e o MC de tecido cardíaco humano também não levaram a morte de CTMs derivadas de medula óssea. Pelo contrário, em um trabalho realizado por Horn e colaboradores (2009) observou-se que o MC secretado por CTMs levou a morte celular de culturas organotípicas de hipocampo. Neste trabalho, o simples fato de ferver o MC (processo que degrada grande parte das proteínas) foi capaz de diminuir a toxicidade das amostras. Portanto, assegurar que os tratamentos não são tóxicos para as aCTMs foi de fundamental importância para dar continuidade aos ensaios

funcionais de adesão, proliferação, migração e diferenciação, avaliando-se a influência das MECs e MCs no comportamento das aCTMs.

4.7 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR – MEC de aurícula promove menor proliferação celular

Com o objetivo de determinar se as MECs e/ou os MCs poderiam influenciar a proliferação das aCTMs em cultivo, realizamos o ensaio de incorporação de um análogo da timidina (EdU) por 24 horas. Observamos primeiramente que, para todas as condições avaliadas, uma alta taxa de proliferação celular, na faixa de 80%. Observamos ainda que não houve diferença significativa na taxa de proliferação das aCTMs quando comparadas a condição controle, com exceção das células cultivadas sobre MEC de células derivadas de aurícula (Matriz Aurícula), nas quais observou-se que a proliferação foi significativamente menor ($p < 0,05$), cerca de 60% (FIGURA 4.18).

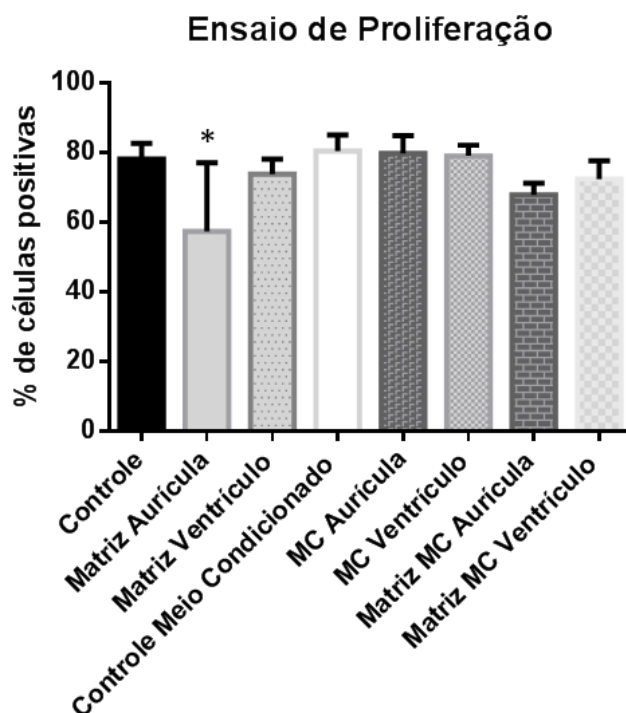


FIGURA 4.18: Avaliação da proliferação celular de aCTMs cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação ao percentual de células EdU positivas após 24 horas de cultivo. (n=3) *: $p > 0,05$.

FONTE: A autora, 2014.

De forma semelhante, em um trabalho anterior realizado em nosso grupo, não foi observada diferença significativa na proliferação de CTMs de medula óssea cultivadas sobre a matriz extracelular e meio condicionado derivados de tecido cardíaco em relação ao controle após 24, 48, 72 e 96 horas (ROBERT, 2014). Entretanto, French e colaboradores (2012) observaram que a MEC cardíaca de ventrículo de porcos foi capaz de aumentar em 35% a proliferação de células progenitoras cardíacas em comparação com o controle (colágeno I). Os resultados observados nestes diferentes estudos podem estar relacionados com as diferentes condições dos cultivos realizados em cada um deles. Além disso, o efeito positivo na proliferação, observado por French e colaboradores (2012), foi visto em células progenitoras cardíacas e não em células mesenquimais. Portanto, a comparação direta dos resultados de proliferação celular entre os diferentes estudos não é possível de ser feita. Em nossos resultados, observamos uma alta taxa de proliferação da população celular, de cerca de 80% até mesmo na condição controle. Desta forma, não observamos aumento da taxa de proliferação das aCTMs cultivadas sobre as MECs e os MCs, mas verificamos diminuição na proliferação das aCTMs quando estas foram cultivadas sobre MEC de células derivadas de aurícula. A alta taxa de proliferação observada neste trabalho pode ser relacionada ao fato de que os experimentos foram realizados na presença de SBF (5-10%) e que, por isso, as células foram capazes de proliferar em taxa elevada. Desta forma, uma das hipóteses geradas é que a presença do SBF possa ter “mascarado” possíveis efeitos das MECs e MCs e que, sendo assim, não pudemos detectar diferenças mais sutis entre os grupos. Outro fator que pode ter colaborado para isso, é que os experimentos foram iniciados após 24hs do plaqueamento das células, monitorando a proliferação celular nas 24hs subsequentes. Outros protocolos experimentais avaliam a proliferação celular nas primeiras 24hs após o plaqueamento das células.

No caso das aCTMs cultivadas sobre MEC de células derivadas de aurícula, acreditamos que outras respostas biológicas estejam sendo moduladas, levando a esta diminuição significativa na proliferação celular. Como descrito nos itens 4.5 e 4.6 desta seção, nenhum dos tratamentos foi citotóxico para os cultivos de aCTMs, portanto, esta diminuição da proliferação das aCTMs não se deve ao fato das células estarem em processo de morte celular. Devido ao potencial de diferenciação das aCTMs, uma das hipóteses é que esta diminuição esteja ocorrendo devido ao fato destas células não estarem em expansão, mas em processo de diferenciação. Para

responder esta pergunta, ensaios de diferenciação foram realizados e serão discutidos adiante.

4.8 ANÁLISE DA ADESÃO CELULAR – MECs derivadas de células cardíacas promovem adesão de aCTMs semelhante ao controle de colágeno tipo I

A adesão à MEC é essencial para a fixação das células, desempenhando um papel importante na regulação da diferenciação celular (ZHU *et al.*, 2014). Com o intuito de avaliar se as MECs de células cardíacas derivadas de explantes de aurícula (MEC Aurícula) e ventrículo (MEC Ventrículo) poderiam influenciar a capacidade de adesão das aCTMs, cultivamos estas células por períodos curtos de tempo (10, 20 e 40 min) sobre estas MECs ou sobre o *coating* de colágeno tipo I (controle). Ao final de cada período de tempo quantificamos o número de células aderidas. Observamos que não houve diferença significativa entre o número de aCTMs aderidas às MECs cardíacas (MEC Aurícula e MEC Ventrículo) e ao controle (Col 1) ao longo dos diferentes tempos (FIGURA 4.19).

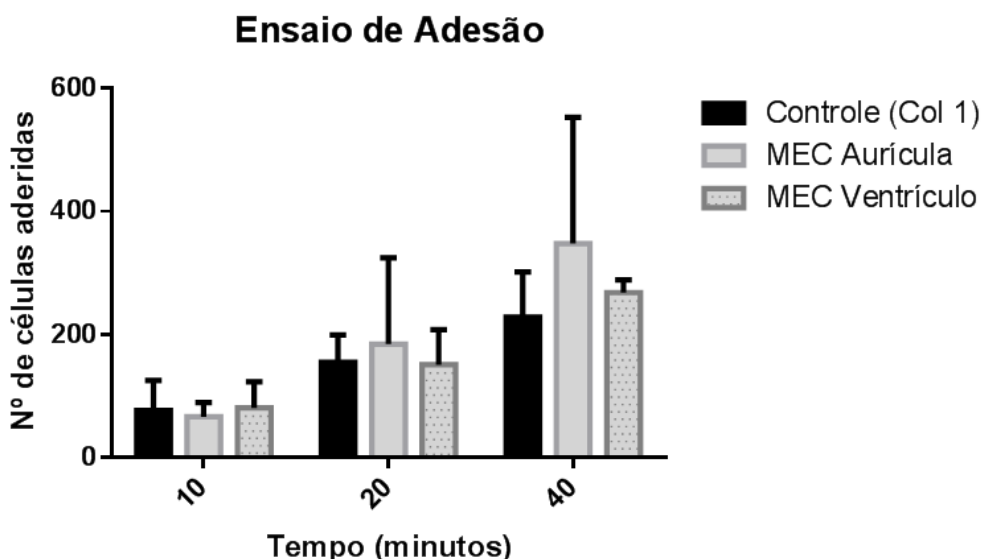


FIGURA 4.19: Avaliação da adesão celular de aCTMs quando cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula) e sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo) após 10, 20 e 40 minutos. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

O colágeno tipo I foi escolhido como controle pelo fato de ser a proteína de matriz utilizada para a realização dos cultivos celulares derivados dos explantes de

aurícula e ventrículo. Desta maneira, pudemos observar que as proteínas de MEC secretadas pelos cultivos de células cardíacas derivadas de explantes de aurícula e ventrículo, compostas por diversas proteínas além do colágeno I, como fibronectina, decorina, fibulina, colágeno tipo IV, não foram capazes de levar a estímulos que implicassem em maior ou menor adesão das aCTMs. Diferentemente, French e colaboradores (2012) realizaram ensaios de adesão utilizando microfluídica e observaram que a MEC cardíaca obtida de ventrículos de porcos foi capaz de promover maior adesão de células progenitoras cardíacas do que os controles (colágeno tipo I, laminina e fibronectina) (FRENCH *et al.*, 2012). Lin e colaboradores (2012) também constataram que a MEC de CTMs foi capaz de aumentar a adesão das próprias CTMs quando comparadas com o controle de colágeno (LIN *et al.*, 2012). Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo, observou-se que a MEC cardíaca e MEC de cordão umbilical foram capazes de promover maior adesão das CTMs após 20 e 40 minutos em relação ao controle (ROBERT, 2014); porém, neste caso, o controle utilizado foi o BSA (albumina do soro bovino - do inglês “bovine serum albumin”), proteína inerte, sem receptores nas CTMs. As fibrilas de colágeno tipo I possuem sítios de reconhecimento específicos que podem ser reconhecidos por um grupo de receptores de adesão celular do tipo integrinas (JOKINEN *et al.*, 2004), desempenhando um papel bastante importante no mecanismo de adesão celular. No trabalho de Robert (2014), comparou-se ainda a adesão das CTMs quando cultivadas sobre a MEC cardíaca e a MEC de cordão umbilical com outro controle composto por um gel de peptídeos sintéticos (PuraMatrix). Neste caso, a adesão promovida pelas MECs cardíaca e de cordão umbilical foi menor do que pelo PuraMatrix.

A complexidade das matrizes é responsável pelos diferentes efeitos biológicos induzidos nas células de um determinado tecido. É provável que a MEC derivada das células de aurícula e ventrículo não seja diferente do *coating* de colágeno tipo I para a adesão das CTMs, ao menos na forma de cultivo utilizada neste trabalho. Uma das hipóteses de não ter sido observada diferença entre as MECs e o colágeno I, é o fato de algumas proteínas bastante importantes para o processo de adesão celular, como laminina e fibronectina (WIGHT *et al.*, 1992) terem sido “perdidas” após o processo de descélularização (laminina não foi encontrada em ambas as MECs descélularizadas, apenas no controle; e fibronectina foi observada apenas na MEC derivada de células de aurícula). A força de adesão, que poderá determinar o número de células aderidas às diferentes matrizes, também

garante a integridade estrutural do tecido. Esta mesma força também é capaz de regular outros eventos celulares como a migração e a proliferação celular (SELHUBER-UNKEL *et al.*, 2010). Portanto, o fato das matrizes derivadas das células de aurícula e ventrículo não terem promovido maior capacidade de adesão das aCTMs pode também estar associada à regulação de outras atividades biológicas possivelmente induzidas nestas células.

4.9 ANÁLISE DA MIGRAÇÃO CELULAR – MECs e MCs derivados de células cardíacas promovem migração de aCTMs semelhante ao controle de colágeno tipo I

Com o objetivo de avaliar se as MECs e os MCs poderiam influenciar a atividade migratória das aCTMs, realizamos ensaio de migração celular durante 12 horas de cultivo. Este tempo de cultivo foi determinado devido à taxa média de proliferação das aCTMs, que é de cerca de 80% após 24 horas, conforme descrito no item 4.7 desta seção. A figura 4.20 mostra uma representação de como foi realizado o ensaio. De acordo com nossos resultados, podemos observar que após 12 horas de cultivo, não houve diferença estatisticamente significativa no número de células que migraram entre os diferentes tratamentos (FIGURA 4.21).

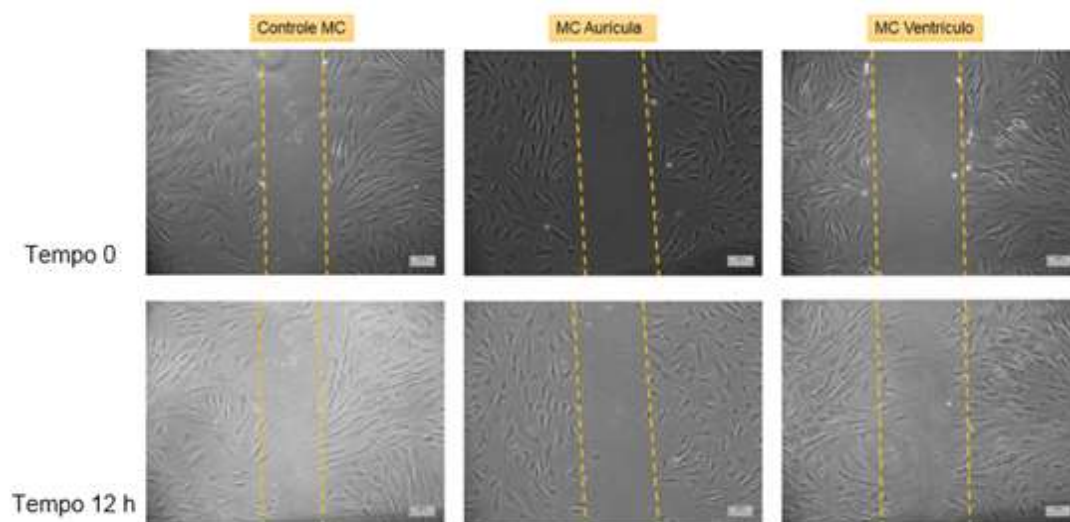


FIGURA 4.20: Ensaio de migração celular: área da migração. Imagens representativas do ensaio de migração celular de aCTMs nos tempos 0 e 12 horas. As linhas tracejadas correspondem a área onde foi feito o risco do “*scracth and wound assay*”. A barra corresponde a 100 μ m. Fotos realizadas em aumento de 10x. FONTE: A autora, 2014.

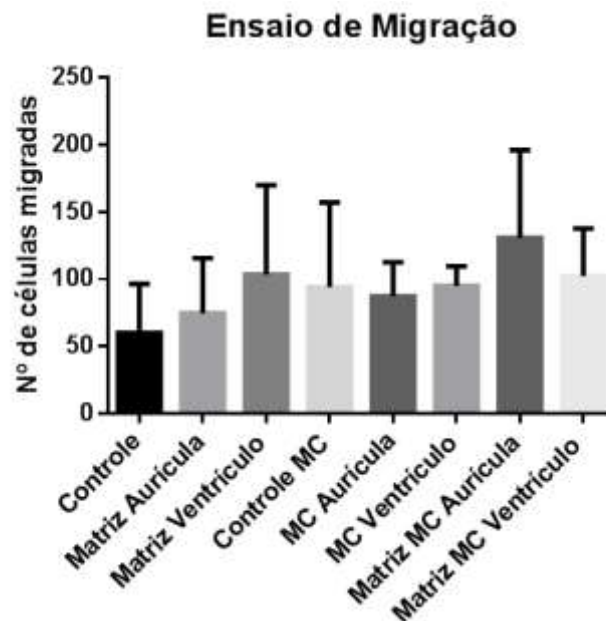


FIGURA 4.21: Ensaio de migração celular: quantificação do número de células que migraram. Avaliação da migração de CTMs de tecido adiposo cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação ao número de células migradas após 12 horas de cultivo. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

Ao avaliarmos os resultados, observamos uma heterogeneidade bastante grande entre os três doadores de aCTMs (informações individuais no apêndice B) utilizados para os ensaios. Por este motivo, não foi possível estabelecer nenhuma diferença estatisticamente significativa no número de células migradas sobre as MECs e com os MCs. Diferentemente, Lin e colaboradores (2012) realizaram ensaios de quimiotaxia e observaram que a MEC de CTMs foi capaz de promover maior migração de CTMs do que o controle colágeno tipo I. Utilizando um ensaio semelhante ao realizado neste trabalho, Lin e colaboradores (2012) também realizaram ensaios de motilidade celular, porém, neste caso, observaram que as células cultivadas sobre MEC de CTMs migraram mais rapidamente e se aglomeraram mais perto do centro dos poços, sugerindo que a MEC possui um papel mais ativo na promoção da motilidade celular e ocupação da área acelular (LIN *et al.*, 2012). Zhao e colaboradores (2013) observaram que o MC de CTMs de tecido adiposo foi capaz de promover maior migração de fibroblastos de derme quando em comparação com o controle de meio não condicionado (ZHAO *et al.*, 2013). Em um trabalho anterior realizado por nosso grupo, observou-se que as

matrizes derivadas do tecido cardíaco ou do cordão umbilical, assim como as associações destas matrizes com seus respectivos MCs, foram capazes de promover maior migração de CTMs de medula óssea do que o seu controle PuraMatrix após 24 horas. Neste caso, além de promover maior migração, as MECs também induziram menor adesão das CTMs em comparação a PuraMatrix (ROBERT, 2014). Em nosso trabalho, como descrito no item 4.8 desta seção, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as MECs no que se refere a adesão celular, assim como não observamos diferença na migração celular. É possível que a MEC derivada das células de aurícula e ventrículo não tenha atividade diferente do *coating* de colágeno tipo I sobre a migração das aCTMs, ao menos na forma de cultivo utilizada neste trabalho. Outra hipótese é que, devido a heterogeneidade nas respostas celulares dos doadores utilizados neste trabalho, não conseguimos traçar um perfil de resposta das aCTMs perante as MECs e o MCs e para tal seria necessário um número maior de replicatas biológicas de aCMTs ou mesmo avaliar o efeito das MECs sobre outros tipos celulares, a fim de avaliar se o efeito observado é dependente do tipo celular.

4.10 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO CARDÍACA - MECs alteram a morfologia celular e MCs levam a um significativo aumento no número de células

Com o intuito de avaliar se as MECs ou os MCs poderiam induzir a diferenciação celular para o fenótipo cardiomiogênico nas aCTMs, realizamos o cultivo destas células sobre as MECs, associadas ou não aos MCs. Avaliamos então alguns marcadores de diferenciação por meio de imunofluorescência após 7 dias de cultivo. As proteínas avaliadas foram: Gata-4 – um fator de transcrição relacionado à diferenciação cardíaca (PIKKARAINEN *et al.*, 2004) e Troponina-I (TnI) – proteína relacionada à contração muscular cardíaca (TOBACMAN, 1996). Avaliamos a diferenciação cardíaca através da quantificação da marcação das proteínas Gata-4 e Troponina-I em relação a diferentes parâmetros, como porcentagem de células positivas para Gata-4 e Troponina-I, média da área marcada para Gata-4 e Troponina-I e presença de Gata-4 nuclear. Estes parâmetros foram considerados com o objetivo de avaliar a eficiência da diferenciação celular e a localização das proteínas marcadas. No caso do fator de transcrição Gata-4, sua translocação para o núcleo celular indicaria sua possível atuação como modulador da transcrição gênica nestas células.

De acordo com os nossos resultados, não foi observada nenhuma diferença significativa na porcentagem de células positivas (FIGURA 4.22) ou na média da área marcada (FIGURA 4.23) para Gata-4 e Troponina-I. Também não observamos diferença significativa na marcação de Gata-4 nuclear em nenhuma das condições avaliadas (FIGURA 4.24).

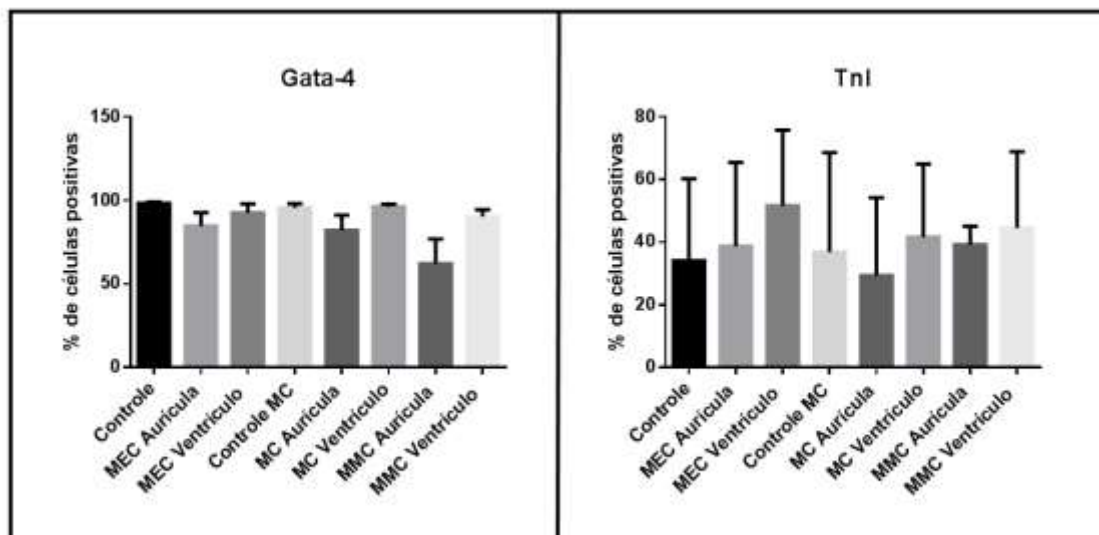


FIGURA 4.22: Avaliação da diferenciação cardiomiogênica. As aCTMs foram cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação ao percentual de células positivas para GATA-4 e Troponina-I (Tnl) após 7 dias de cultivo. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

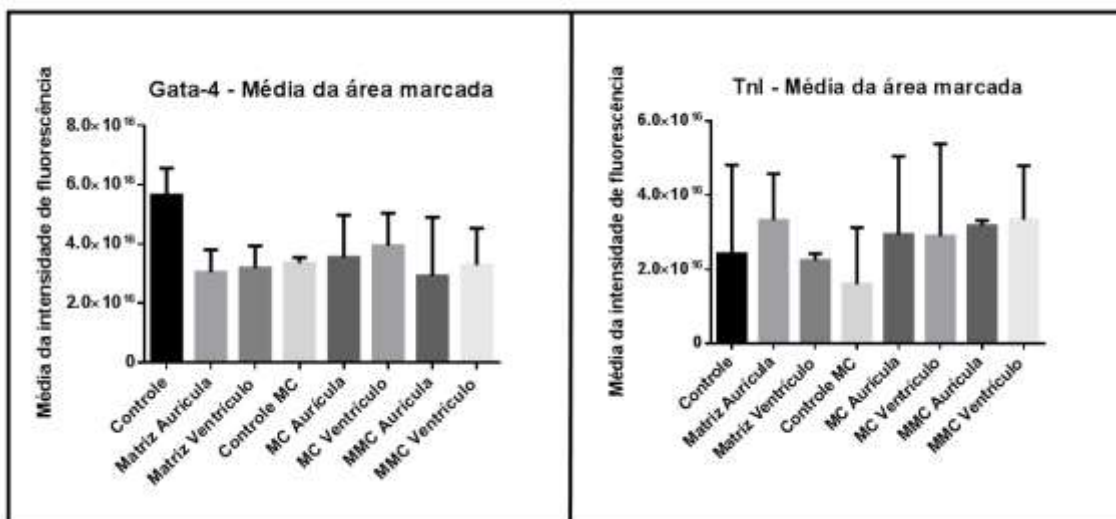


FIGURA 4.23: Avaliação da diferenciação cardiomiogênica em relação à área de marcação. As seguintes condições foram avaliadas: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação à quantificação da área de marcação para GATA-4 e Troponina-I (Tnl) após 7 dias de cultivo. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

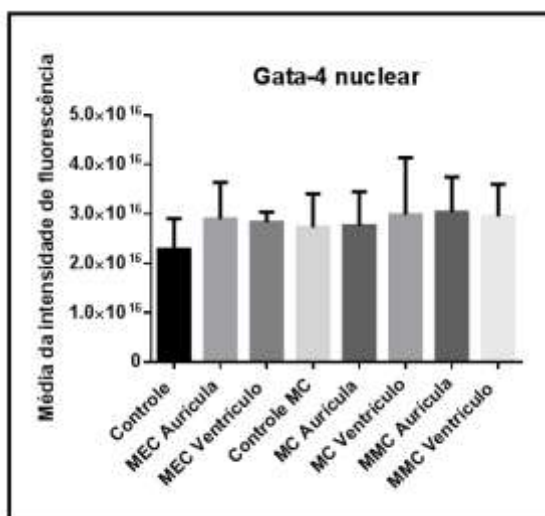


FIGURA 4.24: Avaliação da diferenciação cardiomiogênica através da marcação nuclear de Gata-4 em aCTMs cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação à quantificação de marcação nuclear de GATA-4 após 7 dias de cultivo. (n=3).

FONTE: A autora, 2014.

As figuras 4.25 e 4.26 são imagens ilustrativas, nas quais podemos observar que não houve diferenças evidentes na marcação das proteínas cardíacas após 7 dias de cultivo. Muitos estudos acerca da diferenciação cardiomiogênica de células-tronco mesenquimais já foram realizados, porém algumas questões ainda são levantadas em relação a real capacidade da diferenciação destas células em gerar cardiomiócitos funcionais. Em 2004, Planat-Bénard e colaboradores, utilizando um meio de diferenciação rico composto por SBF, albumina, L-glutamina, insulina, transferrina, IL-3, IL-6 e fator de células estaminais conseguiram diferenciar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo murinas em células semelhantes a cardiomiócitos atriais e ventriculares. Van Dijk e colaboradores (2008) cultivaram células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo com 5-azacitidina e ainda sobre matrizes de fibronectina e laminina. Os autores observaram que após 5 semanas, 61% das células cultivadas com 5-aza e na presença da matriz de laminina apresentavam a expressão de desmina, sugerindo que estas CTMs haviam se comprometido com a linhagem cardíaca (VAN DIJK *et al.*, 2008). Em 2010, Choi e colaboradores submeteram células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo a 4 protocolos de indução da diferenciação cardiomiogênica diferentes: 1) tratamento com 5-azacitidina; 2) cultivo com meio cardiomiogênico modificado (muito semelhante ao de Planat-Bénard *et al.*, 2004); 3) tratamento com tricostatina A; 4) co-cultivo com cardiomiócitos neonatais murinos. Ao final, eles observaram que o protocolo mais eficiente de diferenciação foi o de co-cultivo, gerando células positivas para marcadores cardíacos como GATA-4, Nkx2.5, alfa-actinina, troponina-I e cadeia pesada da miosina e que ainda apresentam contrações espontâneas (CHOI *et al.*, 2010). Em 2010, Tan e colaboradores diferenciaram células-tronco mesenquimais humanas de medula óssea em células semelhantes a cardiomiócitos através de um meio de diferenciação composto por insulina, dexametasona e ácido ascórbico, assim como Shim e colaboradores em 2004 (SHIM *et al.*, 2004; TAN *et al.*, 2010). Ainda em 2010, Okura e colaboradores diferenciaram células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo em células semelhantes a cardiomiócitos através da indução com DMSO e logo após transplantaram *patches* destas células em corações de ratos infartados. Eles observaram que o transplante resultou em melhora da função cardíaca e da taxa de sobrevivência dos animais, sugerindo que estas células “pré-diferenciadas” se mantiveram no miocárdio e diferenciaram em cardiomiócitos maduros (OKURA *et al.*, 2010). Porém, como pode-se observar, a maioria destes protocolos induzem a diferenciação a células semelhantes a

cardiomiócitos. De fato, a diferenciação cardiomiogênica das CTMs parece ser um evento raro, principalmente a diferenciação cardiomiogênica terminal, que culmina na obtenção de cardiomiócitos maduros e funcionais. Segundo Siegel e colaboradores (2012), CTMs derivadas de medula óssea quando submetidas a diferentes protocolos de diferenciação cardíaca podem chegar a expressar proteínas relacionadas a diferenciação cardiomiogênica, porém, jamais diferenciam a cardiomiócitos funcionais (SIEGEL *et al.*, 2012). Em 2013, Raynaud e colaboradores demonstraram que, quando progenitores mesenquimais derivados de células-tronco embrionárias eram cultivados em meio de diferenciação cardíaca, estes passavam a expressar genes relacionados ao coração. Porém, estes progenitores permaneciam exibindo o fenótipo de células mesenquimais (RAYNAUD *et al.*, 2013). De forma semelhante, em um trabalho anterior realizado por nosso grupo (ROBERT, 2014), não foi observada diferença na marcação de proteínas cardíacas como GATA-4, TnI cardíaca, α -SMA e Cx43 em CTMs derivadas de medula óssea cultivadas sobre MEC e/ou MC derivados de explantes cardíacos. De qualquer forma, é possível que os protocolos de diferenciação utilizados nestes trabalhos não tenham sido capazes de fornecer os estímulos necessários para a diferenciação das CTMs.

Muito embora não tenhamos detectado nenhuma diferença em relação ao perfil de marcação destas células, podemos observar que as CTMs cultivadas sobre as MECs tanto de aurícula, quanto de ventrículo, possuem morfologia distinta das demais. Estas células, quando cultivadas sobre as MECs, adquiriram uma morfologia alongada, diferentemente das células do controle (FIGURA 4.23). É importante ressaltar que a morfologia celular pode regular o crescimento e a fisiologia das células, sendo que muitos eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário e à diferenciação de células-tronco são influenciados pela morfologia da célula. Muitos estudos têm demonstrado que o destino da célula-tronco pode ser influenciado artificialmente através do controle de sua morfologia por meio de MECs artificiais (como revisado por GUILAK *et al.*, 2009). Propriedades intrínsecas da MEC, como estrutura, elasticidade e composição modulam vias mecano-sensitivas que podem converter sinais biofísicos em sinais bioquímicos, levando ao comprometimento celular em uma linhagem específica (REILLY *et al.*, 2010). Portanto, embora não tenhamos observado diferença na expressão das proteínas Gata-4 e Troponina-I, é provável que as MECs tenham influenciado o comportamento celular, implicando em mudanças em sua morfologia, o que sugere um papel bioativo das mesmas. Outra possibilidade que deve ser considerada ao

avaliarmos a expressão das proteínas em questão é o tempo de cultivo. É possível que os 7 dias de cultivo não tenham sido suficientes para disparar todas as vias de sinalização responsáveis pelo comprometimento celular. De fato, o tempo de cultivo é uma variável bastante controversa na literatura. Alguns trabalhos realizam protocolos de diferenciação de duração mais longa, 21 dias (FUKUDA *et al.*, 2003), 20 dias (LU *et al.*, 2013), 14-15 dias (ZHANG *et al.*, 2012; LIAN *et al.*, 2013), 12 dias (DUAN *et al.*, 2011), em contrapartida, outros utilizam tempos mais curtos, como 1 dia (XU *et al.*, 2004; VAN DIJK *et al.*, 2008; CHOI *et al.*, 2010) e 2 dias (OKURA *et al.*, 2010). Escolhemos o sétimo dia de cultivo para a realização da análise da diferenciação cardíaca pelo fato de termos partido de uma concentração mínima de células no momento do plaqueamento e, após 7 dias, estas se apresentarem com uma confluência bastante elevada (principalmente nos grupos com MC). Pelo fato de termos observado mudanças morfológicas nas CTMs cultivadas sobre as MECs, acreditamos que as MECs desempenhem de fato um papel biológico sobre as CTMs, porém, há a possibilidade de nosso protocolo de diferenciação ter sido curto demais e, desta forma, não foi possível detectar alguns dos efeitos biológicos causados pelas MECs, como por exemplo, a diferenciação celular. Portanto, podemos sugerir como futuras perspectivas a realização de protocolos de diferenciação mais longos, como 14, 21 e 30 dias. Outra possibilidade é avaliar outros marcadores envolvidos com a diferenciação celular, entre eles (conexina-43, alfa actina de músculo liso, troponina-T, NKX2.5, MEF2C, dentre outros), ou mesmo que outras linhagens de diferenciação celular poderiam ter sido ativadas e não avaliadas neste trabalho, como a diferenciação em células endoteliais.

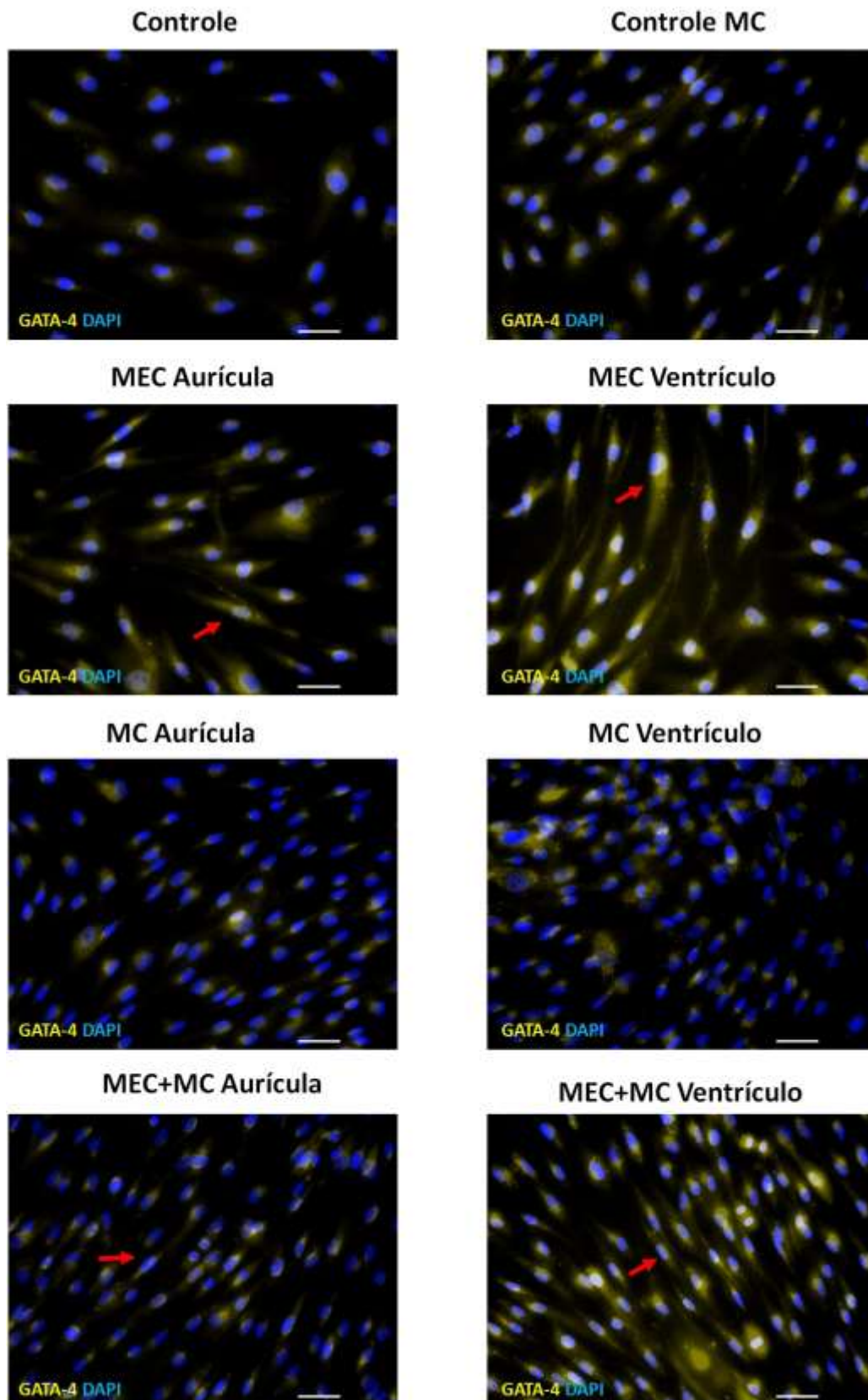


FIGURA 4.25: Imagens representativas das imunomarcações para GATA-4 em aCTMs após 7 dias de cultivo em diferentes condições. As setas em vermelho indicam as alterações morfológicas observadas nestas células. A barra corresponde a 100 μ m.

FONTE: A autora, 2014.

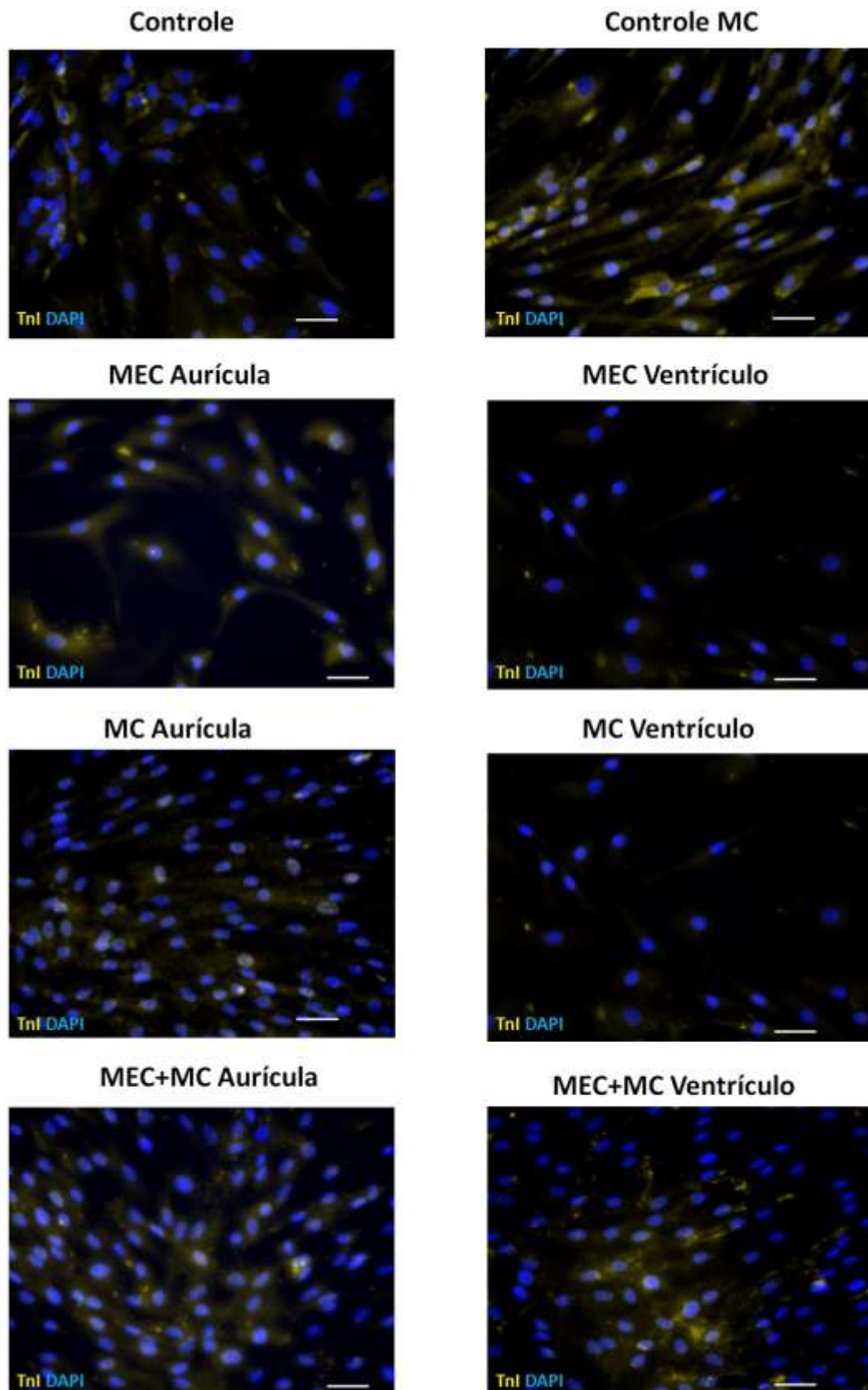


FIGURA 4.26: Imagens representativas das imunomarcações para troponina-I (TnI) em aCTMs após 7 dias de cultivo em diferentes condições. A barra corresponde a 100 μ m.

FONTE: A autora, 2014.

Pelo fato de termos observado que a confluência celular nos grupos cultivados com MC ser bastante diferente dos demais grupos, contendo um número de células visualmente maior, decidimos avaliar o número de células após 7 dias de cultivo através da contagem dos núcleos. Como podemos observar na figura 4.27, nos cultivos realizados na presença dos MCs, associados ou não as MECs, houve um aumento estatisticamente significativo no número de células ($p < 0,0001$) após 7 dias. É possível perceber este fenômeno observando a figura 4.25. Desta forma, podemos sugerir que os MCs promoveram maior proliferação das CTMs após 7 dias. Muito embora não tenhamos observado este mesmo fenômeno após 24 horas nos ensaios de proliferação, conforme o item 4.7 desta seção, podemos constatar que este aumento é bastante significativo após 7 dias de cultivo. Neste caso, podemos sugerir que a ação das proteínas dos MCs sobre as CTMs necessitem de mais tempo (além de 24 horas) para serem observadas. É importante ressaltar também que após 3 dias de cultivo, foi realizada a troca dos meios de cultivo, inclusive dos MCs, e que esta “renovação” do meio possa estar relacionada com as respostas celulares de proliferação. Possivelmente, algumas das proteínas encontradas nos MCs tenham sido as responsáveis por este aumento no número de células. De acordo com as análises proteômicas utilizando a ferramenta *g profiler* (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>), as proteínas TIMP1, SERPINE2, IL-6, ECM1, IGFBP7, TNC, LIF, SPARC, SERPINF1, CLEC11A, LAMC1, LAMB1, ANXA1, TGFBI, PRDX1, SERPINE1, GML e THBS1 encontradas em ambos os MCs, além da proteína CCDC88A encontrada exclusivamente no MC de células de aurícula estão relacionadas com a proliferação celular ($p < 0,05$). Portanto, acreditamos que estas proteínas tenham desempenhado um papel de sinalização nas aCTMs, levando-as a proliferar mais do que nas demais condições (controles e MECs).

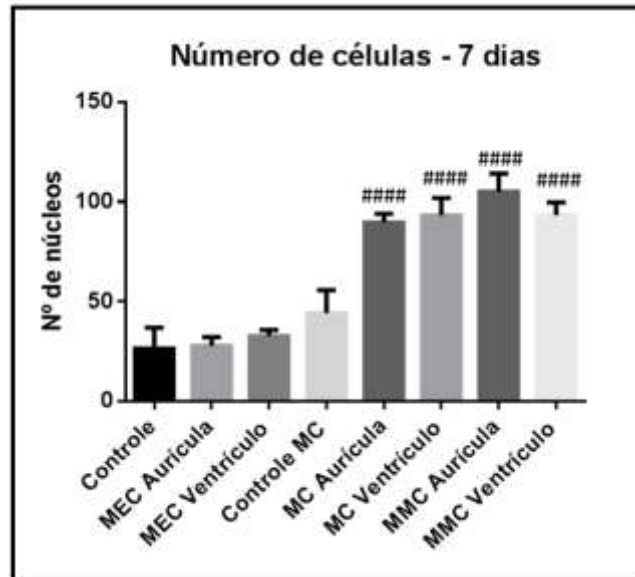


FIGURA 4.27: Efeito do MC no aumento do número de células em 7 dias de cultivo. Avaliação do número de células (número de núcleos) de aCTMs cultivadas nas seguintes condições: sobre colágeno I (controle), sobre MEC de células de aurícula (MEC aurícula), sobre MEC de células de ventrículo (MEC ventrículo), com meio não condicionado (Controle MC), com MC por células de aurícula (MC Aurícula), com MC por células de ventrículo (MC ventrículo), sobre MEC e com MC de células de aurícula (MMC aurícula) e sobre MEC e com MC de células de ventrículo (MMC ventrículo). Os resultados estão dispostos em relação ao número de núcleos após 7 dias de cultivo. #: Diferente do controle MC. ####: $p < 0,0001$.

FONTE: A autora, 2014.

Sendo assim, acreditamos que as MECs e os MCs tenham desempenhado um papel bioativo sobre as CTMs de tecido adiposo, seja na morfologia celular quando cultivadas sobre as MECs, seja na proliferação celular quando cultivadas na presença dos MCs. As proteínas presentes nas MECs e nos MCs possuem papéis distintos, levando ao disparo de diversas vias e desencadeando diferentes respostas celulares nas CTMs. Embora após 7 dias não tenha sido observada a diferenciação cardíaca, acreditamos que as MECs e os MCs sejam substratos promissores na ativação de diferentes respostas biológicas nas CTMs.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo principal a caracterização de células cardíacas residentes derivadas de explantes de aurícula e ventrículo cardíacos humanos em relação a fenótipo, secreção de fatores solúveis e proteínas de matriz extracelular. Além disso, através da utilização do meio condicionado (MC) e da matriz extracelular (MEC) secretada por estas células, buscamos mimetizar o microambiente cardíaco e avaliar seus efeitos biológicos em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e avaliar se seria possível utilizar esses elementos produzidos pelas células cardíacas como indutores de cardiomiogênese com fins de aplicação em terapias do sistema cardiovascular.

A caracterização fenotípica das células cardíacas revelou que estas consistem em populações celulares heterogêneas, compostas por células-tronco mesenquimais, fibroblastos cardíacos e possivelmente pericitos/miofibroblastos (células que expressam os marcadores CD146 e CD140b). Estas células foram então mantidas em cultivo de monocamada, a partir do qual estabelecemos um processo de descelularização para obtenção de MEC. Adicionalmente, coletamos o MC proveniente dos cultivos, sendo caracterizado pela primeira vez o secretoma destas populações celulares. Ambos os meios condicionados de células de aurícula e ventrículo mostraram-se ricos em citocinas, fatores de crescimento e proteínas potencialmente importantes no processo de regeneração cardíaca pós-injúria. Além disso, também foram identificadas várias proteínas de MEC no MC, indicando que estas células tem um papel ativo na secreção desses elementos.

Uma vez caracterizados, buscou-se avaliar a funcionalidade da MEC e do MC obtidos das células cardíacas. Através da análise de viabilidade celular e morte celular por apoptose e necrose verificou-se que as MECs e os MCs não foram tóxicos para os cultivos de células-tronco mesenquimais. Ao avaliarmos a proliferação das células-tronco mesenquimais cultivadas sobre as MECs e/ou com os MCs após 24 horas, observamos que a MEC derivada de células de aurícula promoveu uma redução da proliferação destas células em relação ao controle. Muito embora não tenha sido observado aumento na taxa de proliferação celular em 24 horas de cultivo em nenhuma das condições, observamos que o número de células cultivadas na presença de ambos os MCs foi significativamente maior que os demais grupos após 7 dias de cultivo. Em relação a adesão celular, observamos que as MECs não modificaram a capacidade de adesão das células-tronco mesenquimais

após 10, 20 e 40 minutos quando comparados com o controle composto por colágeno tipo I. Da mesma forma, as MECs e os MCs não promoveram maior migração das células-tronco mesenquimais após 12 horas de cultivo. Em relação a diferenciação celular, não observamos diferenças na marcação de Gata-4 e Troponina-I entre os grupos cultivados na presença das MECs e MCs em relação aos controles após 7 dias.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a MEC e o MC obtidos dos cultivos das células cardíacas derivadas de aurícula e ventrículo constituem potenciais fontes de fatores tróficos para o cultivo de células progenitoras. Entretanto, levando em consideração as condições experimentais avaliadas aqui, assim como o uso das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo nos experimentos funcionais, não foi possível confirmar que estes fatores (MEC e MC) mimetizem de fato o nicho cardíaco ou mesmo que as células-tronco mesenquimais utilizadas neste estudo tenham o potencial de diferenciação em linhagens cardiogênicas. Portanto, sugerimos que estes fatores sejam testados em cultivos com células-tronco pluripotentes ou mesmo progenitores cardíacos ou endoteliais, haja visto que estas células possuem potencial de diferenciação maior e/ou mais específico que as células-tronco mesenquimais utilizadas neste estudo. Outras perspectivas que se abrem a partir deste estudo são:

- Realizar um processo de descelularização das monocamadas celulares com protocolos mais brandos, a fim de se avaliar a manutenção da integridade estrutural e da composição da matriz extracelular;
- Realizar ensaios de proliferação celular em tempos mais longos, visto que o número de células após 7 dias foi significativamente maior nos grupos cultivados com os meios condicionados;
- Realizar protocolos de indução da diferenciação por períodos mais longos (15, 21, 30 dias) e ainda avaliar outros marcadores mais precoces de diferenciação cardíaca;
- Avaliar a diferenciação endotelial em ensaios de angiogênese e avaliação de marcadores endoteliais.

6 REFERÊNCIAS

ABONNENC, Mélanie *et al*, Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: Role of MicroRNA-29b and MicroRNA-30c, **Circulation Research**, v. 113, p. 1138–1147, 2013.

AGGARWAL, Sudeepta; PITTENGER, Mark F, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1823, 2015.

AGUIAR, Alessandra Melo De *et al*, Alkaline phosphatase-positive cells isolated from human hearts have mesenchymal stem cell characteristics, **Stem Cell Discovery**, v. 1, n. 3, p. 71–80, 2011.

AGUIAR, Alessandra Melo de. **Isolamento, caracterização, ativação e diferenciação em linhagens mesenquimais de pericitos cardíacos humanos**, 147 f. Tese (Doutorado em Biologia celular e molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

AKAZAWA, Hiroshi; KOMURO, Issei, Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases, **Pharmacology & therapeutics**, v. 107, n. 2, p. 252–68, 2005.

ALBERTS, B *et al*, **Biologia molecular da célula**, 5ª Ed., Porto Alegre, Artmed, 2010.

ANVERSA, Piero *et al*, Regenerating new heart with stem cells, **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 62–70, 2013.

ASSMUS, Birgit *et al*, Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI), **Circulation**, v. 106, p. 3009–3017, 2002.

BAER, Patrick C, Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro, **World journal of stem cells**, v. 6, n. 3, p. 256–65, 2014.

BAGLIO, Serena Rubina; PEGTEL, D Michiel; BALDINI, Nicola, Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy, **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 359, 2012.

BARTOLUCCI, Jorge *et al*, Estado actual de la terapia con células madre en el tratamiento de las cardiopatías, **Revista médica de Chile**, p. 1034–1046, 2014.

BEANE, Olivia S *et al*, Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow- , Muscle- , and Adipose-Derived Mesenchymal Stem / Stromal Cells, **PLoS ONE**, p. 1–22, 2014.

BELTRAMI, Antonio P *et al*, Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction, **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n.23, p. 1750-1757, 2001.

- BELTRAMI, Antonio P. *et al*, Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration, **Cell**, v. 114, p. 763–776, 2003.
- BRAND, Thomas, Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis, **Developmental Biology**, v. 258, n. 1, p. 1–19, 2003.
- BU, Lei *et al*, Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages, **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 113–117, 2009.
- BUGANIM, Yosef; FADDAH, Dina a; JAENISCH, Rudolf, Mechanisms and models of somatic cell reprogramming, **Nature reviews. Genetics**, v. 14, n. 6, p. 427–39, 2013.
- BYDLOWSKI, Sergio P *et al*, Características biológicas das células-tronco mesenquimais, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, 2009.
- CAI, Chen Leng *et al*, Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart, **Developmental Cell**, v. 5, p. 877–889, 2003.
- CAMELLITI, Patrizia; BORG, Thomas K.; KOHL, Peter, Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts, **Cardiovascular Research**, v. 65, p. 40–51, 2005.
- CAPLAN, Arnold I; DENNIS, James E, Mesenchymal stem cells as trophic mediators, **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1076–1084, 2006.
- CAPLAN, Arnold I; Mesenchymal stem cells, **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n.5, p. 641-650, 1991.
- CARVALHO, Pablo Hertel *et al*, Diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em cardiomiócitos, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2012.
- CASTALDO, Clotilde *et al*, Cardiac fibroblast-derived extracellular matrix (biomatrix) as a model for the studies of cardiac primitive cell biological properties in normal and pathological adult human heart, **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- CHEN, Chien-Wen *et al*, Human pericytes for ischemic heart repair, **Stem Cells**, v. 31, n.2, p. 305-316, 2013.
- CHEN, Ray-Neng *et al*, Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications, **Biomaterials**, v. 25, p. 2679–2686, 2004.
- CHEN, William C W *et al*, Human Myocardial Pericytes: Multipotent Mesodermal Precursors Exhibiting Cardiac Specificity, **Stem cells (Dayton, Ohio)**, p. 1–21, 2014.
- CHEN, Xiao-Dong *et al*, Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts, **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1943–1956, 2007.

CHOI, Yu Suk *et al*, Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes, **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 878–889, 2010.

CHRISTALLA, Peter; HUDSON, James E.; ZIMMERMANN, Wolfram Hubertus, The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium, **Cells Tissues Organs**, v. 195, p. 82–93, 2011.

CORTEZ, Dolores M *et al*, IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta , NF-kappaB, and AP-1 activation, **American journal of physiology - Heart and circulatory physiology**, v. 293, n. 6, p. H3356–65, 2007.

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

CRESCITELLI, Rossella *et al*, Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes, **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, p. 1–10, 2013.

DALEY, William P; PETERS, Sarah B; LARSEN, Melinda, Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine, **Journal of cell science**, v. 121, p. 255–264, 2008.

DELLAVALLE, Arianna *et al*, Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells, **Nature cell biology**, v. 9, n. 3, p. 255–267, 2007.

DEQUACH, Jessica a. *et al*, Simple and high yielding method for preparing tissue specific extracellular matrix coatings for cell culture, **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.

DOMINICI, M *et al*, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DUAN, Yi *et al*, Hybrid gel composed of native heart matrix and collagen induces cardiac differentiation of human embryonic stem cells without supplemental growth factors, **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 4, p. 605–615, 2011.

DUNWOODIE, Sally L, Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation, **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 1, p. 54–66, 2007.

ECKFELDT, Craig E; MENDENHALL, Eric M; VERFAILLIE, Catherine M, The molecular repertoire of the “almighty” stem cell, **Nature reviews: Molecular cell biology**, v. 6, p. 726–737, 2005.

EITAN, Yuval *et al*, Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling, and biocompatibility, **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 16, n. 4, p. 671–683, 2010.

ELLISON, Georgina M. *et al*, Adult c-kit^{pos} cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair, **Cell**, v. 154, p. 827–842, 2013.

ENGBRETSSEN, Kristin V T *et al*, Decorin, lumican, and their GAG chain-synthesizing enzymes are regulated in myocardial remodeling and reverse remodeling in the mouse, **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 114, n. 8, p. 988–97, 2013.

ENGLER, Adam J. *et al*, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, **Cell**, v. 126, p. 677–689, 2006.

FATTORE, Andrea Del *et al*, Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells, **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 15, n. 04, p. 0, 2014.

FERNÁNDEZ-AVILÉS, Francisco *et al*, Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction, **Circulation Research**, v. 95, p. 742–748, 2004.

FRANGOIANNIS, Nikolaos G, The immune system and cardiac repair, **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 58, n. 2, p. 88–111, 2008.

FRANGOIANNIS, Nikolaos G. *et al*, Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy, **Circulation**, v. 115, p. 584–592, 2007.

FRENCH, Kristin M. *et al*, A naturally derived cardiac extracellular matrix enhances cardiac progenitor cell behavior in vitro, **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 12, p. 4357–4364, 2012.

FUKUDA, K, Use of adult marrow mesenchymal stem cells for regeneration of cardiomyocytes, **Bone marrow transplantation**, v. 32 Suppl 1, p. S25–S27, 2003.

GATTAZZO, Francesca; URCIUOLO, Anna; BONALDO, Paolo, Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche, **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 8, p. 2506–2519, 2014.

GHIGO, Alessandra *et al*, Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart, **Cardiovascular research**, v. 102, n. 2, p. 270–80, 2014.

GILBERT, Thomas W; SELLARO, Tiffany L; BADYLAK, Stephen F, Decellularization of tissues and organs, **Biomaterials**, v. 27, p. 3675–3683, 2006.

GOLDSMITH, Edie C *et al*, Organization of fibroblasts in the heart, **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 230, n. 4, p. 787–94, 2004.

GRAUSS, Robert W *et al*, Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods, **European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery**, v. 27, n. 4, p. 566–71, 2005.

GREULICH, Franziska; RUDAT, Carsten; KISPERT, Andreas, Mechanisms of T-box gene function in the developing heart, **Cardiovascular research**, v. 91, n. 2, p. 212–22, 2011.

GUILAK, Farshid *et al*, Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix, **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 2009.

HARTMANN, Christoph *et al*, The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study, **Experimental cell research**, v. 313, p. 1318–1325, 2007.

HENG, Boon Chin *et al*, Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro, **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 34–42, 2004.

HIGH, Frances a; EPSTEIN, Jonathan a, The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease, **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. December, p. 49–61, 2008.

HUANG, S; INGBER, D E, The structural and mechanical complexity of cell-growth control, **Nature cell biology**, v. 1, p. E131–E138, 1999.

HYNES, Richard O, The extracellular matrix: not just pretty fibrils, **Science**, v.326, p. 1216-1219, 2009.

ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method, n. 07, 2006.

IEDA, Masaki *et al*, Cardiac Fibroblasts Regulate Myocardial Proliferation through B1 Integrin Signaling, **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 233–244, 2009.

JAHANYAR, Jama *et al*, Decorin-mediated Transforming Growth Factor- β Inhibition Ameliorates Adverse Cardiac Remodeling, **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 26, p. 34–40, 2007.

JENSEN, Todd *et al*, A rapid lung de-cellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation, **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 18, n. 8, p. 632–646, 2012.

JOKINEN, Johanna *et al*, Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils, **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 31956–31963, 2004.

KATZ, B Z *et al*, Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions, **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. March, p. 1047–1060, 2000.

KOCHER, A *et al*, Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines, **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 40, n. 4, p. 455–64, 2006.

KUMAR, V, ABBAS, A K, FAUSTO, N, **Patologia – bases patológicas das doenças**, 7ª Ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

LAI, Yanlai *et al*, Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells, **Stem cells and development**, v. 19, n. 7, p. 1095–1107, 2010.

LAVOIE, Jessie R; ROSU-MYLES, Michael, Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells, **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2212–2221, 2013.

LERI, Annarosa *et al*, Origin of Cardiomyocytes in the Adult Heart, **Circulation Research**, p. 150–167, 2015.

LIAN, Xiaojun *et al*, Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions, **Nature protocols**, v. 8, p. 162–75, 2013.

LICHTENBERG, Artur *et al*, In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions, **Biomaterials**, v. 27, p. 4221–4229, 2006.

LIN, Hang *et al*, Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential, **Biomaterials**, v. 33, n. 18, p. 4480–9, 2012.

LIPSIC, Erik *et al*, Timing of Erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemic/reperfusion, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.44, n.4, p.473-479, 2004.

LIRAS, Antonio, Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects, **Journal of translational medicine**, v. 8, n. 1, p. 131, 2010.

LIU, Jianfang *et al*, Generation, Characterization, and Potential Therapeutic Applications of Cardiomyocytes from Various Stem Cells, **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 12, p. 2095–2110, 2012.

LU *et al*, Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells, **Nature communications**, 2013.

MARTINI, Maristela Maria *et al*, Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under the appropriate niche conditions, **DNA and cell biology**, v. 32, n. 2, p. 58–65, 2013.

MEYER, Steven R *et al*, Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 254-262, 2006.

MOORE, K L, PERSAUD, T V N, **Embriologia Básica. 5ª ed.**, Editora Guanabara Koogan S/A, Rio de Janeiro, 2000.

MOORE, Kateri A; LEMISCHKA, Ihor R, Stem cells and their niches, **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, p. 1880–1885, 2006.

MORETTI, Alessandra *et al*, Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification, **Cell**, v. 127, p. 1151–1165, 2006.

MORONI, Francesco; MIRABELLA, Teodelinda, Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering, **American Journal of Stem Cells**, p. 1-20, 2014.

NAKANISHI, Chiaki *et al*, Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, p. 11–16, 2008.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, **Stem Cell Basics**, 2002. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>> Acesso em: 07/01/2015.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, **Stem Cell Basics**, 2012. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>> Acesso em: 07/01/2015.

NAVA, Michele M; RAIMONDI, Manuela T; PIETRABISSA, Riccardo, Controlling self-renewal and differentiation of stem cells via mechanical cues, **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 797410, 2012.

NESSELMANN, Catharina *et al*, Mesenchymal stem cells and cardiac repair, **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 5, p. 1795–1810, 2008.

OKURA *et al*, Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model, **Tissue Engineering: Part C**, v. 16, n.3, p.417-425, 2010.

OTT, Harald C *et al*, Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart, **Nature medicine**, v. 14, n. 2, p. 213–221, 2008.

OYAMA, Tomomi *et al*, Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo, **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 3, p. 329–341, 2007.

PALMER, James N *et al*, Interleukin-1b Induces Cardiac Myocyte Growth but Inhibits Cardiac Fibroblast Proliferation in Culture, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. June, p. 2555–2564, 1995.

PASSIER, R; MUMMERY, C, Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair, **Cardiovasc Res**, v. 58, p. 324–335, 2003.

PEREIRA, L V, A importância do uso das células tronco para a saúde pública; The importance of the use of stem cells for public health, **Ciência saúde coletiva**, p. 7–14, 2008.

PETERKIN, Tessa *et al*, The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development, **Seminars in cell & developmental biology**, v. 16, n. 1, p. 83–94, 2005.

PETERSEN, Thomas H *et al*, Tissue-engineered lungs for in vivo implantation, **Science**, v.329, p. 538-541, 2010.

PIKKARAINEN, Sampsa *et al*, GATA transcription factors in the developing and adult heart, **Cardiovascular research**, v. 63, n. 2, p. 196–207, 2004.

PLANAT-BÉNARD, V. *et al*, Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Adipose Tissue Stroma Cells, **Circulation Research**, v. 94, p. 223–229, 2004.

PORTAL BRASIL, **Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no país**, 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>> Acesso em: 06/01/2015.

RAYNAUD, Christophe M. *et al*, Human Embryonic Stem Cell Derived Mesenchymal Progenitors Express Cardiac Markers but Do Not Form Contractile Cardiomyocytes, **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 19–21, 2013.

REILLY, Gwendolen C; ENGLER, Adam J, Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation, **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 55–62, 2010.

ROBERT, Anny W, **Papel do microambiente cardíaco como indutor da diferenciação cardiomiogênica de células-tronco**, Dissertação de mestrado (Mestrado em Biociências e Biotecnologia), Curitiba, 2014.

ROSENTHAL, N, HARVEY, R P, **Heart Development and Regeneration**, 1^a ed., Elsevier, 2010.

ROTA, Marcello *et al*, Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function, **Circulation Research**, v. 103, p. 107–116, 2008.

SAINZ, Julie *et al*, Isolation of “side population” progenitor cells from healthy arteries of adult mice, **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, p. 281–286, 2006.

SAMAREL, Allen M, Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction, **American journal of physiology: Heart and circulatory physiology**, v. 289, p. H2291–H2301, 2005.

SCHITTINI, Andressa V *et al*, Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells, **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 235, p. 1015–1024, 2010.

SEDDON, Annela M; CURNOW, Paul; BOOTH, Paula J, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, **Biochimica et biophysica acta**, v. 1666, n. 1-2, p. 105–17, 2004.

SELHUBER-UNKEL, C *et al*, Cell adhesion strength is controlled by intermolecular spacing of adhesion receptors, **Biophysical Journal**, v. 98, p. 543–551, 2010.

SHIM, Winston 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, p. 481–488, 2004.

SHIOJIMA, Ichiro; KOMURO, Issei, Cardiac developmental biology: from flies to humans, **The Japanese journal of physiology**, v. 55, n. 5, p. 245–254, 2005.

SIEGEL, Georg *et al*, Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Express Cardiomyogenic Proteins But Do Not Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation Potential, **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 13, p. 2457–2470, 2012.

SILVESTRE, Jean-Sébastien; SMADJA, David M; LÉVY, Bernard I, Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications, **Physiological reviews**, v. 93, n. 4, p. 1743–802, 2013.

SNIDER *et al*, Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin, **Circulation Research**, v. 105, p. 934-947, 2009.

SOULDERS, Colby a; BOWERS, Stephanie L K; BAUDINO, Troy a, Cardiac fibroblast: the renaissance cell, **Circulation research**, v. 105, n. 12, p. 1164–76, 2009.

STRAUER, Bodo E *et al*, Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans, **Circulation**, v. 106, p. 1913–1918, 2002.

TAKAHASHI, Kazutoshi *et al*, Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, **Cell**, v. 131, p. 861–872, 2007.

TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, **Cell**, v. 126, p. 663–676, 2006.

TAMAKI, Shunsuke *et al*, Interleukin-16 promotes cardiac fibrosis and myocardial stiffening in heart failure with preserved ejection fraction, **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68893, 2013.

TAN, Genevieve *et al*, Differential effect of myocardial matrix and integrins on cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells, **Differentiation**, v. 79, n. 4-5, p. 260–271, 2010.

THE NATIONAL ACADEMIES, **Understanding Stem Cells: an overview of the science and issues from the National Academies**. Disponível em: <<http://nas-sites.org/stemcells/stem-cell-basics/>> Acesso em: 07/01/2015.

THOMSON, J a *et al*, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

TIMMERS, Leo *et al*, Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction, **Stem Cell Research**, v. 6, n. 3, p. 206–214, 2011.

TOBACMAN, Larry S, Thin filament-mediated regulation of cardiac contraction, **Annual Review of Physiology**, v.58, p.447-481, 1996.

TROUNSON, A, Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types, **Reproductive Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 58-63, 2002.

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito, Mesenchymal stem cells in health and disease, **Nature reviews: Immunology**, v. 8, p. 726–736, 2008.

UNNO, Kazumasa; JAIN, Mohit; LIAO, Ronglih, Cardiac side population cells: Moving toward the center Stage in cardiac regeneration, **Circulation Research**, v. 110, p. 1355–1363, 2012.

UYGUN, Basak E *et al*, Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix, **Nature medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–820, 2010.

VALENTE, Mariana *et al*, Sca-1(+) Cardiac Progenitor Cells and Heart-Making: A Critical Synopsis, **Stem cells and development**, v. 00, n. 19, 2014.

VAN BERLO, Jop H *et al*, C-Kit+ Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes To the Heart, **Nature**, v. 509, p. 337–41, 2014.

VAN DEN BROEK, Lenie J *et al*, Differential response of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, dermal fibroblasts, and keratinocytes to burn wound exudates: potential role of skin-specific chemokine CCL27, **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 1-2, p. 197–209, 2014.

VAN DER MEER, Peter *et al*, Erythropoietin in cardiovascular diseases., **European heart journal**, v. 25, n. 4, p. 285–91, 2004.

VAN DIJK, A *et al*, Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin, **Cell and Tissue Research**, v. 334, p. 457–467, 2008.

VAN WIJK, Bram; MOORMAN, Antoon F M; VAN DEN HOFF, Maurice J B, Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation, **Cardiovascular research**, v. 74, n. 2, p. 244–55, 2007.

VOOG, Justin; JONES, D Leanne, Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo, **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 2, p. 103–115, 2010.

WAGNER, Michael; SIDDIQUI, M A Q, Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation, **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 232, n. 1, p. 866–880, 2007.

- WATT, Fiona M; HUCK, Wilhelm T S, Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate, **Nature reviews: Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 467–73, 2013.
- WEBER, Karl T *et al*, Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart, **Nature reviews: Cardiology**, v. 10, p. 15–26, 2013.
- WIGHT, T N; KINSELLA, M G; QWARNSTRÖM, E E, The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation, **Current opinion in cell biology**, v. 4, p. 793–801, 1992.
- WIŚNIEWSKI, Jacek R *et al*, Universal sample preparation method for proteome analysis, **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 359–362, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Geneva: World Health Organization, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> Acesso em: 06/01/2015.
- XIANG, T *et al*, Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133⁺ cancer stem-like cells in ovarian cancer, **Oncogene**, v.34, p.165-176, 2015.
- XING, Qi *et al*, Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation, **Tissue engineering. Part C, Methods**, p. 1–11, 2014.
- XU, Wenrong *et al*, Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro, **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 229, p. 623–631, 2004.
- YAMASHITA, Jun K, ES and iPS cell research for cardiovascular regeneration, **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 16, p. 2555–2559, 2010.
- YANG, Lei *et al*, Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population, **Nature**, v. 453, p. 524–528, 2008.
- YING, Jackie Y *et al*, Method for extracellular matrix mediated differentiation and proliferation of stem cells, **United States Patent US 8372643B2**, 2013.
- YUASA, Shinsuke; FUKUDA, Keiichi, Cardiac regenerative medicine, **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 72 Suppl A, p. A49–A55, 2008.
- ZENG, Junyi *et al*, Co-culture with cardiomyocytes induces mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells and express heart development-associated genes, **Cell Research**, v. 18, n. 0640189, p. S62–S62, 2008.
- ZHANG, Jianhua *et al*, Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method, **Circulation Research**, v. 111, p. 1125–1136, 2012.
- ZHAO, Jiajia *et al*, The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro, **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

ZHOU, Bin *et al*, Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart, **Nature**, v. 454, p. 109–113, 2008.

ZHU, Bofan *et al*, E - Spun Composite Fibers of Collagen and Dragline Silk Protein: Fiber Mechanics, Biocompatibility, and Application in Stem Cell Differentiation, **Biomacromolecules**, 2014.

APÊNDICE A – Lista de anticorpos

Sigla oficial	Isotipo	Apresentação	Fabricante	Catálogo	Diluição
GATA4	Policlonal coelho, IgG	de Purificado	Santa Cruz	SC9055	1:100
Troponina I	Policlonal coelho, IgG	de Purificado	Santa Cruz	SC15368	1:100
THY1 (CD90)	Monoclonal camundongo, IgG	de FITC	E-bioscience	11-0909-73	1:20
ENG (CD105)	Monoclonal camundongo, IgG	de PE	E-bioscience	E029168	1:100
NT5E (CD73)	Monoclonal camundongo, IgG	de APC	E-Bioscience	17-0739-42	1:100
CD34	Monoclonal camundongo, IgG	de PE	Becton Dickinson	54295	1:100
ITGAM (CD11b)	Monoclonal camundongo, IgG	de PE	E-Bioscience	12-0112-82	1:100
CD45	Monoclonal camundongo, IgG	de APC	E-Bioscience	17-0459-73	1:100
CD19	Monoclonal camundongo, IgG	de FITC	E-Bioscience	11-0199-73	1:100
PDGFRB (CD140b)	Monoclonal camundongo, IgG	de PE	Becton Dickinson	558821	1:100
HLADRA	Monoclonal camundongo, IgG	de APC	E-Bioscience	17-9956-42	1:100
PECAM1 (CD31)	Monoclonal camundongo, IgG	de FITC	E-Bioscience	11-0319-42	1:100
CD117	Monoclonal camundongo, IgG	de PE	E-Bioscience	12-1179-73	1:20

ALPL	Monoclonal camundongo, IgG	de	PE	RD Systems	FAB1448P	1:20
MCAM (CD146)	Monoclonal camundongo, IgG	de	PE	Becton Dickinson	550315	1:20
Ly6a (SCA1)	Monoclonal camundongo, IgG	de	PE	Miltenyi Biotec	130-093-224	1:100
NCAM1 (CD56)	Monoclonal camundongo, IgG	de	PE-Cy7	Becton Dickinson	557747	1:100
DDR-2	Monoclonal camundongo, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab63337	1:50
Laminina	Policlonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab11575	1:100
Fibulina-2	Policlonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab125256	1:100
Colágeno 1	Policlonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab292	1:100
Lumican	Monoclonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab168348	1:100
Colágeno 4	Policlonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab6586	1:100
Sindecan 4	Policlonal coelho, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab24511	1:100
Decorina	Monoclonal camundongo, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab54728	1:100
Colágeno 3	Monoclonal camundongo, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab6310	1:100
Fibronectina	Monoclonal camundongo, IgG	de	Purificado	Abcam	Ab6328	1:100

Isotiocinato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina-P (PE), alofocianina (APC), ficoeritrina-P/cianina 7 (PE-Cy7).

APÊNDICE B

Informações individuais em relação aos doadores de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (aCTMs) utilizados neste trabalho (Lonza, Walkersville, EUA).

AD LONZA

Doador 1 – Lote 1F4155 Homem, asiático, 51 anos.

Doador 2 – Lote 353102 Homem, africano-americano, 40 anos.

Doador 3 – Lote 364977 Mulher, negra, 40 anos.

ANEXO I

