

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Doutorado em Biociências e Biotecnologia**

**CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA CARDÍACO E SUA INFLUÊNCIA NO  
CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS**

**ANNY WALOSKI ROBERT KULIG**

**CURITIBA/PR**  
**2018**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Doutorado em Biociências e Biotecnologia**

ANNY WALOSKI ROBERT KULIG

CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA CARDÍACO E SUA INFLUÊNCIA NO  
CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador (es): Dr. Marco Augusto Stimamiglio

**CURITIBA/PR**  
**2018**

Kulig, Anny Waloski Robert .

Caracterização do secretoma cardíaco e sua influência no cultivo de células progenitoras / Anny Waloski Robert Kulig. - Curitiba, 2018. xxiii, 178 f.; il.

(Doutorado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Marco Augusto Stimamiglio.

Bibliografia: f. 125-150

1. diferenciação cardíaca. 2. células residentes cardíacas. 3. secretoma. 4. fatores solúveis. 5. matriz extracelular. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
**Instituto Carlos Chagas**

Ata da Sessão Pública de exame de tese para obtenção do grau de Doutora em  
Biotecnologia e Biotecnologia.

Aos 23 dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, às 09:00 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Tatiana A. C. Brasil de Souza, Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto e Dra. Tais Hanae Kasai Brunswick, com a finalidade de julgar a tese da candidata **Anny Waloski Robert Kulig**, intitulada: "**Caracterização do secretoma cardíaco e sua influência no cultivo de células progenitoras**", sob a orientação de orientação de Marco Augusto Stimamiglio, **para** obtenção do grau de **Doutora** em Biotecnologia 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. Tatiana A. C. Brasil de Souza**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, 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 pela candidata.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2018

**Dra. Tatiana A.C. Brasil de Souza (Presidente) ICC/Fiocruz-Pr**

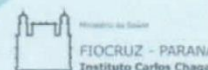
**Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto - PUC-Pr**

**Dra. Tais Hanae Kasai Brunswick - UFRJ**

**Candidato(a): Anny Waloski Robert Kulig**

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu marido, meu eterno amor, por sempre estarem ao meu lado e me darem forças para continuar. Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, pelas bênçãos, por ter me dado saúde e forças para conseguir lutar pelos meus sonhos.

Agradeço especialmente aos meus pais por todo amor, carinho e apoio que sempre transmitiram ao longo da minha vida. Obrigada por sempre estarem presentes e me proporcionarem as oportunidades para chegar até este momento.

Ao meu marido Gardner, meu amor! Obrigada por sempre me apoiar e me incentivar a seguir em frente quando eu tinha dúvidas. Obrigada por aguentar os dias de estresse e choro ao longo destes últimos anos. Seu apoio foi e é muito importante para mim e seus conselhos sempre me ajudaram. Muito obrigada por me fazer sentir amada sempre.

Ao meu orientador Dr. Marco Augusto Stimamiglio. Não tenho palavras para agradecer por tudo! Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelos incentivos, pela ajuda com os experimentos (e com as várias citometrias), pelas discussões de artigos e resultados e por ter confiado em mim para desenvolver este projeto. Foram 4 anos (ou seriam 6? (considerando o mestrado)) de muitos desafios e dificuldades, mas obrigada por não duvidar de mim ou da minha capacidade quando eu mesma duvidava. Você foi, e é, um excelente orientador, um excelente pesquisador e uma pessoa maravilhosa. O que aprendi vou levar comigo não apenas para o mundo acadêmico, mas também para a minha vida pessoal.

Ao Dr. Bruno Dallagiovanna e ao Dr. Alejandro Correa por todos os ensinamentos, dicas, críticas e discussões em labmeetings e jornadas acadêmicas. Os conselhos de vocês contribuíram muito para este trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao LABCET, uma grande família! Durante estes anos muitas pessoas entraram e saíram do laboratório, mas agradeço a todos! Em especial a Ana Paula, Crisciele, Addeli, Thamile, Alessandra, Bruna, Isabela, Ana Carolina e Beth por todas as discussões científicas, pela ajuda com os experimentos e por sempre estarem ali para ouvir, para dividir as alegrias e também as angústias. Claro, também queria agradecer

a Patrícia, Daniela, Isabelle, Ariane, Maria Júlia, Cíntia, Jonathan, Alan, Bernardo, Amanda, Bruna Falavinha, Axel, Marina e Andressa pelas contribuições nos labmeetings, pela ajuda com os experimentos e por todas as conversas e discussões no lab, por toda a força. Todos me ajudaram muito nessa jornada! Obrigada mesmo pessoal!

Agradeço as plataformas de espectrometria de massas, de citometria de fluxo e microscopia por todo auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento especial ao Dr. Michel Batista e a Dra. Kelly por toda a ajuda com a proteômica.

Aos meus avaliadores de jornada acadêmica Dr. Nilson Zanchin e Dra. Daniela Pavoni por todas as sugestões e contribuições dadas ao desenvolvimento deste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, da UFRJ, por terem me recebido muito bem e me ensinado a diferenciação cardiomiogênica. Em especial, agradeço a Dra. Adriana Bastos por me proporcionar a oportunidade de estar em seu laboratório, e a Dra. Taís Brunswick, Dra. Fernanda Mesquita e Dra. Dilza por todos os ensinamentos e ajuda com os experimentos.

Ao Núcleo de Tecnologia Celular, na PUC-PR, em especial a Dra. Tamara Borgonovo pelo auxílio com o cariótipo das células-tronco embrionárias.

Ao Dr. David Elliot do *Murdoch Childrens Research Institute of Royal Children's Hospital* em Victoria, Austrália, pela doação da linhagem de células-tronco embrionárias.

A todo o pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas, que forneceram as condições físicas e materiais para realização deste trabalho. A toda equipe do programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas.

Agradecimentos também as agências de fomento e fontes financiadoras desse projeto: FIOCRUZ, Fundação Araucária, CNPq, Capes.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O microambiente tecidual, composto especialmente por fatores solúveis e matriz extracelular (MEC), é capaz de regular o comportamento celular. Há grande interesse em entender a composição dos diferentes nichos teciduais e como eles são capazes de modular as respostas de diferentes tipos celulares. Com relação ao nicho cardíaco, ainda existem vários aspectos que precisam ser elucidados, como a caracterização dos sinais secretados que modulam o comportamento das células progenitoras residentes. Para tanto, diferentes abordagens podem ser propostas, como avaliar as moléculas secretadas por células derivadas de tecido cardíaco adulto ou durante o processo de diferenciação cardiomiogênica no período embrionário. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar a composição proteica e avaliar o efeito biológico de meios condicionados (MCs) derivados de células residentes cardíacas (CRCs) e de células-tronco embrionárias (CTEs) durante o processo de diferenciação cardiomiogênica. Em relação aos fatores secretados por CRCs, foram realizadas caracterizações e análises proteômicas mostrando uma complexidade de proteínas e fatores solúveis. Ensaio funcionais com células progenitoras em cultivo demonstraram que o secretoma das CRCs é capaz de influenciar a proliferação e diferenciação de cardioblastos H9c2 e de células progenitoras endoteliais. Outro foco deste trabalho foi avaliar as alterações do microambiente e sinalizações celulares presentes durante o comprometimento das CTEs à linhagem cardíaca. Para isso, coletamos os MCs e a MEC em diferentes pontos durante o processo de diferenciação cardiomiogênica de CTEs (D1, D4, D8/D9 e D15 – referentes aos dias de diferenciação e surgimento de progenitores). A composição da MEC e dos MCs foi avaliada por espectrometria de massas e arranjo de anticorpos, respectivamente. Identificamos em torno de 40 proteínas de MEC moduladas nos diferentes tempos analisados e 20 fatores de crescimento e/ou citocinas nos MCs. Experimentos com células H9c2 mostraram que os meios, em momentos iniciais da diferenciação (D1, D4 e D8), possuem a capacidade de aumentar a taxa de proliferação destes mioblastos. Resultados similares foram verificados em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, porém apenas os meios dos dias 1 e 4 mostraram diferença significativa na proliferação em relação aos demais. Cultivos de células progenitoras endoteliais com os MCs demonstraram que todos eles têm o potencial em estimular a angiogênese, mas apenas aqueles do D1 e D4 conseguem promover migração das células de forma similar ao controle positivo. Com relação ao potencial em estimular a cardiomiogênese, nem o meio do D8 nem do D15 foram capazes de induzir a diferenciação de células H9c2 ou de melhorar o processo de diferenciação das CTEs. Então, além de apresentarem perfis proteicos específicos, os diferentes MCs utilizados neste trabalho influenciaram os progenitores de formas diferentes. Enquanto os MCs obtidos de CRCs apresentaram efeitos promissores em células progenitoras, os MCs obtidos durante a diferenciação cardíaca *in vitro* tiveram resultados pouco representativos sobre as células progenitoras avaliadas. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que caracteriza o secretoma, incluindo proteínas da MEC, durante o processo *in vitro* de diferenciação cardiomiogênica de CTEs. Assim, os conhecimentos gerados neste trabalho podem contribuir tanto para o entendimento do processo de diferenciação e caracterização do nicho cardíaco, quanto para a busca de fatores para uso em terapias do sistema cardiovascular.

Palavras-chave: diferenciação cardíaca, células residentes cardíacas, secretoma, fatores solúveis, matriz extracelular.



## ABSTRACT

Tissue microenvironment, composed remarkably by soluble factors and extracellular matrix (ECM), is able to regulate cell behavior. There is a great interest in understanding the composition of the different tissue niches and how they modulate cell behavior. Regarding the cardiac niche there are several aspects that still needs elucidation, such as the characterization of the secreted signals that modulate the behavior of resident progenitor cells. For this purpose, different approaches could be suggested, such as evaluating the molecules secreted by cells derived from adult cardiac tissue or during the process of cardiomyogenic differentiation in the embryonic period. Thus, the purpose of this work is to characterize the composition and evaluate the biological effects of the conditioned media (CMs) derived from cardiac resident cells (CRCs) and embryonic stem cells (ESCs) during the process of cardiomyogenic differentiation. In relation to the factors secreted by CRCs, characterizations and proteomic analyzes showed a complex group of soluble factors. Functional assays using progenitor cells demonstrated that the secretome of CRCs is able to influence the proliferation and differentiation of H9c2 cardioblasts and endothelial progenitor cells. Another focus of the study was to understand the alterations and signals of the microenvironment during the cellular compromise to cardiac lineage. For this purpose, we collected CMs and the ECM at different points during the ESC cardiomyogenic differentiation process (D1, D4, D8 / D9 and D15 - referring to the days of differentiation and progenitor emergence). The proteomic composition of the ECM and CMs was evaluated by mass spectrometry and antibody array, respectively. We identified around 40 modulated ECM proteins during the differentiation process and 20 growth factors and/ or cytokines in the CMs. Assays with H9c2 cells have shown that the CMs of early differentiation points (D1, D4, and D8) have the ability to increase the proliferation rate of these myoblasts. Similar results were observed with adipose-derived mesenchymal stem cells, but only the CMs of days 1 and 4 showed significant differences on cell proliferation in relation to the others. Moreover, endothelial progenitor cells cultured with CMs showed that all the CMs have the potential to stimulate angiogenesis, but only those of D1 and D4 can promote cell migration similarly to the positive control. Regarding the potential to stimulate cardiomyogenesis, neither CMs from D8 nor D15 were able to induce the differentiation of H9c2 cells or to improve the differentiation process of the ESCs. Thus, in addition to specific protein profiles, the different CMs used in this work influence progenitor cells in different ways. While CMs obtained from CRCs showed promising effects on progenitor cells, CMs obtained during *in vitro* cardiac differentiation of ESCs have poorly representative results on the progenitor cell types tested. In our knowledge, this is the first work that characterizes soluble factors and ECM secreted during *in vitro* cardiomyogenic differentiation of ESCs. Thus, the knowledge generated here contributes to both the understanding of the cardiomyogenic differentiation process and the cardiac niche characterization, as well as to the search for factors to be used in cardiovascular system therapy.

Key words: cardiac differentiation, cardiac resident cells, secretome, soluble factors, extracellular matrix.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Tipos celulares presentes no coração e seus respectivos progenitores..	25
Figura 1.2: Hierarquia das células progenitoras cardíacas e sua especificação nas linhagens celulares.....	26
Figura 1.3: Tipos de células-tronco .....	32
Figura 1.4: Potencial de diferenciação das células-tronco .....	34
Figura 1.5: Esquema do nicho de células-tronco. ....	41
Figura 1.6: Representação dos componentes do nicho cardíaco.....	44
Figura 1.7: Esquema ilustrando vários mecanismos de comunicação intercelular no coração .....	47
Figura 3.1: Etapas do processo de diferenciação cardiomiogênica de células-tronco embrionárias.....	55
Figura 3.2: Representação resumida do protocolo de marcação dos arranjos de anticorpos.....	61
Figura 3.3: Fluxograma da análise realizada com as membranas de anticorpos com auxílio do módulo de extensão Protein Array Analyzer .....	62
Figura 4.1: Fluxograma representativo das análises e ensaios realizados com o MC derivado de células residentes cardíacas. ....	71
Figura 4.2: Comparação da composição proteica do secretoma dos MCs das CRC. ....	73
Figura 4.3: Análises de ontologia gênica e funções moleculares com as proteínas identificadas nos MCs .....	75
Figura 4.4: Influência dos MCs na proliferação de ADSCs quando comparado ao MNCr .....	78
Figura 4.5: Avaliação do potencial de diferenciação e proliferação estimulado pelos MCs e MNCr em células H9c2 .....	79
Figura 4.6: Ensaio de formação de estruturas similares a vasos com células HUVECs cultivadas durante 12 horas em uma camada de Matrigel com os MCs .....	82
Figura 5.1: Fluxograma representativo dos procedimentos realizados nesta segunda etapa do trabalho .....	84
Figura 5.2: Caracterização das CTEs em seu estado indiferenciado.....	86
Figura 5.3: Cariótipo da linhagem de células-tronco embrionárias H3-NKX2.5 <sup>eGFP/w</sup> presentes no repositório de células do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco do ICC.....	87

Figura 5.4: Imagens representativas dos corpos embriões (CEs) durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs .....	89
Figura 5.5: Avaliação da expressão de marcadores nos pontos de checagem do processo de diferenciação cardiomiogênica.....	90
Figura 5.6: Identificação de proteínas relacionadas ao fenótipo cardiomiogênico nas CTEs após indução da diferenciação em cardiomiócitos .....	92
Figura 5.7: Expressão relativa de genes de pluripotência (Oct-4, Nanog e Rex1) ao longo do processo de diferenciação .....	94
Figura 5.8: Expressão relativa de genes marcadores das linhagens endodermal, mesodermal e ectodermal ao longo do processo de diferenciação cardiomiogênica. ....	95
Figura 5.9: Expressão relativa de genes relacionados ao fenótipo cardiomiogênico ao longo do processo de diferenciação .....	97
Figura 5.10: Confirmação da descelularização .....	99
Figura 5.11: <i>Heatmaps</i> representativos dos resultados de sequenciamento das proteínas secretadas que foram escolhidas para compor o arranjo de anticorpos..	100
Figura 5.12: Imagens representativas dos arranjos de anticorpos realizados com os meios condicionados e com o meio não condicionado (MNC) .....	101
Figura 5.13: Representação das intensidades dos pontos relativos às proteínas identificadas nos arranjos de anticorpos. ....	102
Figura 5.14: Análise de ontologia gênica de componentes celulares das proteínas identificadas nos CEs descelularizados .....	105
Figura 5.15: Padronização da proporção de meio condicionado a ser utilizado nos ensaios funcionais.....	110
Figura 5.16: Viabilidade celular relativa dos cultivos celulares com os MCs.....	111
Figura 5.17: Análise da proliferação celular dos cultivos de ADSCs e células H9c2 quando cultivadas com os MCs.....	112
Figura 5.18: Avaliação da migração de células HUVEC em contato com o MC.....	116
Figura 5.19: Ensaio de formação de estruturas similares a vasos de células HUVECs cultivadas durante 12 horas em uma camada de Matrigel com os MCs .....	118
Figura 5.20: Quantificação da diferenciação de células H9c2 cultivadas com os MCs .....	120
Figura 5.21: Análise do processo de diferenciação cardiomiogênica de CTEs quando cultivadas com os MCs .....	121

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 3.1: Proteínas (nomes ou símbolos) presentes no arranjo de anticorpos customizado.....	60
Quadro 3.2: Sequência dos iniciadores utilizados para PCR quantitativa.....	68
Quadro 5.1: Proteínas de matriz extracelular identificadas por espectrometria de massas.....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	- Tridimensional; terceira dimensão
ADAMTS3	- <i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3</i>
ADSCs	- Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
AFP	- Alfa fetoproteína
AGRN	- Agrina
ANG	- Angiomodulina
ANGPT1	- Angiopietina 1
BGN	- Biglicano
BMP1	- Proteína morfogenética óssea 1
BMP4	- Proteína morfogenética óssea 4
BMP5	- Proteína morfogenética óssea 5
BMP7	- Proteína morfogenética óssea 7
BMPER	- Proteína reguladora endotelial de ligação a BMP
BMPR-II	- Receptor de BMP do tipo II
BRACH (T)	- Fator de transcrição T Brachyury
BSA	- Albumina de soro bovino
Cat.:	- Número de catálogo
CE(s)	- Corpos embrióides
CER1	- <i>Cerberus</i>
CF	- Fibroblastos cardíacos
CML	- Células de músculo liso
CO <sub>2</sub>	- Gás carbônico
COL11A1	- Colágeno tipo XI, cadeia alfa 1
COL18A1	- Colágeno tipo XVIII, cadeia alfa 1
COL1A1	- Colágeno tipo I, cadeia alfa 1
COL22A1	- Colágeno tipo XXII, cadeia alfa 1
COL2A1	- Colágeno tipo II, cadeia alfa 1
COL3A1	- Colágeno tipo III, cadeia alfa 1
COL4A1	- Colágeno tipo IV, cadeia alfa 1
COL4A2	- Colágeno tipo IV, cadeia alfa 2
COL4A3	- Colágeno tipo IV, cadeia alfa 3
COL4A5	- Colágeno tipo IV, cadeia alfa 5
COL6A2	- Colágeno tipo VI, cadeia alfa 2

CRCs	- Células residentes cardíacas
CT1	- Cardiotrofina 1
CTE(s)	- Células-tronco embrionárias
Ctle	- Controle
CTM(s)	- Células-tronco mesenquimais
Cx43	- Conexina 43
CXCL1	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 14
CXCL12	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 12
CXCL14	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 14
CXCL16	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 16
CXCL5	- Quimiocina com motivo C-X-C ligante 5
D1	- Dia 1 da diferenciação cardiomiogênia
D15	- Dia 15 da diferenciação cardiomiogênia
D4	- Dia 4 da diferenciação cardiomiogênia
D8	- Dia 8 da diferenciação cardiomiogênia
D9	- Dia 9 da diferenciação cardiomiogênia
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenillindol
DCN	- Decorina
Descel	- Descelularizado
DKK1	- Dickkopf-1 (inibidor da via Wnt)
DMEM	- <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
D-PBS	- Salina tamponada com fosfato Dulbeco
EC	- Células endoteliais
ECM1	- Proteína de matriz extracelular 1
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
eGFP	- Proteína fluorescente verde
EMILIN1	- Emilina 1
EMILIN2	- Emilina 2
ENO1	- Enolase 1
EOMES	- Eomesodermina
EPO	- Eritropoietina
ET-1	- Endotelina 1
Ets-1	- <i>ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor</i>
FBN1	- Fibrilina 1
FBN3	- Fibrilina 3

FGF10	- Fator de crescimento de fibrblasto 10
FGF12	- Fator de crescimento de fibrblasto 12
FGF17	- Fator de crescimento de fibrblasto 17
FGF18	- Fator de crescimento de fibroblasto 18
FGF19	- Fator de crescimento de fibroblasto 19
FGF2	- Fator de crescimento de fibroblasto básico
FGF23	- Fator de crescimento de fibroblasto 23
FGF4	- Fator de crescimento de fibroblasto 4
FGF7	- Fator de crescimento de fibroblasto 7
FGF9	- Fator de crescimento de fibroblasto 9
FN (FN1)	- Fibronectina
FOXA2	- <i>Forkhead box A2</i>
FREM2	- <i>Fras1 related extracellular matrix protein 2</i>
FZD1	- Receptor Frizzled classe 1
GATA4	- Gata binding protein 4
GDF15	- Fator de diferenciação no crescimento 15
GDF2	- Fator de diferenciação no crescimento 2
GDF3	- Fator de diferenciação no crescimento 3
GPC2	- Glipicano 2
GPC3	- Glipicano 3
GPC4	- Glipicano 4
HAPLN1	- <i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HBEGF	- Fator de crescimento similar ao EGF ligante de heparina
HGF	- Fator de crescimetno de hepatócito
HPX	- Hemopexina
HSPG2	- Perlecan
HUVEC	- Células endoteliais da veia umbilical humana
IAM	- Infarto agudo do miocárdio
IGF	- Fator de crescimento semelhante a insulina
IGF2	- Fator de crescimento semelhante a insulina 2
IGFBP1	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 1
IGFBP3	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 3
IGFBP5	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 5
IGFBP6	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 6
IGFBP7	- Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 7

IL16	- Interleucina 16
IL1B	- Interleucina 1 $\beta$
IL33	- Interleucina 33
IL6	- Interleucina 6
IL8	- Interleucina 8
ILF3	- Interleukin enhancer-binding factor 3
IPA	- <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
iPSCs	- Células-tronco de pluripotência induzida
ITGB1	- Integrina beta-1
LAMA1	- Laminina subunidade alfa 1
LAMA4	- Laminina subunidade alfa 4
LAMA5	- Laminina subunidade alfa 5
LAMB2	- Laminina subunidade beta 2
LAMC1	- Laminina subunidade gama 1
LEFTY1	- Fator de determinação esquerda-direita 1
LEFTY2	- Fator de determinação esquerda-direita 2
L-Glu	- L-glutamina
LIF	- Fator inibidor de leucemia
LTBP1	- <i>Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1</i>
LUM	- Lumican
MC	- Meio condicionado
MCA	- Meio condicionado de aurícula
MCD15c	- 75% de MC obtido no dia 15 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB
MCD1c	- 75% de MC obtido no dia 1 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB
MCD4c	- 75% de MC obtido no dia 4 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB
MCD8c	- 75% de MC obtido no dia 8 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos 1
MCPIP	- <i>Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1</i>
MCV	- Meio condicionado de ventrículo
MEC	- Matriz extracelular
MEF	- <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>



MesP1	- <i>Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1</i>
MFAP1	- Microfibrillar-associated protein 1
MFAP2	- Microfibrillar-associated protein 2
miRNA (miR)	- Micro RNAs
MMP19	- Metaloproteinase 19
MMP2	- Metaloproteinase 2
MMP24	- Metaloproteinase 24
MMP25	- Metaloproteinase 25
MNC	- Meio não condicionado
MNCr	- Meio não condicionado das CRCs
mRNA	- RNA mensageiro
MTG	- Monotioglicerol
Nanog	- Homeobox transcription factor nanog
NCAM	- Molécula de adesão celular neural
NES	- Nestina
Nkx2.5	- <i>NK2 Homeobox 5</i>
NO	- Óxido nítrico
Oct4	- <i>Octamer-binding protein 4</i>
P3H1	- Prolil-3-hidroxilase
PAX6	- <i>Paired box 6</i>
PBS	- Salina tamponada com fosfato
PCOLCE	- <i>Procollagen C-Endopeptidase Enhancer</i>
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PDGFB	- Fator de crescimento derivado de plaquetas subunidade B
PDGF-BB	- Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas
POSTN	- Periostina
qPCR	- PCR quantitativa
Rex1	- <i>Reduced expression protein 1</i>
RNA	- Ácido ribonucleico
RPKM	- <i>Reads Per Kilobase per Million mapped reads</i>
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
SERPINB9	- <i>Serpin peptidase inhibitor, clade b, member 9</i>
SERPINE1	- <i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
SERPINE2	- <i>Glia-derived nexin</i>

SFB	- Soro fetal bovino
SOX2	- <i>Sex determining region y-box 2</i>
SPARC	- Proteína secretada ácida e rica em cisteína
SRF	- Fator de resposta ao soro
TGFA	- Fator de crescimento transformador alfa
TGFB1	- Fator de crescimento transformador beta 1
TGFB2	- Fator de crescimento transformador beta 2
THSD4	- Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4
TIMP3	- Inibidor tecidual de metaloproteinase 3
TIMP4	- Inibidor tecidual de metaloproteinase 4
TNF	- Fator de necrose tumoral
TNFSF10	- Superfamília do fator de necrose tumoral, Membro 10
TNFSF13 ou APRIL	- Superfamília do fator de necrose tumoral, Membro 13/ Ligante indutor de proliferação
TNFSF15	- Superfamília do fator de necrose tumoral, Membro 15
TNFSF8	- Superfamília do fator de necrose tumoral, Membro 8
Tnlc	- Troponina I cardíaca
TnTc	- Troponina T cardíaca
Tris-HCl	- Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreídrico
VASN	- Vasorina
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
VGf	- <i>Vgf nerve growth factor inducible</i>
VN	- Vermelho neutro
VWF	- Fator de <i>von willebrand</i>
Wnt	- Wingless
WNT11	- Membro 11 da família Wingless
XAV939	- 3,5,7,8-Tetrahydro-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-4H-thiopyrano[4,3- d]pyrimidin-4-one

## LISTA DE SÍMBOLOS

cm <sup>2</sup>	- centímetro quadrado
g	- grama
°C	- graus celsius
h	- hora(s)
µg	- micrograma
µg/mL	- micrograma por mililitro
µl	- microlitro
µm	- micrômetro
mg	- miligrama
mg/mL	- miligrama por mililitro
mL	- mililitro
mm	- milímetro
mM	- milimolar
min	- minuto(s)
M	- molar ou mol/L
x g	- multiplicação pela aceleração gravitacional
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
pb	- pares de base
%	- percentual
pH	- potencial hidrogeniônico
rpm	- rotações por minuto
s	- segundos
p	- significância
™	- trademark
U/mL	- unidades por mililitro
®	- marca registrada

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	24
1.1 O DESENVOLVIMENTO CARDÍACO: VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS.....	24
1.1.1 O coração.....	28
1.2 CÉLULAS-TRONCO.....	31
1.2.1 Células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais.....	32
1.2.2 Células-tronco pluripotentes.....	34
1.3 MEDICINA REGENERATIVA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	36
1.4 MICROAMBIENTE TECIDUAL.....	40
1.4.1 Nicho tecidual cardíaco.....	43
1.5 JUSTIFICATIVA.....	50
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	52
2.1 OBJETIVO GERAL.....	52
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	53
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS.....	53
3.3 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	53
3.4 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	54
3.4.1 Formação dos corpos embrióides (CEs).....	55
3.4.2 Indução da formação de células do mesoderma.....	56
3.4.3 Indução de progenitores cardíacos.....	56
3.4.4 Imunofenotipagem para CD56.....	56
3.4.5 Fenotipagem para Nkx2.5.....	57
3.4.6 Imunofenotipagem para troponina T.....	57

3.5	COLETA E PREPARO DOS MEIOS CONDICIONADOS .....	58
3.6	DESCELULARIZAÇÃO DOS CORPOS EMBRIÓIDES .....	58
3.7	CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DA MEC OBTIDA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS....	59
3.8	CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DOS MC OBTIDOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA – ARRANJO DE ANTICORPOS .....	59
3.9	ANÁLISE DE DADOS .....	62
3.10	CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, CÉLULAS H9C2 E CÉLULAS HUVEC .....	62
3.11	ENSAIOS FUNCIONAIS EM CULTIVOS CELULARES – CONDIÇÕES DOS MEIOS CONDICIONADOS UTILIZADOS .....	63
3.12	ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO .....	64
3.13	ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	64
3.14	ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS H9c2 .....	65
3.15	ENSAIO DE FORMAÇÃO DE VASOS <i>IN VITRO</i> .....	65
3.16	ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR .....	66
3.17	EXTRAÇÃO DE RNA.....	66
3.18	SÍNTESE DE cDNA .....	66
3.19	PCR QUANTITATIVA (PCRq) .....	67
3.20	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	68
3.21	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3.22	REAGENTES E MATERIAIS .....	69
<b>CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MEIOS CONDICIONADOS DERIVADOS DE CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS NO CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS .....</b>		<b>70</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
4.1	FLUXOGRAMA METODOLÓGICO.....	71
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DAS CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS .....	72
4.3	MC DAS CRCS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	77
4.4	MC DAS CRCS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARDIOBLASTOS.....	78
4.5	MC DAS CRCS ESTIMULA ANGIOGÊNESE <i>IN VITRO</i> .....	81

<b>CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS MEIOS CONDICIONADOS OBTIDOS DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>
5.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO.....	84
5.2 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS .....	85
5.3 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	87
5.4 COLETA DOS MEIOS CONDICIONADOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	98
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS OBTIDOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA .....	99
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES EXTRACELULARES OBTIDAS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA.....	105
5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA VIABILIDADE E NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	109
5.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS HUVEC E NA FORMAÇÃO DE VASOS <i>IN VITRO</i> .....	115
5.9 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS H9C2.....	119
5.10 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DOS MCS NAS CTES DURANTE SEU PROCESSO DE CARDIOMIOGÊNESE .....	121
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>123</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE 1 – RESULTADOS DA CURVA DE EFICIÊNCIA DE PRIMERS .....</b>	<b>151</b>
<b>APÊNDICE 2 – LISTA DE REAGENTES .....</b>	<b>152</b>
<b>APÊNDICE 3 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO MCA E MCV.....</b>	<b>153</b>
<b>APÊNDICE 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE NO IPA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO MCA E MCV .....</b>	<b>156</b>
<b>APÊNDICE 5 – IMAGENS DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE VASOS <i>IN VITRO</i> COM MCA E MCV.....</b>	<b>161</b>
<b>APÊNDICE 6 – VÍDEOS OBTIDOS AO FINAL DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CTES.....</b>	<b>162</b>
<b>APÊNDICE 7 – TABELA COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES TESTADOS NA qPCR.....</b>	<b>163</b>

<b>APÊNDICE 8 – TABELA COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS ESCOLHIDAS PARA O ARRANJO DE ANTICORPOS .....</b>	<b>164</b>
<b>APÊNDICE 9 – PADRONIZAÇÃO DA DILUIÇÃO DOS MCs .....</b>	<b>166</b>
<b>APÊNDICE 10 – IMAGENS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO (<i>WOUND HEALING</i>) ..</b>	<b>167</b>
<b>APÊNDICE 11 – ARTIGO PUBLICADO.....</b>	<b>168</b>
<b>ANEXO 1 – TERMO DE TRANSFERÊNCIA DAS CTES .....</b>	<b>176</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O DESENVOLVIMENTO CARDÍACO: VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS

O coração é um órgão muscular complexo, formado por vários tipos celulares. Tendo em vista sua importância, o coração é o primeiro órgão a se tornar funcional no embrião vertebrado, sendo que, em humanos, começa a pulsar após 20 - 23 dias de gestação (BRAND, 2003). Apesar do rápido desenvolvimento, a cardiogênese é um processo altamente regulado, que envolve diferenciação e especialização celular, integração espacial e coordenação de várias vias de sinalização. De forma associada, ocorre a incorporação de células ao chamado crescente cardíaco e o correto dobramento das estruturas para, então, formar as câmaras do coração (BRUNEAU *et al.*, 2013; FREIRE e RESENDE e PINTO-DO-Ó, 2014). As células cardíacas têm origem das células da mesoderme, as quais migram para a região da linha primitiva do embrião em duas “ondas” ou grupos: a primeira onda (do termo inglês *first heart field*) forma um tubo cardíaco inicial; já as células da segunda onda (*second heart field*) se fundem com o tubo inicial permitindo a continuidade do processo de diferenciação e dobramento (BRADE *et al.*, 2013; LIU e FOLEY, 2011).

Durante as etapas do desenvolvimento cardíaco definem-se 3 populações distintas de progenitores que dão origem as células presentes no coração (miocíticas ou não miocíticas): células da mesoderme cardiogênica, proepicárdio e células da crista neural cardíaca. Cada um destes progenitores origina diferentes tipos celulares (figura 1.1). Por exemplo, o proepicárdio gera as células do epicárdio, fibroblastos cardíacos e células da vasculatura cardíaca (como endoteliais e de músculo liso), enquanto que o principal papel das células da crista neural cardíaca é fornecer sinais para diferenciação e especificação de estruturas cardíacas, além de fornecer a inervação parassimpática do coração (revisado por BRADE *et al.*, 2013). Porém, considerando-se que é da região da mesoderme cardiogênica que surge a maior proporção de células do miocárdio atrial e ventricular, as vias relacionadas a esta diferenciação serão mais exploradas a seguir.



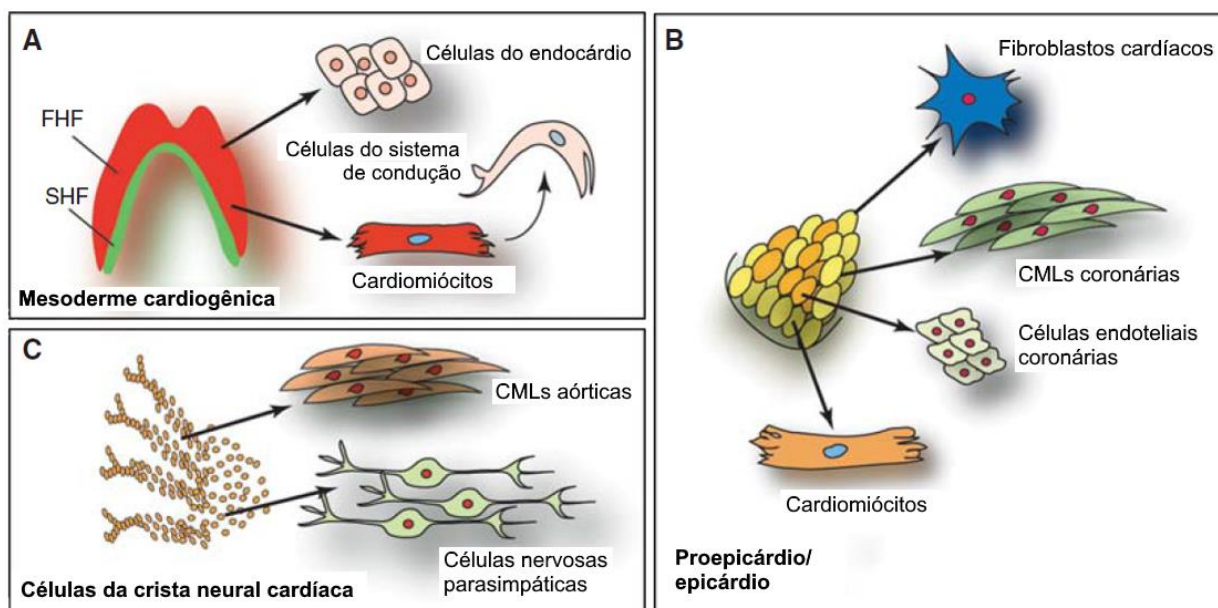


Figura 1.1: Tipos celulares presentes no coração e seus respectivos progenitores. A) Células originadas da mesoderme cardiogênica. B) Células originadas do proepicárdio. C) Células originadas da crista neural cardíaca. CML = células de músculo liso, FHF = *first heart field*, SHF = *second heart field*.

Fonte: Adaptado de BRADE *et al.*, 2013

Na figura 1.2 estão representadas as etapas de especificação da mesoderme cardiogênica, a qual sofre uma série de sinalizações para gerar progenitores que darão origem a células da primeira e segunda “ondas” cardíacas, diferenciando-se em vários tipos celulares (revisado por BRADE *et al.*, 2013). A indução destas células mesodermiais ao fenótipo cardiomiogênico, no início do desenvolvimento, envolve a modulação de uma série de vias de sinalização e proteínas (figura 1.2). Dentre os principais sinais temos a via de sinalização do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ), que inclui as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês *Bone morphogenetic proteins*), a Activina e o fator de diferenciação do crescimento NODAL, além da influência dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF, do inglês *Fibroblast Growth Factor*) e da via Wnt canônica e não canônica (LIU e FOLEY, 2011; WAGNER e SIDDIQUI, 2007). Esses sinais, indutores ou inibidores, são derivados de células adjacentes à mesoderme, como, por exemplo, células da endoderme, ectoderme e notocorda (BRAND, 2003).

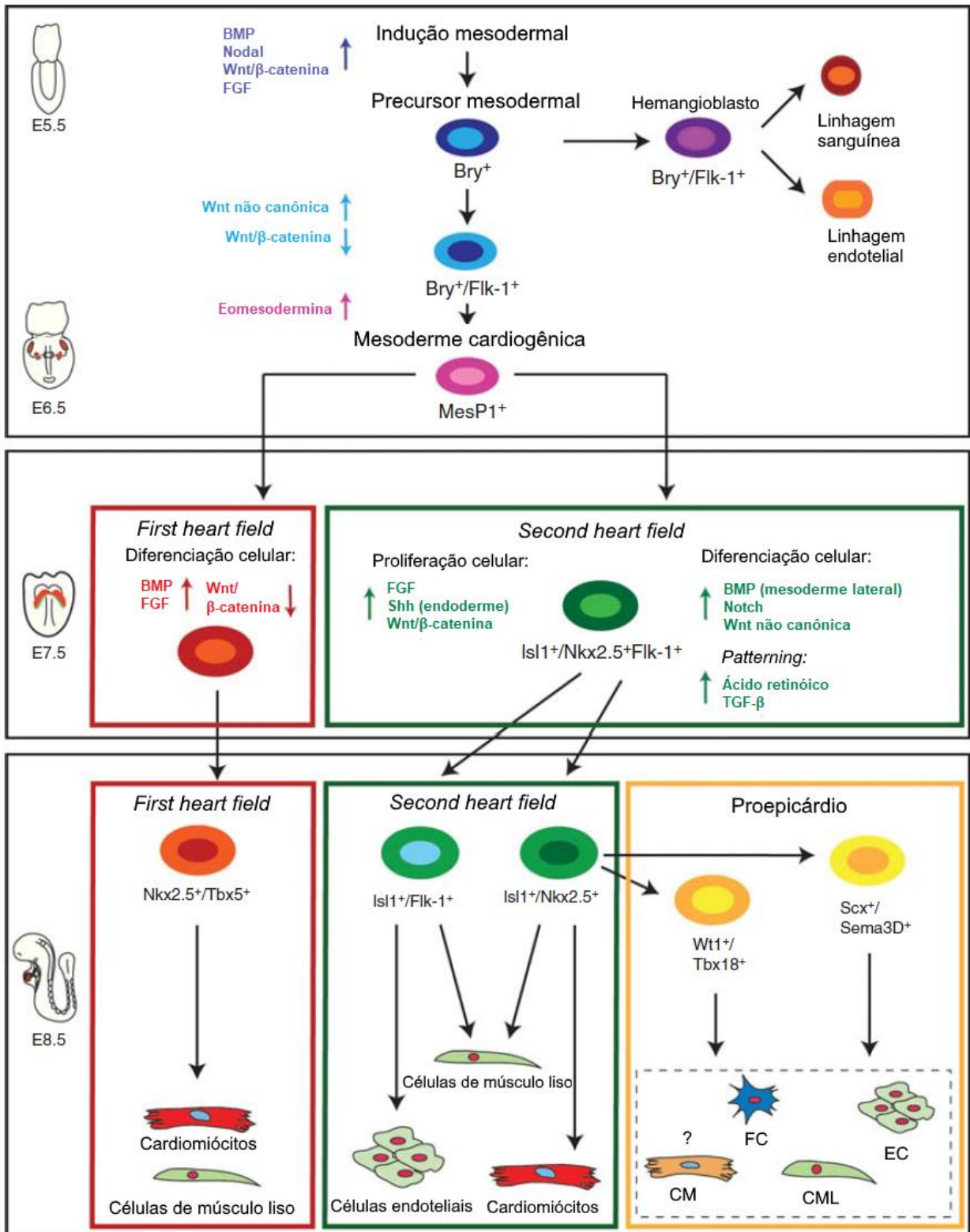


Figura 1.2: Hierarquia das células progenitoras cardíacas e sua especificação nas linhagens celulares. *First heart field* = primeira onda cardiogênica; *Second heart field* = segunda onda cardiogênica; CM = cardiomiócitos; CML = células de músculo liso; CF = fibroblastos cardíacos; EC = células endoteliais.

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

A via Wnt é composta por uma série de membros que estão envolvidos em diversos processos celulares, tanto durante o desenvolvimento embrionário, quanto no organismo adulto (GESSERT e KÜHL, 2010). Em relação ao desenvolvimento do coração, alguns trabalhos descreveram que a via Wnt tem papel bifásico na especificação a linhagem cardíaca (MAZZOTTA *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2014; NAITO *et al.*, 2006; UENO *et al.*, 2007). Inicialmente, a via Wnt canônica (Wnt/ $\beta$ -catenina) precisa ser ativada para gerar, entre outras coisas, células da mesoderme (LINDSLEY *et al.*, 2006). Posteriormente, a inibição da via Wnt canônica gera progenitores específicos da linhagem cardíaca, os quais são marcados, principalmente, pela expressão do fator de transcrição Mesp1 (BONDUE *et al.*, 2008; BONDUE e BLANPAIN, 2010). A via Wnt canônica pode ser novamente ativada, agora nas células geradas da segunda “onda” cardíaca, para estimular a proliferação, enquanto que a via Wnt não canônica promove a diferenciação destes novos progenitores (GESSERT e KÜHL, 2010; MAZZOTTA *et al.*, 2016; QYANG *et al.*, 2007). Assim, é importante ressaltar que a modulação desta via deve ser muito bem regulada, uma vez que qualquer alteração no momento em que a via é ativada ou inibida pode gerar defeitos na formação do coração.

Outro conjunto de proteínas essenciais no comprometimento cardíaco são as BMPs. Elas são proteínas da superfamília do TGF $\beta$  e tem importante papel na embriogênese e no desenvolvimento de vários órgãos (revisado por WANG *et al.*, 2014). Esta subfamília contém mais de 20 membros e vários deles tem relação com o desenvolvimento do coração e diferenciação ou proliferação de células cardíacas (revisado por HARMELINK e JIAO, 2012; VAN WIJK e MOORMAN e VAN DEN HOFF, 2007). Dentre as BMPs, destacamos BMP2 e BMP4, as quais são proteínas estreitamente relacionadas. Embriões com deleção do gene BMP2 apresentam malformação do âmnio/córion, assim como atraso no desenvolvimento do coração, o qual se forma em localização diferente do normal (ZHANG e BRADLEY, 1996). Outras alterações também foram verificadas em animais com mutações no gene BMP4. Neste caso, além dos embriões serem inviáveis, relatou-se ausência da expressão do marcador mesodermal Brachyury e pouca, ou nenhuma, diferenciação mesodermal (WINNIER *et al.*, 1995). Esses resultados forneceram evidências de que o BMP4 é essencial no desenvolvimento precoce do embrião, estando relacionado, principalmente, com a gastrulação e a formação do mesoderma (WINNIER *et al.*, 1995). Resultados similares foram observados com a deleção do receptor de BMP do tipo II (BMPRII), cujos animais foram incapazes de formar estruturas organizadas e a

própria mesoderme, sugerindo que este é um receptor importante na transdução dos sinais das BMPs no desenvolvimento embrionário (BEPPU *et al.*, 2000).

As BMPs também já tiveram demonstrada sua relação com o FGF em promover a diferenciação cardíaca. Isoladamente, os fatores não são capazes de estimular a sobrevivência da mesoderme pré-cardíaca (BMP2) ou induzir a cardiogênese (FGF4). Porém, a associação dos dois fatores (BMP2 + FGF4) induz a cardiogênese (LOUGH *et al.*, 1996). Posteriormente, Barron e colaboradores, ao continuarem com estes estudos, mostraram que BMP2/4 e FGF2/4 são necessários para induzir cardiogênese na mesoderme não cardiogênica e que ambos os fatores são imprescindíveis para induzir a expressão de fatores de transcrição cardíacos (BARRON e GAO e LOUGH, 2000).

Após a ativação destas vias de sinalização, geram-se cascatas de sinalizações intracelulares que levam a produção de fatores de transcrição cardíacos. Dentre os fatores que são expressos estão os membros da família GATA (como GATA4 e GATA6), o Nkx2.5, fatores da família MEF2 (MEF2A, MEF2C) e da família Tbx (Tbx2, 5, 20), o fator de resposta ao soro (SRF, do inglês *serum response factor*) entre outros. A regulação adequada destes fatores é essencial em vários aspectos do desenvolvimento do coração. Além da diferenciação e proliferação de progenitores cardíacos, estes fatores estão, por exemplo, envolvidos na identidade e correta formação das câmaras cardíacas (revisado por BRUNEAU *et al.*, 2013; OLSON, 2006; SRIVASTAVA, 2006). Também já foi demonstrado que muitos destes fatores interagem uns com os outros assim como agem de forma cooperativa nos alvos regulados (BRUNEAU *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2011).

Assim, observamos que, o coração, como um órgão complexo, composto por vários tipos celulares, precisa de uma sinalização altamente regulada para que todas as estruturas se formem corretamente.

### **1.1.1 O coração**

A composição do coração, assim como sua capacidade de regeneração, continua sendo alvo de estudos, uma vez que muitos dos dados publicados são controversos. Apesar dos tipos celulares presentes no coração estarem bem caracterizados, a real proporção entre estes ainda não é claramente definida. Sabe-se que os cardiomiócitos ocupam cerca de 70% do volume do coração, embora em número de células fique entre 30-40% do total (ZHOU e PU, 2016). Já a quantidade

das células não miocíticas, que são principalmente fibroblastos cardíacos e células endoteliais, ainda não está bem estabelecida.

Até recentemente acreditava-se que os fibroblastos eram o tipo celular mais abundante do coração, representando em torno de 60% da população, enquanto as células endoteliais ficavam entre 10% e 25% (BANERJEE *et al.*, 2007; BERGMANN *et al.*, 2015). Porém em 2016, Pinto e colaboradores, associaram técnicas genéticas, imunohistoquímicas e citometria de fluxo com uma série de marcadores para cada tipo celular, visando caracterizar as células do coração. Assim, relataram que a maior parte das células do coração são células endoteliais (60%), a medida que os fibroblastos constituem em torno de 15% do total (PINTO *et al.*, 2016). Essas divergências nos dados devem-se, principalmente, aos tipos de técnicas utilizadas, embora cada uma tenha suas vantagens e desvantagens (ZHOU e PU, 2016).

Um outro tipo celular que tem sido investigado no coração, são as células-tronco ou progenitoras cardíacas. Em 2003, Beltrami e colaboradores isolaram, do coração de ratos, uma população de células positivas para o marcador de superfície c-Kit e negativa para marcadores de linhagem hematopoiética e endoteliais, as quais foram chamadas de células-tronco cardíacas adultas. Estas células tinham capacidade de autorenovação, além de algumas apresentarem marcação para fatores de transcrição cardíacos (Nkx2.5, GATA4) e de serem capazes de se diferenciar em células endoteliais, células de musculo liso e cardiomiócitos (BELTRAMI *et al.*, 2003). Inicialmente isolada de corações de rato, uma população de células c-Kit+, com as mesmas características, foi isolada do coração adulto humano (BEARZI *et al.*, 2007). Os resultados promissores demonstrados por estes trabalhos geraram uma série de outros estudos e, inclusive, ensaios clínicos (ensaio clinico de fase I: *Cardiac Stem cells In Patients with Ischaemic cardiomyopathy* [SCIPIO])(BOLLI *et al.*, 2011; CHUGH *et al.*, 2012). Porém, atualmente, há muita controvérsia sobre a real função destas células. Van Berlo e colaboradores, em 2014, e Sultana e colaboradores, em 2015, demonstraram que as células c-Kit positivas contribuem muito pouco para a geração de novos cardiomiócitos no coração, sendo, na verdade, capazes apenas de gerar células endoteliais (BERLO, VAN *et al.*, 2014; SULTANA *et al.*, 2015). Apesar disso, ainda existem estudos utilizando esse marcador para isolar células-tronco cardíacas, porém, mostrando que muitos dos efeitos observados podem ser relacionados à sinalização parácrina induzida por fatores secretados por estas células (KEITH e BOLLI, 2015; SHARMA *et al.*, 2017) e não à diferenciação direta destes supostos progenitores cardiomiogênicos.

Além do c-Kit, também já foram utilizados outros marcadores de superfície (Sca-1, Abcg-2, Flk-1) e fatores de transcrição (Isl1, Nkx2.5) para isolamento e caracterização de outras populações de células progenitoras cardíacas. Em todos os casos, foi demonstrado a capacidade de autorenovação e a multipotencialidade destas células *in vivo* e *in vitro*, porém, o exato papel destes progenitores ainda precisa ser elucidado (revisado por BOLLINI e SMART e RILEY, 2011; LE e CHONG, 2016; SANTINI *et al.*, 2016). Por exemplo, embora o Isl1 seja um marcador de progenitor cardiovascular durante o desenvolvimento, novas evidências sugerem que este não é um marcador de progenitor cardíaco no coração adulto (WEINBERGER *et al.*, 2012).

Outra população de progenitores que vem sendo pesquisada é derivada de cardioesferas, as quais são formadas por uma mistura de vários tipos celulares isolados do coração e que são cultivadas em suspensão (DAVIS *et al.*, 2009; MESSINA *et al.*, 2004). Embora inicialmente tenha sido relatado a capacidade de proliferação e diferenciação destas células, outros trabalhos mostram que elas não têm a capacidade de se diferenciar (ANDERSEN *et al.*, 2009), assim como há controvérsia sobre os efeitos regenerativos destas células *in vivo* após lesão cardíaca (JOHNSTON *et al.*, 2009; KASAI-BRUNSWICK *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2009).

Então, é possível perceber que inúmeros grupos têm identificado populações de células progenitoras cardíacas diferentes, dependendo da forma de isolamento e marcadores utilizados. Ainda assim, apesar de todas as contradições, há grupos de pesquisa que continuam trabalhando para identificar progenitores no coração adulto, seja através da utilização de outros marcadores (ZHANG *et al.*, 2015) ou do isolamento de células de outras regiões do coração (SMITS e DRONKERS e GOUMANS, 2017).

Essas investigações provocam a discussão de outro tópico polêmico, relativo a capacidade de regeneração do coração, principalmente no que se refere a proliferação de cardiomiócitos. Em 2009, Bergmann e colaboradores demonstraram que os cardiomiócitos proliferam, apesar das taxas muito baixas ( $\leq 1\%$ ). Além disso, os pesquisadores demonstraram que menos de 50% dos cardiomiócitos do coração é substituído durante a vida (BERGMANN *et al.*, 2009). Entretanto, em 2013 outro grupo de pesquisa relatou que a quantidade de cardiomiócitos aumenta até 3,4 vezes ao longo dos primeiros 20 anos de vida, sendo que as taxas de citocinese de cardiomiócitos são maiores na infância, diminuindo a níveis muito baixos aos 20 anos e sendo quase indetectáveis após esta idade (MOLLOVA *et al.*, 2013). No entanto,

em 2015, um novo estudo mostrou que a quantidade de cardiomiócitos é estabelecida no período perinatal e se mantêm estável ao longo da vida, sendo que há um aumento importante na quantidade de células endoteliais e mesenquimais (consideradas fibroblastos, pericitos e células de músculo liso) (BERGMANN *et al.*, 2015). Apesar dessas divergências, pode-se perceber que, de forma geral, a taxa de proliferação de cardiomiócitos é baixa, se tornando ainda menor na idade adulta e na velhice.

No entanto, estudos já relataram que através da manipulação de moléculas de sinalização é possível estimular a proliferação de cardiomiócitos adultos, embora o processo deva ser controlado para não gerar um estímulo exagerado e, conseqüentemente, uma hipertrofia do músculo cardíaco (revisado por YUTZEY, 2017). Além disso, Patterson e colaboradores recentemente identificaram uma população de cardiomiócitos diploides mononucleares que tem a capacidade de proliferar, porém a frequência dessas células varia muito entre indivíduos, sugerindo que potencial de recuperação maior ou menor está relacionado a quantidade destas células e as características individuais (PATTERSON *et al.*, 2017).

Portanto, considerando as informações já citadas, é coerente considerar que existem células no coração que podem desempenhar um papel de extrema importância para o reparo ou regeneração deste órgão ao longo da vida, como as células-tronco do próprio coração ou vindas de outras regiões.

## 1.2 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são definidas como uma população celular com capacidade de se autorrenovar e diferenciar em vários tipos celulares específicos, sendo muito estudadas no campo da terapia regenerativa. Elas podem ser classificadas de acordo com seu tecido de origem ou com seu potencial de diferenciação. Com relação ao tecido de origem, as células-tronco podem ser de origem embrionária ou obtidas do tecido adulto (figura 1.3). Já com relação ao potencial de diferenciação, existem: as células-tronco totipotentes, as quais tem capacidade de gerar todas as células do organismo, inclusive anexos embrionários (placenta, saco vitelínico, âmnio, cório e alantóide); as células-tronco pluripotentes, as quais podem gerar as células dos três folhetos embrionários (ecto, endo e mesoderme), porém não os anexos embrionários; e as células-tronco multipotentes com capacidade limitada de diferenciação, restrita as células referentes ao seu folheto de origem, podendo ter características unipotentes, ou seja, com a capacidade de gerar apenas um tipo de célula (figura 1.3).

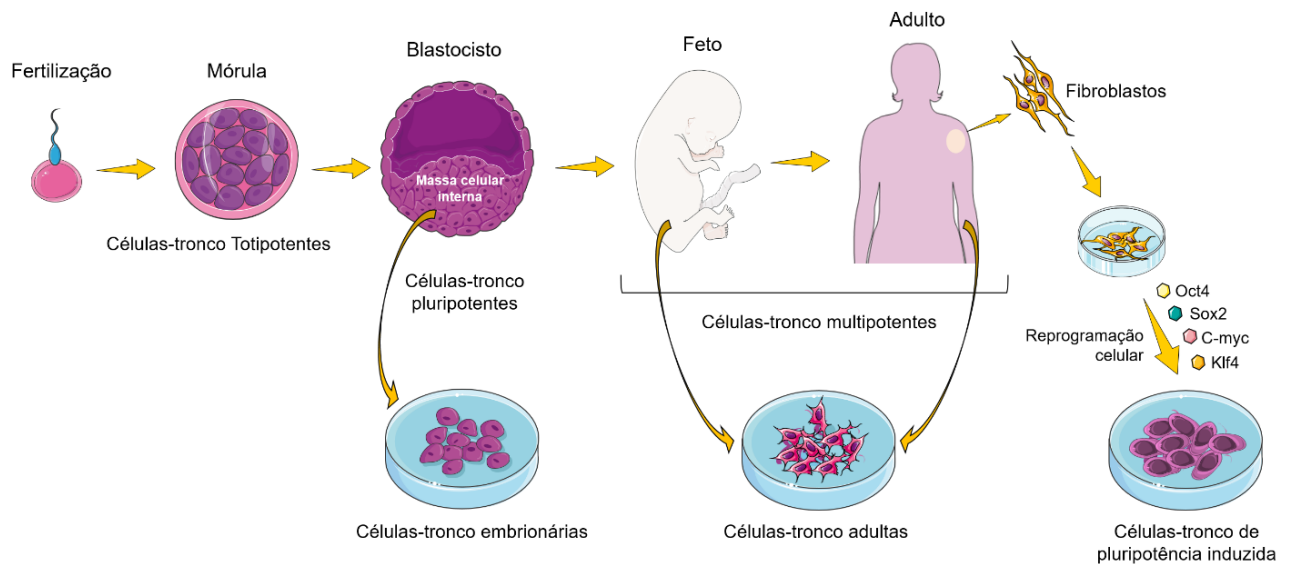


Figura 1.3: Tipos de células-tronco. O esquema representa momentos durante o desenvolvimento (da fertilização até o indivíduo adulto) e os tipos de células-tronco encontrados.

Para montagem desta figura foi utilizado o acervo de imagens disponibilizado pela *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>; Servier, Suresnes, França).

### 1.2.1 Células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais

As células-tronco adultas podem ser isoladas de tecidos adultos ou de embriões, em estágio avançado de desenvolvimento, e têm capacidade limitada de diferenciação, ou seja, são células multipotentes. Acredita-se que elas estejam presentes em todos os tecidos do corpo, tendo a função de regular a homeostase tecidual. Isto ocorre através do balanço da autorrenovação, o qual mantém uma quantidade mínima de células-tronco residentes no tecido, e da diferenciação, que regenera pequenos danos ou renova as células especializadas do tecido de origem (BITEAU e HOCHMUTH e JASPER, 2011; SIMONS e CLEVERS, 2011).

Existem vários tipos de células-tronco adultas, porém, neste trabalho nos concentraremos, nas células-tronco mesenquimais (CTMs), ou células-tronco estromais mesenquimais. Esta denominação foi estabelecida em 1991 (CAPLAN, 1991), fazendo referência às células inicialmente descritas por Friedenstein e colaboradores nos anos 1970 – 1980. Estes, ao estudarem as células da medula óssea, observaram que, além da população de células-tronco hematopoiéticas (que dão origem as células do sangue), também havia uma população com a capacidade de aderir ao plástico de cultivo, que possuía aspecto fibroblastóide e capacidade de



se diferenciar em osteoblastos (FRIEDENSTEIN e CHAILAKHJAN e LALYKINA, 1970).

Em 2006, Dominici e colaboradores descreveram alguns requisitos básicos para caracterizar as CTMs. São eles: (1) ser aderente ao plástico de cultivo, (2) ter aparência fibroblastóide, (3) ser capaz de se diferenciar em osteócitos, adipócitos e condrócitos *in vitro* e (4) apresentar uma série de marcadores de superfície (CD105, CD73, CD90) assim como não expressar outro conjunto de marcadores (CD45, CD34, CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 $\alpha$  e HLA-DR) (DOMINICI *et al.*, 2006). Atualmente, as CTMs já foram isoladas de muitos tecidos como cordão umbilical (sangue e tecido do cordão - geleia de Wharton), placenta, sangue menstrual, tecido adiposo, polpa de dente, entre outros (KERN *et al.*, 2006; PATEL *et al.*, 2008; PERRY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2004).

É importante notar que as condições em que estas células são cultivadas influencia o seu comportamento e o seu potencial de diferenciação. Por exemplo, a diferenciação osteogênica envolve a adição de uma série de fatores como ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerolfosfato no meio de cultivo, que são mantidos por até 3 semanas. Ao final do processo é observada a mineralização da matriz e a expressão de marcadores clássicos de osteócitos. Porém, estes estímulos não mimetizariam os sinais fisiológicos que ocorrem *in vivo* (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007). Além disso, já foi relatado que o cultivo pode influenciar a diferenciação das células-tronco isoladas, diminuindo ou aumentando seu potencial (tornando-as bi- ou tri-potentes) (SHOSHANI *et al.*, 2014). Juntamente com esses fatos, uma série de trabalhos prévios mostra que, sob estímulos específicos, as CTMs podem se diferenciar em células de outras linhagens que não as de origem mesodermal, processo chamado de transdiferenciação, apesar da baixa eficiência (MARTIN-RENDON *et al.*, 2008; PHINNEY e PROCKOP, 2007; RAYNAUD *et al.*, 2013) (figura 1.4A).

Com estas características, as CTMs apresentam um grande potencial para a terapia regenerativa. Já existem inúmeros ensaios clínicos utilizando CTMs no tratamento de condições patológicas como infarto, diabetes tipo I, dano na medula espinhal, entre outros (<https://clinicaltrials.gov>). Ainda que as CTMs possam se diferenciar, foi relatado que poucas células permanecem ou migram para o local da lesão. Assim, atualmente, acredita-se que o principal mecanismo de ação destas células seja através de seu efeito imunomodulador e da secreção de fatores tróficos que promovem sinalização parácrina (revisado por CONTRERAS-KALLENS *et al.*, 2017; LAVOIE e ROSU-MYLES, 2013; PHINNEY e PROCKOP, 2007). Entretanto,

ainda que hajam vários trabalhos e inúmeros ensaios clínicos utilizando CTMs, ainda há muito o que pesquisar a respeito destas células, incluindo fatores e estímulos que auxiliem sua proliferação e diferenciação, não apenas *in vitro*, mas que estimulem *in vivo* as populações de células-tronco residentes de cada tecido.

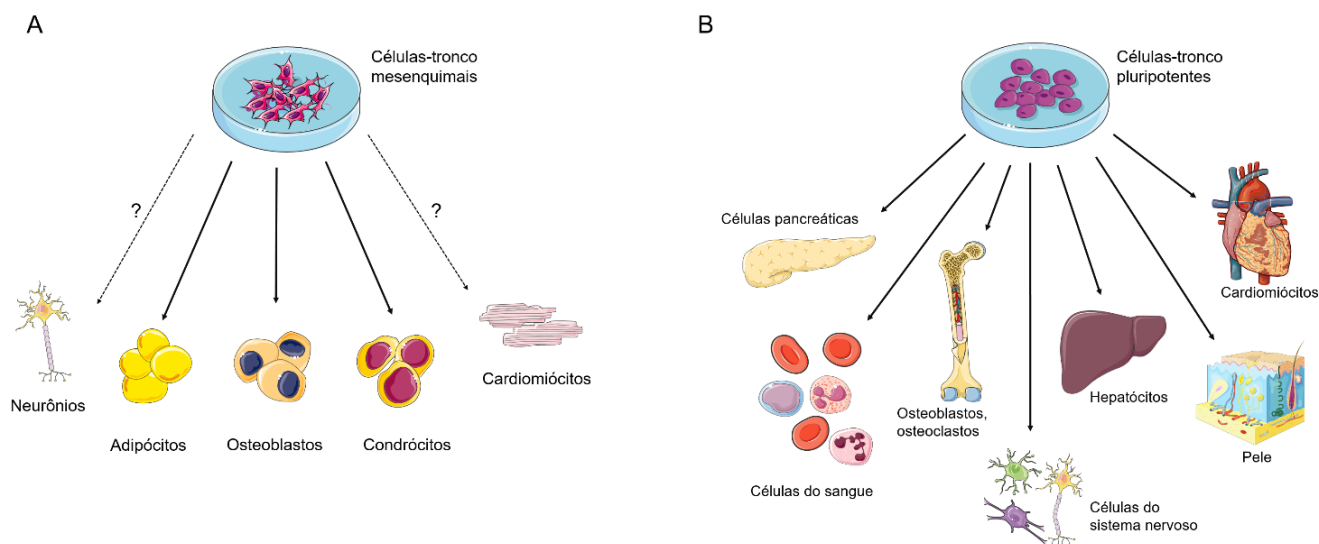


Figura 1.4: Potencial de diferenciação das células-tronco. A) Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais. A linha pontilhada indica a capacidade de transdiferenciação, embora controversa. B) Potencial de diferenciação das células-tronco pluripotentes (CTEs e iPSCs).

Para montagem desta figura foi utilizado o acervo de imagens disponibilizado pela *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>; Servier, Suresnes, França).

## 1.2.2 Células-tronco pluripotentes

Atualmente existem dois tipos de células-tronco pluripotentes: as células-tronco embrionárias (CTEs) e as células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs, do termo inglês *induced pluripotent stem cells*). Os estudos com células-tronco pluripotentes começaram com o isolamento de células de carcinoma embrionário murino e humano (revisado por YU e THOMSON, 2008), sendo apenas em 1981 isolada a primeira colônia de CTE murina (MARTIN, 1981). Devido as questões éticas envolvidas com o uso de embriões humanos, as CTEs humanas foram isoladas apenas em 1998 pelo grupo de Thomson e colaboradores (THOMSON *et al.*, 1998).

As CTEs são derivadas da massa celular interna do blastocisto, responsável por gerar todas as células do organismo (exceto anexos embrionários). Estas células têm condições de cultivo diferentes das estabelecidas para células-tronco adultas. Dentre outras exigências, elas precisam de uma camada alimentadora como suporte para se manterem, assim como fatores de crescimento específicos responsáveis pela manutenção do seu estado indiferenciado. Inicialmente, foi padronizado o uso de uma camada alimentadora orgânica composta de fibroblastos embrionários murinos inativados, associado a um meio de cultivo com fator de crescimento básico de fibroblasto (FGF2) (THOMSON *et al.*, 1998), porém atualmente também são utilizadas proteínas de matriz extracelular ou matrizes sintéticas (revisado por CHEN *et al.*, 2014; VILLA-DIAZ *et al.*, 2013). Como características essenciais para considerá-las pluripotentes, as células devem apresentar a expressão de fatores de transcrição como Oct4, Sox2, Klf4 e marcadores de superfície celular como SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, além de serem capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares (formação de teratoma *in vivo* e corpos embrióides *in vitro*) (THOMSON *et al.*, 1998).

Mais recentemente, surgiram as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), as quais são células adultas (somáticas) que foram reprogramadas com fatores de transcrição (ou outras moléculas) que as induzem a adquirir características de células-tronco pluripotentes, tornando-as semelhantes às CTEs. As primeiras iPSC foram geradas em 2006, a partir de fibroblastos murinos embrionários e adultos (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Em 2007, as iPSCs foram produzidas a partir de fibroblastos humanos (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Nestes trabalhos, o processo de geração das iPSCs foi feito através da introdução de genes de 4 fatores de transcrição relacionados a pluripotência, Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, por vetores retrovirais. Tendo em vista o potencial destas células, outros protocolos empregando formas diferentes de obtenção das iPSC já foram descritos, seja com o uso de fatores transcricionais diferentes (através de métodos integrativos ou não), proteínas, miRNAs, entre outros, cada qual apresentando eficiências diferentes (revisado por KULCENTY *et al.*, 2015; STADTFELD *et al.*, 2010). Essas células são caracterizadas pelos mesmos parâmetros das CTEs quanto a expressão de marcadores de pluripotência e o potencial de diferenciação.

As grandes vantagens das células-tronco pluripotentes são a capacidade de proliferação, que é teoricamente ilimitada, e a capacidade de dar origem a vários tipos celulares (figura 1.4B). Assim, estas células seriam uma opção na terapia celular, uma

vez que é possível gerar todos os tipos de células e, quando se trata das iPSCs, é possível que as células transplantadas sejam autólogas. Então, inúmeros trabalhos têm descrito protocolos para diferenciação destas células em uma variedade de tipos celulares como cardiomiócitos, neurônios, células pancreáticas, hepatócitos, células pulmonares entre outras (GUNHANLAR *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2014; KEMPF *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2013; MCGAUGH e NOSTRO, 2017; YAP *et al.*, 2015). Porém, apesar dos avanços, ainda são necessários mais estudos com o objetivo de tornar os protocolos de diferenciação celular mais eficientes, tanto a ponto de que 100% das células estejam terminalmente diferenciadas, evitando a formação de um teratoma no caso de uma terapia, quanto que as células estejam maduras e funcionais. Com relação a este último, estudos mostram que, por exemplo, os cardiomiócitos gerados a partir de células-tronco pluripotentes contraem espontaneamente e respondem a vários estímulos, porém apresentam características de cardiomiócitos imaturos e propriedades eletrofisiológicas fetais (revisado por ROBERTSON e TRAN e GEORGE, 2013; YANG e PABON e MURRY, 2014). Assim, alternativas vêm sendo pesquisadas na tentativa de gerar cardiomiócitos mais maduros e funcionalmente mais parecidos com as células cardíacas adultas (HERRON *et al.*, 2016; KOLANOWSKI e ANTOS e GUAN, 2017; SUN e NUNES, 2016; VUORENPÄÄ *et al.*, 2017).

Além da aplicação na medicina regenerativa (LI *et al.*, 2016), que ainda está sendo iniciada, estas células podem ser utilizadas para estudar melhor o desenvolvimento embrionário de cada uma das linhagens celulares, assim como serem alternativas para usos em ensaios toxicológicos de drogas (MAILLET *et al.*, 2017), na investigação de uma doença (revisado por SINGH *et al.*, 2015; SOCHACKI *et al.*, 2016) ou na avaliação da interação de vírus e patógenos em células diferenciadas (GARCEZ *et al.*, 2016).

Assim, as células-tronco tem grande potencial de uso tanto para estudos *in vitro* quanto para aplicações em terapias para regeneração de órgãos.

### 1.3 MEDICINA REGENERATIVA NO TRATAMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, tendo representado 31% das mortes globais em 2015. Dentre elas, duas são as principais causadoras de óbitos: as doenças coronarianas e o acidente vascular cerebral (World

Health Organization, WHO). Dentre as doenças que acometem o coração, destacamos o infarto agudo do miocárdio (IAM). O IAM é consequência da obstrução de uma artéria coronária (geralmente causada por placas ateroscleróticas), a qual ocasiona a interrupção do fluxo sanguíneo. Essa interrupção resulta na morte das células cardíacas, principalmente cardiomiócitos, e conseqüentemente causa necrose do tecido. Durante o processo de reparo tecidual, os fibroblastos cardíacos secretam sinais de estímulo a angiogênese e proteínas de matriz extracelular, formando um tecido fibroso no local do infarto (GUYTON e HALL, 2006; KUMAR e ABBAS e FAUSTO, 2005; SUTTON e SHARPE, 2000).

Com a perda de músculo cardíaco ocorre uma série de complicações, como arritmias e insuficiência cardíaca progressiva (KUMAR e ABBAS e FAUSTO, 2005) tendo esta última sido considerada uma epidemia emergente com taxa de sobrevivência, em média, 5 anos (BEHFAR *et al.*, 2014; CHRISTIANSEN *et al.*, 2017; ROGER, 2013). Embora existam tratamentos farmacológicos para melhorar a qualidade de vida do paciente, até o presente momento não há nenhuma terapia eficiente (exceto o transplante de órgão) que restaure completamente a função do músculo cardíaco. Assim, a busca por novas formas de tratamento continua. Neste contexto surge a medicina regenerativa.

O objetivo da medicina regenerativa é curar ou substituir tecidos ou órgãos danificados, devido a algum trauma, doença, idade ou defeito congênito, de forma a ter, no final, um tecido funcional. Para isso, várias são as estratégias que vem sendo pesquisadas, incluindo o uso de novas células, biomateriais, proteínas ou a combinação de várias destas alternativas (MAO e MOONEY, 2015). No caso do tratamento de doenças cardiovasculares, muitos avanços foram obtidos na terapia celular com o uso de células-tronco (ou populações celulares heterogêneas contendo células-tronco) para recuperar o tecido lesionado.

O uso de células-tronco multipotentes para o tratamento de doenças cardiovasculares, principalmente IAM e insuficiência cardíaca, vem sendo pesquisado há mais de uma década (BEHFAR *et al.*, 2014). Ensaios clínicos iniciais utilizaram células mononucleares derivadas da medula óssea. Diversos estudos foram realizados aplicando as células em diferentes momentos após o infarto ou com o quadro de insuficiência já instalado há algum tempo, com o uso de quantidades diferentes de células e diferentes formas de avaliar a melhora após o tratamento. Assim, enquanto alguns estudos mostram que o tratamento com células da medula óssea melhora a condição do paciente, outros dizem que não há diferença em relação

ao placebo (revisado por BEHFAR *et al.*, 2014; CAMBRIA *et al.*, 2017; SEGERS e LEE, 2008). Na busca por tratamentos mais efetivos, populações mais puras de células-tronco mesenquimais (da medula óssea e tecido adiposo) foram utilizadas. Ensaios pré-clínicos e clínicos mostram que estas células têm potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares, porém ainda são necessários mais estudos (revisado por CHOI e KURTZ e STAMM, 2011; KARANTALIS e HARE, 2016; NGUYEN e RHEE e WU, 2016; THAKKER e YANG, 2014).

De forma geral, todos estes ensaios e estudos mostram a segurança no uso de células-tronco em terapias do sistema cardiovascular, embora os resultados de eficiência sejam modestos e controversos. Além disso, o mecanismo de ação destas células no tecido lesionado ainda tem que ser esclarecido, embora acredite-se que o efeito regenerador observado se deve a atividade parácrina (estímulo das células do tecido) e imunomodulatória das células-tronco, sendo pouco representado pela diferenciação celular em si (BEHFAR *et al.*, 2014; KARANTALIS e HARE, 2016; NGUYEN e RHEE e WU, 2016).

O tratamento com estes tipos celulares é considerado como a primeira geração da terapia celular. Já a chamada segunda geração utiliza células derivadas ou diferenciadas em tipos celulares específicos do “tecido-alvo” (revisado por BEHFAR *et al.*, 2014; CAMBRIA *et al.*, 2017). Com este objetivo, estudos já utilizaram CTMs expostas a fatores de crescimento que induzem a expressão de genes cardíacos por estas células (BARTUNEK *et al.*, 2013, 2017; revisado por BEHFAR *et al.*, 2014). Outra população de interesse são as células progenitoras cardíacas isoladas do coração, apesar desta população não estar bem caracterizada, como previamente descrito. Células c-kit+, células derivadas de cardioesferas e estas associadas com FGF2 já foram utilizadas em ensaios clínicos (BOLLI *et al.*, 2011; MALLIARAS *et al.*, 2014; revisado por BEHFAR *et al.*, 2014; CAMBRIA *et al.*, 2017; YACOUB e TERROVITIS, 2013). Com boas perspectivas, novos estudos iniciaram-se e, atualmente, há ensaios clínicos em andamento, por exemplo, para o tratamento de insuficiência cardíaca associando células c-kit+ e CTMs (*clinical trial* id: NCT02501811) e o uso de células derivadas de cardioesferas para tratamento de cardiomiopatia dilatada pediátrica (*clinical trial* id NCT03129568).

Ainda dentro desta perspectiva, avanços na área de células-tronco pluripotentes levantaram a possibilidade de diferenciar estas células em cardiomiócitos ou progenitores cardíacos e utilizá-los na terapia. Recentemente, foi aprovado um ensaio clínico usando células progenitoras cardíacas (CD15+ e Isl1+)

derivadas de CTEs associadas com um gel de fibrina (*clinical trial* id: NCT02057900). Resultados iniciais mostram efeito positivo após 3 meses de tratamento, em um paciente, sem formação de tumor e com melhora na função do coração (MENASCHE *et al.*, 2015). Porém é preciso avançar com o estudo para então definir a segurança e os possíveis efeitos desta terapia.

Como já foi considerado, possivelmente, muitas das ações das células implantadas no local da lesão podem promover seu efeito através da secreção de fatores no local. Isso nos leva ao que pode ser chamado de terceira geração da terapia celular, que considera o uso de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, matrizes biológicas ou sintéticas, microvesículas e exossomos, entre outros, associados ou não com células, no tratamento de doenças (revisado por CAMBRIA *et al.*, 2017).

Trabalhos com o secretoma (conjunto de moléculas secretadas por células ou tecidos) de CTMs, por exemplo, já mostraram que, independentemente de sua associação com células, sua aplicação no tecido lesionado é capaz de induzir melhora na função do coração após injúria (HE *et al.*, 2015; TIMMERS *et al.*, 2008, 2011). Abordagens também já foram realizadas utilizando micropartículas contendo o meio condicionado de CTMs ou células-tronco cardíacas e fragmentos de suas respectivas membranas celulares (“células-tronco sintética”). Após injetadas, estas micropartículas melhoraram a função cardíaca após lesão (LUO *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2017). Assim, estes estudos mostram que fatores secretados pelas células promovem a recuperação do tecido lesionado. Mais recentemente, este efeito também foi relacionado às microvesículas e exossomos secretados por diferentes tipos celulares (CTMs, CTEs, células-tronco cardíacas). Estas vesículas extracelulares mostram-se capazes de melhorar a função cardíaca após infarto, possivelmente reduzindo a inflamação, diminuindo apoptose e promovendo angiogênese (ARSLAN *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2010; TENG *et al.*, 2015).

Dentre as formas de tratamento com biomateriais podemos destacar o uso de *patches* cardíacos ou biomaterias injetáveis, como hidrogéis, os quais podem ou não estar associados com células ou outras moléculas (revisado por RANE e CHRISTMAN, 2011). Vários tipos de materiais já foram usados, tanto sintéticos como naturais e, inclusive, tecido cardíaco descelularizado (revisado por REIS *et al.*, 2016; SALUDAS *et al.*, 2017; WANG, R. M. e CHRISTMAN, 2016), os quais mostram-se promissores no tratamento de problemas cardíacos. Atualmente, esta abordagem está

evoluindo com o uso de “bioimpressoras” 3D (JANG *et al.*, 2017; VUKICEVIC *et al.*, 2017).

Então, podemos observar que existem inúmeros esforços para encontrar novos tratamentos para as doenças cardiovasculares. Porém, é preciso avançar no entendimento das sinalizações celulares que ocorrem no próprio órgão, assim como das células que são implantadas na região. As sinalizações contêm informações importantes para entender a modulação do microambiente tecidual e as possíveis respostas de reparo e/ou regeneração tecidual. Até porque, embora a terapia com implante de células ainda seja o mais estudado, podemos perceber um progresso nas áreas de desenvolvimento de abordagens livres de células.

#### 1.4 MICROAMBIENTE TECIDUAL

Como previamente comentado, as células-tronco adultas estão presentes em vários tecidos do corpo e tem como função principal manter a homeostase do tecido. A sobrevivência, proliferação e diferenciação destas células é regulada pelo microambiente em que estão inseridas, o qual é conhecido como nicho de células-tronco. Então, o nicho pode ser definido como uma estrutura anatômica, a qual inclui componentes celulares e acelulares, que integra fatores locais e sistêmicos para regular o comportamento das células-tronco (DISCHER e MOONEY e ZANDSTRA, 2009; JONES e WAGERS, 2008) (figura 1.5).

Desde sua primeira descrição em 1978, o conceito de nicho foi expandido e inclui uma série de componentes, entre os quais: a própria célula-tronco; células estromais do tecido, as quais interagem diretamente com a célula-tronco, e entre si, através de receptores de superfície celular, junções gap e fatores solúveis; proteínas de matriz extracelular (MEC) que fornecem estrutura, organização e sinais mecânicos ao nicho; os vasos sanguíneos, que transportam sinais sistêmicos e fornecem um canal para o recrutamento de outras células (por exemplo, células do sistema imune); estímulos neurais e concentração de oxigênio (FERRARO e CELSO e SCADDEN, 2010; JONES e WAGERS, 2008; KRAUSE e SCADDEN, 2012; LANE e WILLIAMS e WATT, 2014).

Dentro destes nichos a forma como as células-tronco sinalizam depende de vários fatores, dentre os quais a sua posição no tecido, a arquitetura deste e o tipo do sinal transmitido. Em um tecido estável, as células-tronco permanecem localizadas na mesma posição e sofrem estímulos contínuos, como por exemplo, as células-tronco



intestinais nas criptas intestinais. Por outro lado, há tecidos em que a estrutura sofre mudanças temporais, como o folículo piloso, e, embora não altere a localização principal das células-tronco, a sinalização do ambiente também é regulada por estas mudanças. Outro exemplo de estrutura de nicho é aquele do sistema hematopoiético, uma vez que este é fluído e as células-tronco hematopoiéticas tem nichos em múltiplas posições (remetendo a especificação no período embrionário) (revisado por XIN e GRECO e MYUNG, 2016).

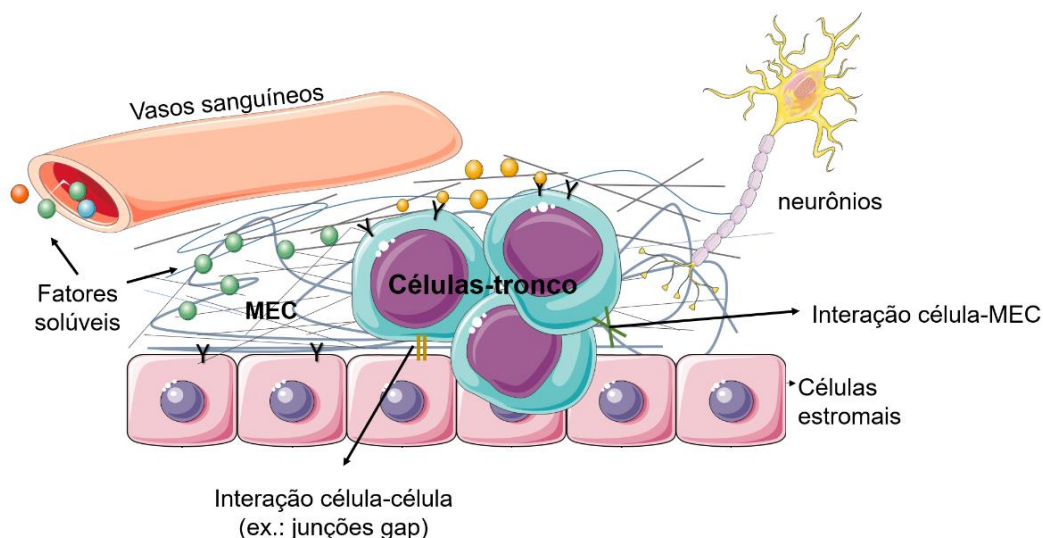


Figura 1.5: Esquema do nicho de células-tronco.

Para montagem desta figura foi utilizado o acervo de imagens disponibilizado pela *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>; Servier, Suresnes, França).

Além disso, os sinais no nicho podem ser transmitidos de diferentes formas, dentre as quais destacamos a difusão livre da molécula sinalizadora, a interação entre MEC e os fatores solúveis e forças mecânicas e físicas, como a rigidez da MEC, que também podem influenciar no comportamento celular (revisado por LANE e WILLIAMS e WATT, 2014; XIN e GRECO e MYUNG, 2016).

Dentre as moléculas sinalizadoras, temos os fatores solúveis, os quais envolvem fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas entre outros. Além disso, atualmente sabe-se que as células também secretam microvesículas e exossomos que transportam proteínas, miRNA, mRNAs, lipídeos, também auxiliando na comunicação entre as células (revisado por CAMUSSI *et al.*, 2010; NAWAZ *et al.*, 2016). Estes fatores secretados podem agir localmente ou podem se difundir pelo nicho, podendo gerar um gradiente de concentração ao longo das células-tronco e da sua progênie, estimulando, por exemplo, a divisão assimétrica (revisado por JONES

e WAGERS, 2008; XIN e GRECO e MYUNG, 2016). Além disso, os fatores de crescimento podem interagir com diferentes proteínas de MEC, sugerindo que esta pode auxiliar na integração de diferentes tipos de sinais em um microambiente, controlando a liberação dos fatores e, também, facilitando a conexão com integrinas e receptores transmembrana (revisado por BRIZZI e TARONE e DEFILIPPI, 2012; GATTAZZO e URCIUOLO e BONALDO, 2014).

A MEC é composta por uma rede complexa de proteínas fibrilares, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteoglicanos, organizados de forma específica dependendo do tecido. Além de serem responsáveis por manter a estrutura tecidual também influenciam a proliferação, crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação celular. A matriz fornece sinais não apenas através de suas proteínas específicas, mas também pelas suas características mecânicas (por exemplo, rigidez e elasticidade) e pela sua capacidade de funcionar como um reservatório de fatores de crescimento ou outras moléculas (HANSEN *et al.*, 2015; HYNES e NABA, 2012; YUE, 2014).

As propriedades mecânicas da MEC, como rigidez e elasticidade, são em parte reguladas pela organização e composição, mas também pelas condições fisiológicas do tecido (idade, doenças ou lesão) (GATTAZZO e URCIUOLO e BONALDO, 2014). Neste aspecto, trabalhos relatam o uso de matrizes com diferentes níveis de rigidez no estímulo a diferenciação de células-tronco. Matrizes mais ou menos rígidas podem estimular as CTMs a diferenciação osteogênica ou adipogênica, por exemplo (ZHANG *et al.*, 2017; revisado por ANDERSON *et al.*, 2016). Além disso também foi demonstrado que cardiomiócitos embrionários contraem melhor em uma matriz com a elasticidade similar a do coração saudável, enquanto que em matrizes mais rígidas o batimento diminui (ENGLER *et al.*, 2008).

Tendo em vista a importância do nicho celular e a dificuldade em obter informações destes *in vivo*, muitas abordagens vêm tentando mimetizar as condições do nicho *in vitro*, para auxiliar tanto no entendimento e caracterização destes nichos quanto para avaliar sua relação com as células-tronco. Fatores de crescimento, pequenas moléculas, hormônios, lipídeos e outras proteínas já são utilizados em vários protocolos de diferenciação das células-tronco, em vários tipos celulares, como adipócitos, osteócitos, hepatócitos, cardiomiócitos e outros (CASTRÉN *et al.*, 2015; KATTMAN *et al.*, 2011; MALLANNA e DUNCAN, 2013; SCOTT *et al.*, 2011). Com relação a MEC, vários trabalhos têm utilizado biomateriais na tentativa de mimetizar o nicho (revisado por CUTTS e NIKKHAH e BRAFMAN, 2015; NELSON e ROY, 2016;

SHARMA, M. B. e LIMAYE e KALE, 2012), assim como avanços vem sendo obtidos com o uso do próprio tecido ou órgão descelularizado. Esta técnica visa a retirada das células do órgão, mantendo preservada a estrutura e a composição da MEC (revisado por CRAPO e GILBERT e BADYLAK, 2011; KEANE e SWINEHART e BADYLAK, 2015).

Considerando que temos células-tronco em todos os tecidos, também temos um nicho de células-tronco em cada um destes órgãos. Atualmente, os nichos mais caracterizados são o da medula óssea, das criptas intestinais, do folículo piloso e do sistema nervoso (revisado por GATTAZZO e URCIUOLO e BONALDO, 2014; LI, L. e XIE, 2005; REZZA e SENNETT e RENDL, 2014). Assim, apesar dos recentes avanços, ainda são necessários mais estudos para aprofundar o entendimento dos diferentes microambientes, particularmente em relação ao nicho cardíaco.

#### **1.4.1 Nicho tecidual cardíaco**

O nicho cardiogênico é altamente dinâmico, apresentando diferentes funcionalidades e características de acordo com o estágio de desenvolvimento do coração e seu estado fisiológico (saudável versus patológico). Durante os estágios iniciais do desenvolvimento, os fatores no nicho cardíaco desempenham papéis relacionados, principalmente, com a expansão e especificação celular, controlando o tamanho e forma das estruturas cardíacas. Posteriormente, os fatores do nicho cardíaco estimulam a finalização da diferenciação e maturação das células cardíacas (revisado por CHRISTALLA e HUDSON e ZIMMERMANN, 2011).

Quando nos referimos ao nicho durante o desenvolvimento embrionário, vários fatores, vias de sinalização e moléculas cardiogênicas já foram descritas (NOSEDA *et al.*, 2011), assim como relatado previamente, porém os estudos continuam na busca para entender a comunicação entre as células durante o comprometimento a linhagem cardíaca. Já quando nos referimos ao nicho cardíaco adulto, devemos lembrar que o coração é composto de cardiomiócitos e células não miocíticas, como fibroblastos, células endoteliais, células de músculo liso, neurônios, células do sistema imune e, mais recentemente descobertas, as células-tronco ou progenitoras cardíacas (CHRISTALLA e HUDSON e ZIMMERMANN, 2011; FOUNTOULAKI e DAGRES, 2015; KOFRON e MENDE, 2017; LERI *et al.*, 2014; TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010). Em conjunto, todas estas células formam o nicho cardíaco (figura 1.6).

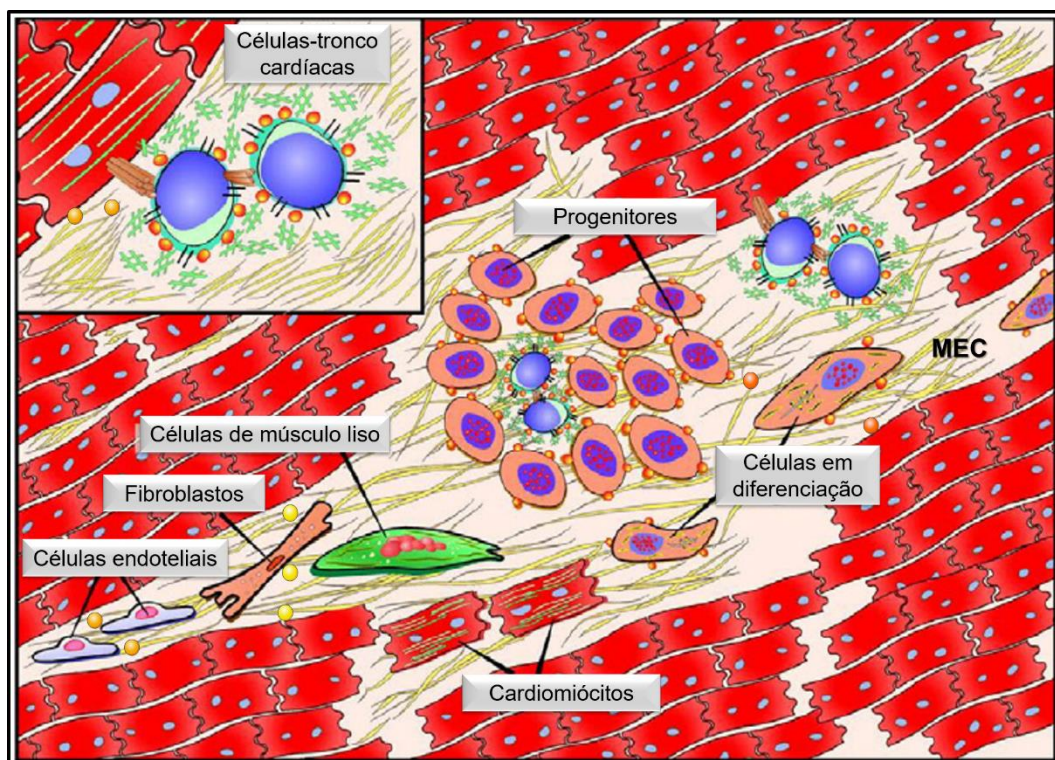


Figura 1.6: Representação dos componentes do nicho cardíaco.

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

Esses diferentes tipos celulares não estão isolados uns dos outros no coração, mas, ao contrário, interagem tanto fisicamente quanto através de uma variedade de fatores solúveis. A comunicação entre essas células é mediada através da liberação de fatores autócrinos e parácrinos (como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e outros), interações célula-célula ou célula-MEC (revisado por CHRISTALLA e HUDSON e ZIMMERMANN, 2011; FOUNTOULAKI e DAGRES, 2015; TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010) (figura 1.7).

Por exemplo, os cardiomiócitos: em condições normais (não patológicas), acredita-se que praticamente todos eles estejam em contato com um ou mais fibroblastos cardíacos e com pelo menos um capilar em sua proximidade. Porém, em condições patológicas a quantidade de células pode ser alterada. Por exemplo, no IAM, ocorre a morte de cardiomiócitos e células endoteliais e há um aumento do número de fibroblastos e de células do sistema imune. Essas alterações, conseqüentemente, geram mudanças na comunicação celular e no microambiente cardíaco (revisado por FOUNTOULAKI e DAGRES, 2015; TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010).

Além disso, os cardiomiócitos secretam uma série de fatores que podem ter papel tanto autócrino quanto parácrino. Dentre algumas moléculas secretadas estão

a leptina, membros da família TGF e FGF, endotelina-1 (ET1), fator de crescimento de hepatócito, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína quimiotraente de monócitos 1 (MCP-1) e outros. Outras formas de comunicação cardiomiócito-cardiomiócito, ou entre outras células, são através de junções gap e de complexos de adesão (célula-célula ou célula-MEC) (TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010). Dentre as junções gap, os membros da família conexina são os mais relacionados com o desenvolvimento do coração, com destaque para a conexina 43, uma vez que a deleção desta em cardiomiócitos leva a letalidade (ECKARDT *et al.*, 2006).

Outro fator importante secretado por cardiomiócitos é o VEGF-A. A deleção deste gene nos cardiomiócitos resulta no desenvolvimento de corações com paredes finas e com menos microvasos coronários. Além disso, foi demonstrado que apesar dos cardiomiócitos representarem menos de um terço de todas as células do coração, com a deleção do VEGF apenas nestas células há diminuição dos níveis de RNAm do VEGF de todo o órgão para menos de 15% do valor normal (GIORDANO *et al.*, 2001). Assim, sugere-se que os cardiomiócitos são as principais células secretoras de VEGF e que a ausência deste interfere na formação de vasos sanguíneos (coronárias).

As células do endotélio, por sua vez, secretam fatores como angiopoietina II, FGF, VEGF, receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB), ET1, óxido nítrico (NO), neuroregulina-1 entre outros, os quais podem afetar funções vasculares e do miocárdio (TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010). É importante destacar que o endotélio tem importante papel na regulação do tamanho do coração. Em casos de hipertrofia ou aumento do coração este deve ser acompanhado da angiogênese, para que o músculo tenha a oxigenação adequada. Além disso, o próprio estímulo de aumento da vasculatura do coração induz o processo de hipertrofia (TIRZIU e SIMONS, 2009; WALSH e SHIOJIMA, 2007).

Até pouco tempo consideradas as células em maior quantidade no coração (BANERJEE *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2016), os fibroblastos cardíacos são os principais responsáveis pela produção das proteínas de MEC, incluindo a fibronectina, laminina, colágenos, metaloproteinases (MMPs) e inibidores de metaloproteinases do tecido (TIMPs), tanto no interstício do órgão quanto ao redor dos vasos. Vários são os fatores que podem afetar a ativação dos fibroblastos, incluindo resposta a uma lesão. Neste caso, os fibroblastos podem se diferenciar em miofibroblastos, os quais tem capacidade proliferativa e secretória aumentada. O aumento no número de fibroblastos e/ou na deposição de proteínas de MEC, causa fibrose e, conseqüentemente, altera

a rigidez do tecido, a interação entre as células, prejudica a contratilidade, oxigenação e metabolismo dos miócitos (FOUNTOULAKI e DAGRES, 2015; MARTIN, M. L. e BLAXALL, 2012; TIRZIU e GIORDANO e SIMONS, 2010), ou seja, altera por completo o microambiente.

Além de produtores de MEC, os fibroblastos também secretam várias proteínas relacionadas com o desenvolvimento de cardiomiócitos, como FGFs, TGF, angiotensina II e interleucinas, como a interleucina 6 (IL6) e a interleucina 33 (IL33) (revisado por KAKKAR e LEE, 2010; TAKEDA e MANABE, 2011). A IL6 pode ter tanto um papel cardioprotetor quanto pode agravar o caso de uma lesão pós IAM; o efeito vai depender do tempo em que a proteína estará presente (revisado por FONTES e ROSE e CIHÁKOVÁ, 2015). Ainda, dentre os membros da família da IL6, destaca-se o fator inibidor de leucemia (LIF) e a cardiotrofina 1 (CT-1) que são secretados pelos fibroblastos e pelos miócitos. Ambos estimulam a hipertrofia dos cardiomiócitos, porém LIF inibe a transição para miofibroblasto, enquanto que CT-1 estimula a proliferação dos fibroblastos (KUWAHARA *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002). Por outro lado, a IL33, na presença de estímulos hipertróficos, reduz a hipertrofia e fibrose, além de melhorar a função cardíaca após infarto (SANADA *et al.*, 2007).

Buscando outras formas de entender o papel de fibroblastos cardíacos em condições normais e patológicas, o grupo de Cosme, em 2017, realizou uma ampla caracterização do secretoma destes fibroblastos em condições de normóxia (21% O<sub>2</sub>) e hipóxia (2% O<sub>2</sub>). O trabalho analisou o meio condicionado livre de exossomos e os exossomos isolados. Quase 500 proteínas apresentaram expressão diferencial entre as frações e condições de oxigênio (COSME *et al.*, 2017). Além deste, outros trabalhos também utilizam fibroblastos cardíacos e tratamentos com moléculas específicas, visando entender como elas alteram a secreção de fatores e como isso pode interferir na comunicação com outras células, como cardiomiócitos. Abonnenc e colaboradores, em 2013, avaliaram a secreção de matriz extracelular e outras proteínas em fibroblastos cardíacos de rato tratados com diferentes microRNAs: miR-29b e miR-30c. As principais diferenças foram visualizadas na condição de fibroblastos tratados com pré-miR-29b, no qual houve diminuição da secreção de proteínas, incluindo colágenos, metaloproteinase 2 (MMP2), fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1) e outras. Interessantemente, este meio condicionado influenciou o comportamento de cardiomiócitos de rato, por exemplo, diminuindo sua adesão (ABONNENC *et al.*, 2013). Outro exemplo, é o autoanticorpo contra o β1-adrenoreceptor que já foi encontrado no soro de pacientes com vários tipos de

doenças cardiovasculares, estando relacionado com diminuição da função cardíaca. O meio condicionado coletado de fibroblastos cardíacos cultivados com este autoanticorpo induz a apoptose em cardiomiócitos, indicando que esta condição altera a secreção de proteínas dos fibroblastos, contribuindo com a lesão cardíaca (LV *et al.*, 2016). Assim estes trabalhos mostram que as células modulam a secreção de proteínas dependendo dos estímulos que recebem ou das condições fisiológicas do órgão.

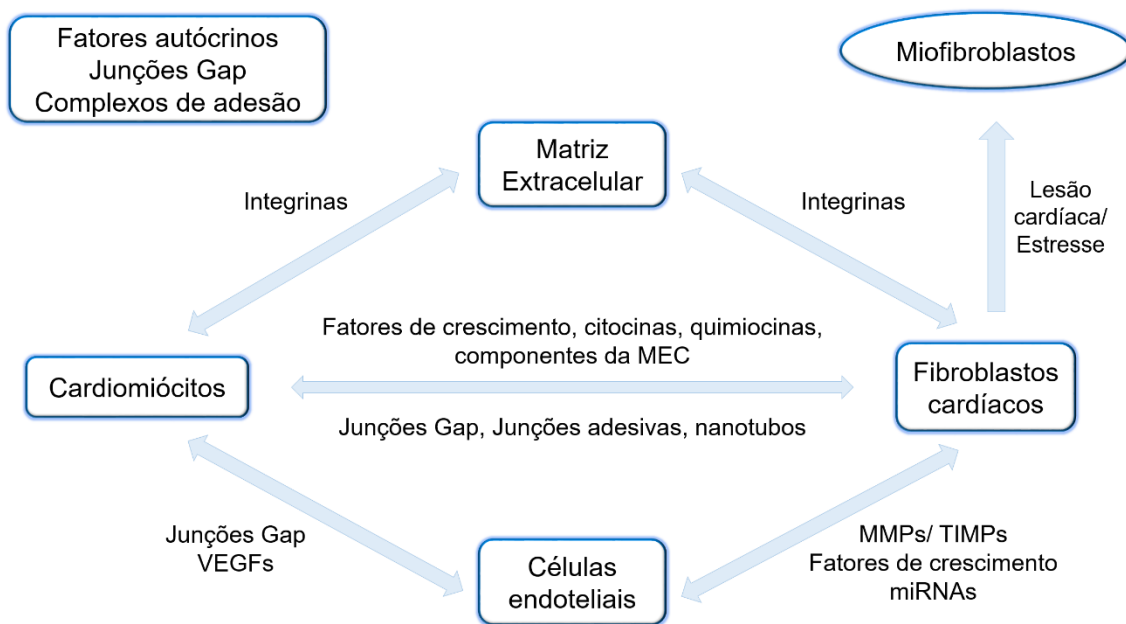


Figura 1.7: Esquema ilustrando vários mecanismos de comunicação intercelular no coração. MEC = matriz extracelular; MMP = metaloproteinases; TIMPs = inibidor tecidual de metaloproteinases.

FONTE: Adaptado de Fountoulaki *et al.*, 2015.

Outra das populações de células do coração que vem sendo muito pesquisada são as células-tronco ou progenitoras cardíacas. É possível encontrar na literatura trabalhos de pesquisa básica até ensaios clínicos com o uso destas células. Os resultados promissores indicam que o benefício proporcionado por estas células possivelmente deve-se mais a sua atividade parácrina do que especificamente a diferenciação celular (LE e CHONG, 2016). Assim, visando compreender melhor os mecanismos e como esta população de células, mesmo localmente, pode agir, alguns trabalhos utilizam seu secretoma para estudar as sinalizações celulares.

Em 2010, Stastna e colaboradores compararam o secretoma de células-tronco cardíacas (originadas de cardioesferas) com o de cardiomiócitos de ratos neonatos.

Foram identificadas 83 proteínas, a maioria sendo descrita como proteína de membrana ou secretada. 41 proteínas foram identificadas exclusivamente nos cardiomiócitos, dentre as quais estão o fator atrial natriurético e o fator de crescimento de tecido conectivo (STASTNA *et al.*, 2010). Em 2016, o grupo de Park estabeleceu uma linhagem de células-tronco cardíacas, as quais secretavam, principalmente, fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF $\beta$ 1, IGF1, IGF2, fator de crescimento de hepatócito (HGF), IL6 e MCP-1, sendo esta última a mais abundante. Além disso, o meio condicionado destas células contribuiu para aumentar a sobrevivência e diminuir a apoptose de cardiomiócitos submetidos a hipóxia *in vitro* (PARK *et al.*, 2016). Mais recentemente, Sharma e colaboradores, isolaram células-tronco cardíacas de humanos neonatos e adultos e compararam a composição e funcionalidade de seus respectivos meios condicionados. A ampla análise proteômica identificou várias proteínas nos MCs (entre 500-800) e nos exossomos, o que revelou diferenças na composição e no efeito do secretoma destas células obtidas em idades diferentes, indicando que durante o desenvolvimento as células mudam seu perfil de secreção (SHARMA *et al.*, 2017).

Além dos fatores solúveis, um componente essencial do nicho é a MEC. No caso do coração, ela é composta de várias proteínas, incluindo fibronectina, periostina, fibrilina, vários tipos diferentes de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos como versican, sindecan e biglican, e glicosaminoglicanos como heparan sulfato (revisado por LOCKHART *et al.*, 2011; RIENKS *et al.*, 2014). Outro componente não estrutural presente na MEC, as quais são importantes no desenvolvimento do coração e na sua resposta a lesão, são as proteínas matricelulares. Apesar de não terem função estrutural, interagem com receptores de superfície, fatores de crescimento, citocinas, proteases, com a própria MEC entre outras, atuando na integração dos sinais do microambiente. Dentre os membros deste grupo estão as trombospondinas, tenascinas, SPARC (proteína secretada ácida e rica em cisteína), osteopontina, periostina e membros da família CCN (revisado por FRANGOGIANNIS, 2012; RIENKS *et al.*, 2014; RIENKS e PAPAGEORGIU, 2016).

A maioria das proteínas matricelulares é altamente expressa no desenvolvimento embrionário, mas é encontrada em mínimas quantidades no coração adulto em condições normais; em caso de lesão cardíaca elas voltam a ser expressas em quantidades elevadas (revisado por FRANGOGIANNIS, 2012; RIENKS *et al.*, 2014; RIENKS e PAPAGEORGIU, 2016). Por exemplo, a tenascina-C é encontrada em baixas quantidades no coração adulto saudável, mas altas concentrações são



observadas em várias doenças cardiovasculares. Evidências sugerem que seu papel seja reduzir a inflamação local e contribuir com a elasticidade do tecido (IMANAKA-YOSHIDA e AOKI, 2014). Não só a tenascina-C, mas também as outras proteínas matricelulares parecem funcionar na resposta a um dano cardíaco, como transdutores de sinais para reparação cardíaca, modulando migração, proliferação e adesão celular (revisado por FRANGOGIANNIS, 2012; RIENKS *et al.*, 2014; RIENKS e PAPAGEORGIOU, 2016).

O entendimento da composição a MEC nativa e seu papel na influência das células avançou nos últimos anos devido a técnicas de descelularização (CRAPO e GILBERT e BADYLAK, 2011). Muitos trabalhos já realizaram a descelularização de tecido cardíaco, tanto para caracterização quanto avaliação funcional. Em 2008, Ott e colaboradores descelularizaram o coração murino inteiro, mantendo a arquitetura do tecido original e realizando uma recelularização parcial com cardiomiócitos e células endoteliais (OTT *et al.*, 2008). Posteriormente, outros trabalhos conseguiram aumentar a eficiência da recelularização com células progenitoras cardíacas ou cardiomiócitos, ambos derivados de células-tronco pluripotentes (GUYETTE *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2013). Assim, é possível observar que a MEC nativa do coração consegue manter e estimular as células inseridas, porém, ainda não foi possível obter uma recelularização completamente eficiente e com todos os tipos celulares presentes no coração normal.

Além disso, tendo em vista que as proteínas de matriz são pouco solúveis, resultado de sua natureza macromolecular, das modificações pós-traducionais extensas e da tendência a formar complexos proteicos, sua caracterização proteômica é um desafio (revisado por CHANG *et al.*, 2016). Apesar disso, muitos grupos investiram na caracterização da MEC do coração, colaborando com avanços na área. Em 2013, de Castro-Brás, com o desenvolvimento de um protocolo para solubilização de proteínas de MEC, identificou em torno de 200 proteínas, sendo que destas, 20 eram proteínas de MEC. Laminina, fibronectina, tenascina C, emilina-1 e vários tipos de colágeno foram algumas das proteínas encontradas (CASTRO BRÁS, DE *et al.*, 2013). Em 2016, um grupo de pesquisa comparou a composição da MEC do coração de 6 doadores diferentes. Utilizando 2 tipos de abordagem (isótopos marcados para MEC e/ou avaliação global, livre de marcação) eles identificaram, em sua maioria, vários tipos de colágeno fibrilar, fibronectina, laminina, perlecan, trombospondina 2, nidogênio 1 e 2 e muitas outras proteínas. Interessantemente, observou-se diferença na composição entre os diferentes doadores (JOHNSON *et al.*, 2016).

Buscando contribuir com os conhecimentos a respeito do nicho cardíaco, nosso grupo caracterizou proteínas e exossomos secretados pelo tecido cardíaco humano adulto, assim como a matriz deste tecido. Através do método de cultivo de explante, o MC foi coletado e processado para análise do secretoma. Associando o uso de arranjos de anticorpos e espectrometria de massas, inúmeras proteínas foram encontradas, como as proteínas ligadoras de IGF 1 e 2 (IGFBP1 e 2), eritropoietina, IL6, IL8, MCP-1, entre outras (ROBERT *et al.*, 2017; SCHITTINI *et al.*, 2010). Com relação a composição das microvesículas, muitas das proteínas já haviam sido descritas na literatura como constituintes de vesículas derivadas de outros tecidos (ROMPKOSVKI, 2014).

É possível perceber que muitos avanços vêm sendo realizados para melhorar o entendimento do microambiente do coração. Diferentes abordagens mostram que as células presentes no coração liberam proteínas diversas de acordo com a etapa do desenvolvimento ou com a condição fisiológica do órgão. Todos estes estudos contribuem para o desenvolvimento de novas terapias, seja entendendo como as células implantadas vão interagir no coração, ou identificando proteínas com potencial estímulo aos progenitores residentes que possam ajudar na regeneração do órgão lesionado.

## 1.5 JUSTIFICATIVA

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo necessários avanços nas terapias já existentes. Dentre as abordagens que vem sendo estudadas na medicina regenerativa está a terapia celular. Porém, apesar dos esforços já realizados, existem controvérsias a respeito da eficiência dos protocolos terapêuticos desenvolvidos e a necessidade de novas alternativas de tratamento.

Os conhecimentos atuais demonstram que os cardiomiócitos proliferam, ainda que a taxas muito baixas ( $\leq 1\%$ ) e que há populações de células-tronco ou progenitoras no coração, fatos que nos oferecem novas perspectivas para seguir investigando. Uma delas é entender como as células progenitoras podem ser estimuladas *in vivo* para que proliferem e se diferenciem, regenerando lesões maiores. O primeiro passo em direção a este entendimento seria interpretar o microambiente em que essas células estão inseridas e como as sinalizações neste nicho podem influenciar o comportamento celular.

Mas os conhecimentos a respeito do nicho cardíaco durante o desenvolvimento e mesmo no tecido adulto ainda são muito limitados. Embora existam vários estudos caracterizando a matriz extracelular do coração, assim como os fatores solúveis secretados por várias células presentes neste tecido, ainda há muito a ser explorado. Então, pesquisar formas de entender este microambiente e identificar potenciais alvos terapêuticos é muito interessante. Uma das formas é utilizar células ou o próprio tecido cardíaco adulto. Outra abordagem é entender o desenvolvimento embrionário do coração, vias de sinalização e moléculas envolvidas, buscando potenciais estimuladores de proliferação ou diferenciação de progenitores cardíacos, baseado nos fatores que as próprias células secretam neste processo. Atualmente, um dos possíveis modelos para estudar este processo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro* faz uso das CTEs. Assim, caracterizar as proteínas secretadas durante as diferentes etapas da diferenciação celular, avaliando tanto fatores solúveis como proteínas da MEC, pode gerar novos conhecimentos importantes para a área.

A associação dos conhecimentos gerados com a caracterização e avaliação funcional *in vitro*, tanto das proteínas secretadas durante a diferenciação cardiomiogênica, quanto das secretadas do próprio tecido cardíaco ou de células residentes cardíacas, poderá permitir a avaliação de sinais específicos que possam ser utilizados para auxiliar a proliferação e diferenciação de células progenitoras residentes ou implantadas que, no futuro, contribuam para o desenvolvimento de protocolos voltados para a regeneração cardíaca.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização da matriz extracelular e proteínas secretadas por células residentes cardíacas e células-tronco embrionárias durante a diferenciação cardiomiogênica e avaliação do papel destes secretomas em cultivos de células progenitoras.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos estão subdivididos conforme as seções da presente tese:

#### – Capítulo 1

- Analisar, *in silico*, os dados referentes a caracterização do secretoma de células residentes cardíacas humanas em cultivo;
- Avaliar a influência do secretoma (meio condicionado) de células residentes cardíacas humanas sobre o cultivo de células progenitoras.

#### – Capítulo 2

- Induzir a diferenciação cardiomiogênica em células-tronco embrionárias humanas;
- Obter os fatores solúveis e da matriz extracelular durante o processo de diferenciação cardiomiogênica de células-tronco embrionárias;
- Caracterizar o secretoma (fatores solúveis e matriz extracelular) de células-tronco embrionárias durante o processo de diferenciação cardiomiogênica;
- Comparar os dados do secretoma com dados prévios de sequenciamento de mRNA obtidos durante o processo de diferenciação cardiomiogênica de células-tronco embrionárias;
- Avaliar a influência do secretoma (meio condicionado) de células-tronco embrionárias durante a diferenciação cardiomiogênica sobre cultivos de células progenitoras.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho está inserido no projeto de pesquisa intitulado “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação das células-tronco”, o qual possui aprovação vigente junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/FIOCRUZ) sob o número 419/07.

#### 3.2 CULTIVO DE CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS

As células residentes cardíacas (CRCs) foram isoladas do estroma tecidual cardíaco humano pelo método de cultivo de explantes como previamente descrito por nosso grupo (AGUIAR *et al.*, 2011). As células obtidas a partir das regiões da aurícula e do ventrículo direito do coração de doadores de órgãos foram caracterizadas quanto a seu imunofenótipo e então criopreservadas (AGUIAR *et al.*, 2011).

Para o cultivo destas células utilizou-se o meio de cultura Dulbecco's Mega Cell® (Sigma Chemical CO) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-Glutamina (L-Glu, Gibco™), 5 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2), 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.) e frascos de cultivo recobertos com um filme de colágeno I, conforme previamente padronizado (AGUIAR *et al.*, 2011). Os cultivos foram mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com trocas regulares de meio e repique celular após atingirem confluência entre 80-90%.

#### 3.3 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

A linhagem de células-tronco embrionárias (CTEs) hESC NKX2.5 GFP foi desenvolvida pelo Dr. David Elliott do *Murdoch Childrens Research Institute of Royal Children's Hospital* em Victoria, Austrália (ELLIOTT *et al.*, 2011) e transferida para o Instituto Carlos Chagas para utilização no projeto de pesquisa de “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação das células-tronco” (vide item 3.1) conforme termo de transferência executado pelas instituições em comum acordo (Anexo 1). As CTEs foram inicialmente cultivadas sobre camada de

extrato proteico (Corning® Matrigel® hESC-qualified matrix) e mantidas com meio mTeSR™1 (StemCell Technologies).

Posteriormente, as CTEs foram cocultivadas sobre uma camada alimentadora de fibroblastos murinos, extraídos de embriões de camundongos entre 12,5 e 13,5 dias de desenvolvimento (MEF – *Mouse Embryonic Fibroblasts*) e inativadas por radiação  $\gamma$  (CONNER, 2001). Inicialmente os fibroblastos murinos foram expandidos em garrafas de cultivo recobertas com gelatina 0,2%, mantidas com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomicina (Sigma Chemical Co.) e 2 mM de L-Glu (Gibco™). Posteriormente, as células foram tripsinizadas e irradiadas com uma carga de 1500 cGy no Hospital de Clínicas de Curitiba, sendo então congeladas na proporção de  $1 \times 10^6$  células por criotubo.

Para o cultivo com CTEs, a MEF irradiada foi descongelada em placas de 6 poços recobertas com gelatina 0,2%, utilizando o DMEM com 10% de SFB. Após aproximadamente 24hs, quando as MEFs estão aderidas a placa, as CTEs foram descongeladas e plaqueadas sobre a MEF com uso de um “meio caseiro” (SCHWARTZ *et al.*, 2011), o qual é composto por DMEM F12 com 20% de soro *knockout* (KnockOut™ Serum Replacement, KSR, Gibco™), 1% L-Glu, 0,01% betamercaptoetanol, 1% aminoácidos não essenciais, 1% de penicilina e estreptomicina, suplementado com FGF-2 (concentração final de 10 ng/mL). A seguir, foram acondicionadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A troca de meio de cultivo foi diária e, após 5 – 7 dias os poços atingiram uma confluência de, aproximadamente, 90%. Neste ponto, as células foram repicadas para expansão ou iniciou-se o protocolo de diferenciação cardiomiogênica.

### 3.4 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

O ensaio de diferenciação cardiomiogênica foi iniciado quando as culturas atingiram a confluência de 80-90%. Primeiramente, as células precisaram ser separadas da MEF. Então, após o repique, as CTEs foram plaqueadas em placas de 6 poços previamente recobertos com Matrigel™ *Growth Factor Reduced* (Corning) diluído na proporção de 1:4 em DMEM F12. Foram plaqueadas entre  $7 - 8 \times 10^5$  células por poço, as quais foram mantidas em “meio caseiro” por 24 – 48 horas, sem troca de meio até o início do protocolo de diferenciação.

O protocolo consistiu em três etapas principais: a formação dos corpos embriões, a indução a linhagem mesodermal e a indução a progenitores cardíacos (ELLIOTT *et al.*, 2011; KATTMAN *et al.*, 2011). Todas as etapas do processo de diferenciação cardiomiogênica foram esquematizadas na figura 3.1.

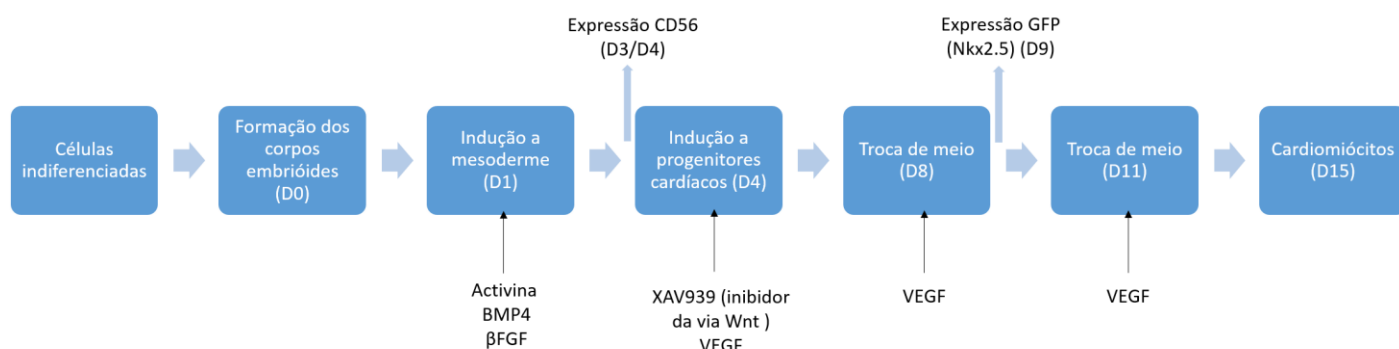


Figura 3.1: Etapas do processo de diferenciação cardiomiogênica das células-tronco embrionárias.

### 3.4.1 Formação dos corpos embriões (CEs)

O processo de formação dos corpos embriões (CEs) ocorre do primeiro ao segundo dia do protocolo (D0 – D1). Inicialmente, o meio de cultura em que as células embrionárias estavam foi retirado e as mesmas foram incubadas com colagenase I (1 mg/mL) por 20 minutos a 37°C. Após esse período, retirou-se a colagenase e adicionou-se tripsina (0,25%), a qual foi removida assim que as células mostraram sinais de desagregação (1-2 minutos). Imediatamente após, foi adicionado um meio contendo 50% DMEM F12, 50% de SFB e DNase 1 (1 µL/mL, 210U) para garantir a inativação da enzima. A seguir, foi realizada uma raspagem mecânica para suspender as células, as quais foram colocadas em tubos de fundo redondo (Greiner) e centrifugadas a 230 xg por 5 min.

Então, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se o meio de formação de CEs. Este é constituído por um “meio base”, composto por StemPro34 (StemPro™-34 SFM, Gibco™) suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina, 1% de L-Glu, 150 µg/mL de transferrina, 50 µg/mL de ácido ascórbico e 0,09 µL/mL de monotioglicerol (MTG), acrescido de BMP4 (1 ng/mL). O pellet de células foi ressuspenso até obter-se agregados com cerca de 10-20 células. A seguir, estes foram distribuídos em poços de placa de 6 poços não aderente (Corning® Costar® Ultra-Low Attachment plate). Esta placa foi incubada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>,

5% de O<sub>2</sub> (hipóxia), a 37°C por 24 horas, sendo este considerado o dia 0 (D0) do protocolo.

### **3.4.2 Indução da formação de células do mesoderma**

No segundo dia do protocolo, considerado dia 1 (D1), os CEs foram estimulados com meio de formação para linhagem mesodermal. Para isso, os CEs em suspensão foram coletados e transferidos para um tubo plástico de fundo redondo de 12 mL (Greiner), o qual foi deixado por 30 a 40 minutos em estufa de normóxia para permitir a decantação dos CEs. Após este o período, o sobrenadante foi gentilmente retirado e os CEs foram ressuspensos em meio de cultura composto do “meio base” suplementado com 10 ng/mL de BMP4, 6 ng/mL de Activina A e 5 ng/mL de  $\beta$ -FGF. Os agregados retornaram para a placa de 6 poços não aderente e foram novamente incubados a 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> a 37°C até os dias 3 - 4 (esta variação de tempo depende da aquisição do fenótipo celular CD56<sup>+</sup> em mais de 50% da população celular em cultivo).

### **3.4.3 Indução de progenitores cardíacos**

A segunda indução ocorreu após 3 dias da primeira (indução de mesoderme), ou seja, no dia 4 (D4) do protocolo. Novamente os CEs foram retirados e deixados para decantar como previamente descrito. Após retirar cuidadosamente o sobrenadante, os CEs foram ressuspensos em meio de inibição de Wnt contendo o “meio base” suplementado com VEGF (10 ng/mL) e XAV 939 (10  $\mu$ M/mL), retornando para estufa em hipóxia. Após mais 4 dias (D8), trocou-se o meio de indução de progenitores cardíacos por “meio base” com VEGF (10 ng/mL) e os CEs retornam para hipóxia até D15, com troca de meio a cada 3 dias.

### **3.4.4 Imunofenotipagem para CD56**

A confirmação da diferenciação das CTEs em mesoderme foi feita através da marcação para o marcador de superfície celular CD56 no dia 3 e/ou 4 do protocolo. Resumidamente, uma alíquota (100-200  $\mu$ L) dos CEs foi tripsinizada (5 min), seguida de inativação com meio DMEM F12 com 50% de SFB e centrifugação (300 xg, 5 min). Após, as células foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de PBS com 0,5% de



albumina bovina (*Bovine Serum Albumin* - BSA) (PBS/BSA 0,5%), onde foi adicionado o anticorpo anti-CD56 humano (BD) na proporção de 1:25, seguido de incubação por 20 min, a 4°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados e as células ressuspendidas em 200 µL de PBS/BSA 0,5% para análise no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). Essa verificação foi realizada antes da troca do meio em D4.

### **3.4.5 Fenotipagem para Nkx2.5**

Para confirmar o avanço da diferenciação celular para o fenótipo de progenitor cardíaco, os CEs foram coletados no D9, tripsinizados e as células individualizadas foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). Neste protocolo não há necessidade da utilização de marcação imune, pois as CTEs expressam a proteína verde fluorescente GFP associada à expressão do fator transcricional Nkx2.5, utilizado como *checkpoint* durante a diferenciação cardiomiogênica.

### **3.4.6 Imunofenotipagem para troponina T**

Para verificação da porcentagem de cardiomiócitos obtidos após 15 dias do início do protocolo de diferenciação (D15), as células foram marcadas com troponina T cardíaca (TnTc) e analisadas no citômetro de fluxo. O percentual de células TnTc<sup>+</sup> é considerado diretamente proporcional ao sucesso da diferenciação.

Os CEs foram coletados no D15, lavados uma vez com PBS 1x e então incubados com tripsina por 20 min (com agitação a cada 5 min) para dissociação dos CEs. Após a inativação da tripsina com meio DMEMF12 contendo 50% de SFB, suplementado com DNase I (20-30 U/mL), as células foram centrifugadas a 300 xg por 5 min e fixadas com paraformaldeído 4% (PFA 4%) por 20 min, a temperatura ambiente. Então, as células foram centrifugadas a 700 xg por 5 minutos e incubadas com 200 µl de Triton X-100 0,3% por mais 30 min.

Para a marcação com anticorpo, as células foram novamente centrifugadas a 700 xg por 5 min e ressuspendidas em PBS/BSA 0,5% contendo o anticorpo primário anti-tropT (Ab-1 Thermo Scientific™) na proporção de 1:100, seguida de incubação por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS/BSA 0,5%

e ressuspendidas em PBS/BSA 0,5% contendo anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti-IgG de camundongo na proporção de 1:1000, sendo incubadas por mais 30 min. A lavagem foi repetida e as células foram ressuspendidas em PBS/BSA 0,5% contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol). Após, foi feita a leitura no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences).

### 3.5 COLETA E PREPARO DOS MEIOS CONDICIONADOS

Para obtenção do meio condicionado, as CTEs foram submetidas ao processo de diferenciação cardiomiogênica como previamente descrito. Os meios foram coletados nos dias 1 (MCD1c), 4 (MCD4c), 8 (MCD8c) e 15 (MCD15c) do protocolo, tendo as células permanecido em contato com o meio por, no mínimo, 3 dias (exceto MCD1c). Após a coleta, o meio foi submetido a duas centrifugações: a primeira de 1620 xg, por 5 min, e a segunda de 4000 xg, por 20 min, ambas a 8°C, para eliminação de debris celulares e corpos apoptóticos (CRESCITELLI *et al.*, 2013). O meio de cada dia foi aliquoteado e armazenado a -80°C até o momento do uso. Como controle foi utilizado o meio base sem nenhum fator de crescimento, denominado meio não condicionado (MNC), o qual também foi aliquoteado e armazenado a -80°C. Os MCs e o MNC foram coletados durante todo o desenvolvimento do trabalho. Todas as amostras foram quantificadas quanto à sua composição proteica com uso do kit Qubit® Protein Assay (Molecular Probes) seguindo as instruções do fabricante.

### 3.6 DESCELULARIZAÇÃO DOS CORPOS EMBRIÓIDES

Para obtenção da MEC produzida durante a diferenciação cardiomiogênica, foi realizada a descclularização dos corpos embrióides, seguindo protocolo previamente descrito (GOH e OLSEN e BANERJEE, 2013; SART e MA e LI, 2014). Os CEs dos dias 1, 4, 9 e 15 foram coletados e centrifugados a 300 xg por 5 min, sendo então incubados com 1% Triton X-100 por 30 min, sob agitação, seguido por centrifugação a 18000 xg por 2 min e duas lavagens com PBS 1x. Após, as amostras foram tratadas com DNase I (1 mg/mL) por 30 min, a temperatura ambiente. Seguiu-se a isso uma nova centrifugação a 18000 xg por 2 min e 2 lavagens com PBS. A descclularização foi confirmada com a extração de DNA com kit Qlamp DNA mini kit (Qiagen).

### 3.7 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DA MEC OBTIDA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Buscando identificar, de forma ampla, as proteínas presentes nos MCs e na MEC durante o processo de diferenciação cardiomiogênica, as amostras foram coletadas e analisadas por espectrometria de massas.

No caso das amostras de CEs descelularizados, estas, após serem solubilizadas em 50 µL de tampão de amostra 4x (160 mM de Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% b-mercaptoetanol, 24% glicerol e 0.02% azul de bromofenol), foram resolvidas em um gel SDS-PAGE 10% e coradas com azul de Coomassie. Após, as linhas foram retiradas e cortadas. Para cada tempo (D1, D4, D9 e D15) foram descelularizados CEs de duas diferenciações independentes.

Em seguida, todas as amostras foram enviadas para a plataforma de Espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas (RPT02H), onde foram decoradas e submetidas a digestão com tripsina (no gel). Cada uma das amostras de MEC foi analisada em triplicata no LQT Orbitrap XL ETD. A identificação, quantificação e validação das proteínas foi realizada com o software PatternLab 4.0 (<http://patternlabforproteomics.org/>) (CARVALHO *et al.*, 2015).

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DOS MC OBTIDOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA – ARRANJO DE ANTICORPOS

As amostras de MC foram analisadas através de arranjos de anticorpos customizados (RayBio™ Raybiotech) para o reconhecimento de fatores de crescimento e citocinas. O arranjo utilizado possui 60 proteínas, descritas no quadro 3.1, além de controles positivos e negativos. A escolha destas proteínas foi baseada em dados obtidos do sequenciamento gênico de RNAs polissomais coletados em tempos equivalentes da diferenciação cardiomiogênica de CTEs (dados não publicados).

AFP	CXCL16	FGF-4	IGFBP-3	SDF-1
Angiopoetin-1	Decorina	FGF-7	IGFBP-5	TGF-alpha
Angiostatina	Dkk-1	FGF-9	IGFBP-6	TGF-beta1
APRIL	EGF	Fibronectina	IGFBP-7	TGF-beta2

Biglican	ENA-78	Frizzled-1	IGF-II	TIMP-4
BMP-4	Eritropoietina	GCP-2	IL-6	TNF-alpha
BMP-5	FGF-10	GDF-15	Lumican	TRAIL
BMP-7	FGF-12	GDF3	MMP-19	Vasorina
BMP-9	FGF-17	GRO	MMP-2	VEGF
Cardiotrophin-1	FGF-18	HB-EGF	MMP-2	VEGF
CD30ligand	FGF-19	HGF	MMP-25	VGF
CXCL14	FGF-23	IGFBP-1	PDGF-BB	VWF

Quadro 3.1: Proteínas (nomes ou símbolos) presentes no arranjo de anticorpos customizado.

A metodologia seguida para detecção das proteínas foi baseada nas instruções do fabricante (figura 3.2). Em resumo, inicialmente os MCs foram dialisados (duas diálises de 3h a 4°C em PBS 1x pH8.0) e, após este período, as amostras foram dosadas para confirmação da quantidade de proteínas. Então os MCs dialisados foram incubados por 30 min, a temperatura ambiente, com um reagente responsável por conjugar biotina as proteínas da amostra. Para retirar a biotina não ligada, as amostras foram filtradas em colunas fornecidas pelo fabricante. Juntamente, as membranas com os anticorpos foram bloqueadas por 60 min em um tampão também fornecido pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram adicionadas sobre as membranas (volume final de 2 mL) e incubadas *overnight* (15-16 horas), a 4°C, sob suave agitação. Após, foram realizadas lavagens e as membranas foram incubadas por 2h com estreptavidina conjugada com peroxidase, a temperatura ambiente, sob suave agitação. Mais uma vez foram repetidas as etapas de lavagem e, em seguida, as membranas foram incubadas com 1,5 mL de reagente de detecção (preparado com volumes iguais dos tampões de detecção C e D do kit) por 2 min. Em seguida, as membranas foram reveladas com auxílio do fotodocumentador para membranas L-PIX Chemi Express (Loccus). O tempo de exposição variou de 20 a 40 segundos.

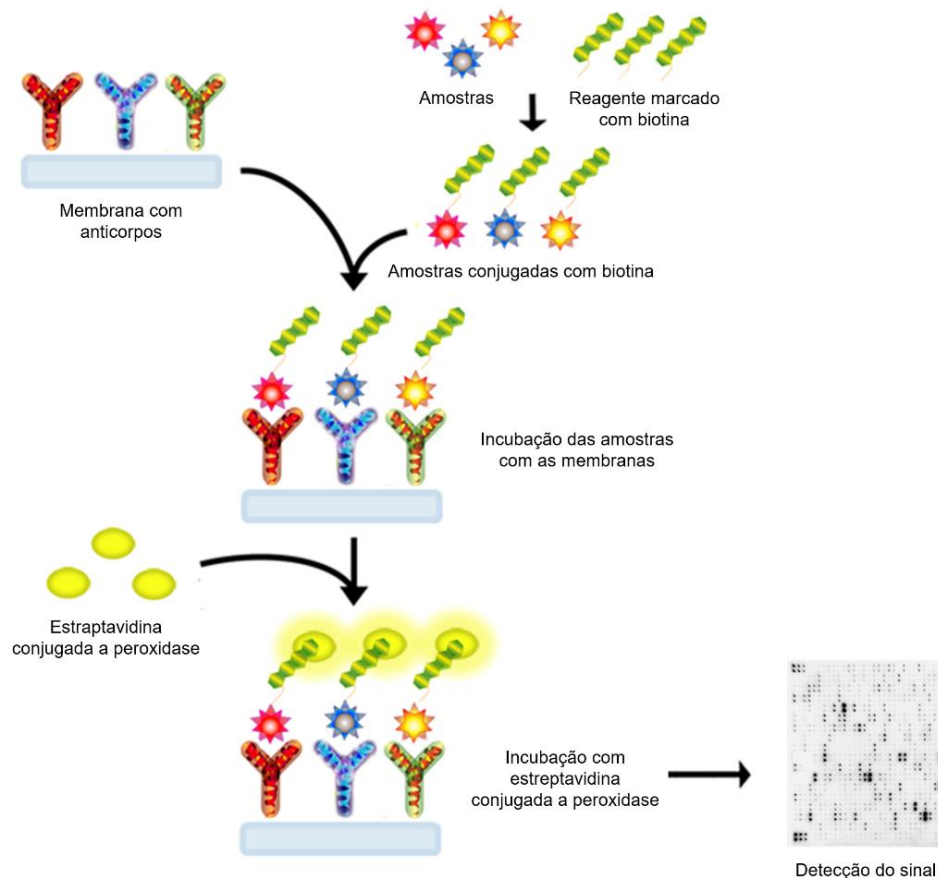


Figura 3.2: Representação resumida do protocolo de marcação dos arranjos de anticorpos.

Fonte: Adaptado de RayBiotech - *RayBio® L-Series Antibody Array Membranes* (<https://www.raybiotech.com/l-series-label-based-antibody-arrays>)

As imagens geradas das membranas, em formato TIFF, foram analisadas no *software* ImageJ, com auxílio do módulo de extensão *Protein Array Analyzer* (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Protein-Array-Analyzer-for-ImageJ.html&lang=en>) para mensuração da intensidade dos pontos (figura 3.3). Os valores das intensidades foram importados para arquivo Excel®, alinhados de acordo com o mapa do arranjo e normalizados (descontando valor do controle negativo e normalizando com o controle positivo, para cada membrana). Cada arranjo foi analisado 3 vezes, independentemente, e o valor da média das análises foi considerado o valor da intensidade final de cada ponto. Para a visualização gráfica, os valores gerados foram copiados para o *software* estatístico GraphPad Prism 5.

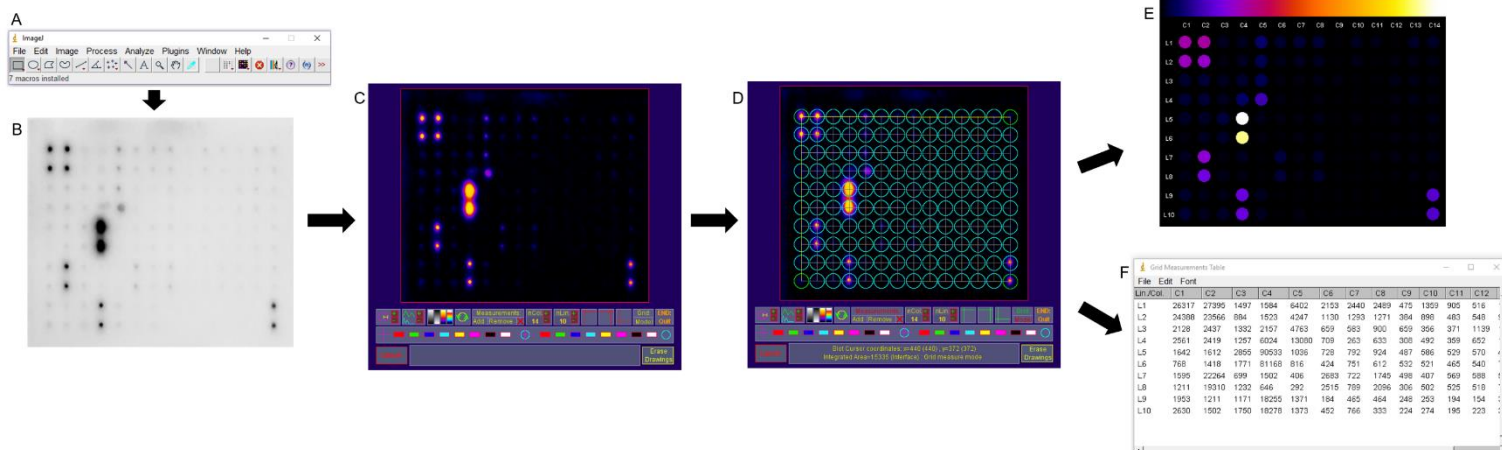


Figura 3.3: Fluxograma da análise realizada com as membranas de anticorpos com auxílio do módulo de extensão Protein Array Analyzer. Na sequência: abrir o programa ImageJ (A) e carregar a foto da membrana (B). Em seguida, o módulo permite a otimização da visualização dos pontos marcados (C) e é possível montar o esquema dos pontos do arranjo (D). Por fim, é gerado um modelo da membrana (E) e uma tabela com os valores das intensidades dos pontos (F).

### 3.9 ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos através da espectrometria de massas e do arranjo de anticorpos foram analisados utilizando diferentes bases de dados e softwares. Análises de ontologia gênica foram realizadas utilizando os softwares FunRich v3.0 (PATHAN *et al.*, 2015) e gProfiler (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>). Análises complementares foram realizadas com o software *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA - versão 26127183 - Qiagen, Valencia CA, USA), com a ferramenta de classificação PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) (MI e MURUGANUJAN e THOMAS, 2013) e com o software para geração de *heatmaps* Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

### 3.10 CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS, CÉLULAS H9C2 E CÉLULAS HUVEC

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs, do inglês, *Adipose Derived-Stem Cells*, Lonza, cat.: PT-5006) e células H9c2 derivadas de mioblasto cardíaco murino (ATCC® CRL-1446™) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina e 1% de L-Glu. As

células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC, do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Lonza, cat.: C2519A) foram mantidas de acordo com instruções do fabricante, com meio EBM-2™ (Lonza) suplementado com 5% de SFB, FGF humano, fator de crescimento epidermal humano (hEGF), fator de crescimento endotelial vascular (hVEGF), fator de crescimento similar a insulina 1 (R3-IGF-1), ácido ascórbico, hidrocortisona e GA-1000 (30 mg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de anfotericina). Todas as células foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O repique foi realizado quando elas atingiram confluência de 80-90%, com trocas do meio de cultivo a cada 2-3 dias.

### 3.11 ENSAIOS FUNCIONAIS EM CULTIVOS CELULARES – CONDIÇÕES DOS MEIOS CONDICIONADOS UTILIZADOS

Os ensaios funcionais nos cultivos celulares de ADSCs, H9c2 e HUVECs foram realizados com MCs obtidos de origens diferentes: do tecido cardíaco adulto (células residentes cardíacas - CRCs) e durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs. Assim, os tratamentos para avaliar a funcionalidade dos MCs foram diferentes em cada condição.

Com relação aos experimentos utilizando MCs derivados de CRCs, os cultivos celulares foram tratados com os seguintes meios:

- a) MCA – 100% de MC obtido de CRCs derivadas de aurícula;
- b) MCV – 100% de MC obtido de CRCs derivadas de ventrículo;
- c) MNCR – 100% de meio não condicionado (meio de cultivo para CRCs).

Com relação aos experimentos utilizando MCs derivados da diferenciação cardíaca das CTEs, foi utilizado a combinação (*pool*) de MCs de 3 diferenciações distintas. Além disso, após avaliações iniciais da viabilidade celular relativa dos cultivos com os MCs (apêndice 9), estes foram utilizados diluídos. Assim, os cultivos celulares foram tratados com a seguinte composição de meios:

- a) MCD1c – 75% de MC obtido no dia 1 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB;
- b) MCD4c – 75% de MC obtido no dia 4 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB;
- c) MCD8c – 75% de MC obtido no dia 8 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB;

- d) MCD15c – 75% de MC obtido no dia 15 da diferenciação cardiogênica, acrescido de 25% de DMEM sem SFB;
- e) MNC – 75% de meio não condicionado (“meio base” da diferenciação cardiomiogênica), acrescido de 25% de DMEM sem SFB.

### 3.12 ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

O vermelho neutro (VN) é um corante catiônico que se incorpora nos lisossomos de células viáveis. Assim, o ensaio de captação do VN pode avaliar se um determinado tratamento interfere com a viabilidade celular, servindo como um indicador de citotoxicidade.

Neste estudo, o ensaio de captação do VN foi realizado de acordo com protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório (ABUD *et al.*, 2015; ICCVAM, 2006). Resumidamente, as células foram plaqueadas e após 48 horas foram tratadas com os diferentes MCs, tendo estes permanecido em contato com as células por mais 2 dias. Tendo completado o tempo de cultivo, o meio foi retirado, as células foram lavadas com 250 µL de D-PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; PBS1x com cloreto de magnésio e cloreto de cálcio) e foi adicionado 250 µL da solução de vermelho neutro (VN diluído em DMEM com 5% de SFB, 1% L-Glu; 1% penicilina/estreptomicina). As placas foram então incubadas a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> por 3 horas. Seguido este período o meio foi removido, os poços foram lavados com D-PBS e então adicionou-se 100 µL de solução desorbante (50% etanol/ 1% ácido acético/ 49% água). A placa foi mantida sob agitação por 20 min no escuro e, em seguida, foi realizada a mensuração da absorbância a 540 nm em multileitora (Synergy H1 Hybrid Reader (Biotek)).

### 3.13 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular foi realizado com ADSCs, células H9c2 e CTEs, em placas de 96, 24 ou 6 poços, com aproximadamente 6x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>, cultivadas com os diferentes MCs. As células em proliferação foram identificadas com duas estratégias diferentes. A primeira foi através da identificação da proteína nuclear Ki67 com o uso de um anticorpo específico, associado a marcação do núcleo por DAPI. Neste caso, após a imunomarcação, a análise quantitativa foi realizada com auxílio de um sistema de imagens de grande capacidade (*high-content screening* - HCS), *Operetta HCS imaging system* (PerkinElmer, Waltham MA, USA).



O segundo ensaio utilizado para verificação da quantidade de células em proliferação foi através da incorporação de um análogo de timidina, o EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647), seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen™). Resumidamente, as células foram incubadas com EdU por 24 horas e, após esse período, o cultivo foi tripsinizado e as células que incorporaram o análogo foram detectadas por uma reação catalisada por cobre e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences).

### 3.14 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS H9c2

Este ensaio foi realizado com células H9c2, em placas de 24 ou 96 poços, com aproximadamente,  $6 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. As células foram plaqueadas com DMEM 10% SFB e mantidas por até 48 horas neste meio, sendo que, após este período, foram adicionados os tratamentos com os MCs, os quais duraram por 3 e/ou 7 dias. As células diferenciadas foram identificadas com os anticorpos anti-troponina I e anti-troponina T cardíaca. A análise quantitativa foi realizada no equipamento *Operetta HCS imaging system* (PerkinElmer, Waltham MA, USA), baseando-se na intensidade e na quantidade de fluorescência em cada uma das condições avaliadas.

### 3.15 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE VASOS *IN VITRO*

Buscando verificar o potencial angiogênico dos MCs, foram utilizadas células HUVEC em ensaio de formação de vasos com Matrigel®. Para isso, placas de 24 poços foram recobertas com 250 µL de Matrigel® Matrix Basement Membrane (Corning) e incubadas a 37°C por 30 min. Em seguida, as células foram adicionadas na concentração de  $7 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> e estas foram mantidas com o meio EBM-2 completo (controle positivo), com o meio EBM-2 sem SFB e sem suplementos (controle negativo) ou com os MCs. As culturas foram mantidas em estufa a 37° com 5% de CO<sub>2</sub>. Os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos por 24 horas, com fotos sendo tiradas a cada 4 ou 6 horas. No mínimo cinco imagens (aumento com objetiva de 5x ou 10x) de campos aleatórios foram obtidas utilizando o microscópio invertido NIKON ECLIPSE TE300.

### 3.16 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar a influência dos MCs na migração de células endoteliais, utilizou-se o ensaio de “cicatrização de feridas” (*scratch/ wound healing assay*) com células HUVEC. Resumidamente, neste ensaio as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com  $1 \times 10^4$  células/poço, e mantidas até atingirem confluência. Neste ponto, foi feito um risco (*scratch*) na monocamada com uma ponteira de 200  $\mu\text{L}$  e, em seguida, as células foram lavadas uma vez com meio EBM sem SFB e sem fatores. Após, foram adicionados os MCs. A placa foi, então, colocada no equipamento *Operetta HCS imaging system* (PerkinElmer, Waltham MA, USA) e mantida a  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ . Neste equipamento os poços foram monitorados durante 16 horas, sendo que a cada hora uma foto do poço inteiro era tirada. Ao final do ensaio, os dados gerados permitiram avaliar e comparar a porcentagem da área fechada (daquela provocada inicialmente) ao longo do tempo.

### 3.17 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA das amostras de CTEs durante o processo de diferenciação cardiomiogênica foi realizada com o reagente TRIzol™, seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen™). Inicialmente as células foram centrifugadas a 300 xg e, após, o pellet foi homogeneizado com 1 mL de TRIzol™. Então, adicionou-se clorofórmio e o homogeneizado foi centrifugado a 12000 xg, por 15 min, a  $4^\circ\text{C}$ . Em seguida, a camada aquosa (superior), contendo o RNA, foi retirada e colocada em um novo tubo. Para precipitação do RNA foi adicionado isopropanol, incubado por 10 min, seguido de centrifugação a 10000 xg por 10 min, a  $4^\circ\text{C}$ . Para retirar impurezas, foi realizada uma lavagem com etanol 75% e o pellet de RNA foi mantido a seco por 5-10 min, sendo posteriormente ressuspendido em 30  $\mu\text{L}$  de água ultrapura livre de RNAses. A quantidade de RNA em cada uma das amostras foi dosada com o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

### 3.18 SÍNTESE DE cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit de transcrição reversa Improm-II (Promega), conforme instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, em um volume de, no máximo, 10,1  $\mu\text{L}$ . A

seguir foi adicionado 1 µL de oligodT 10 µM e incubou-se as amostras por 5 min a 70°C e mais 5 min a 4°C. Após resfriamento, foram adicionados os outros componentes necessários a reação: 4 µL do tampão de reação ImProm II 5x, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µL de dNTPs (10mM), 1 µL de transcriptase reversa e 0,5 µL RNase Out (Promega). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 5 min a 25°C, seguida de uma incubação de 1 h a 42°C e, por fim, por mais 15 min a 70°C. Ao final, foram adicionados 200 µL de água deionizada em cada amostra. Estas foram dosadas e armazenadas a -20°C até o uso.

### 3.19 PCR QUANTITATIVA (PCRq)

A análise quantitativa dos transcritos de interesse foi realizada por meio da PCR em tempo real com o uso do SYBR® Green (Applied Biosystems) e do equipamento LightCycler® 96 (Roche). Seguindo as instruções do fabricante, 10 µL do *master mix* SYBR® foi misturado com 1 µL de cada iniciador a 5 pmol e com 3 µL de água ultrapura. Estes 15 µL foram adicionados a placa de PCR, sendo, em seguida, acrescentado 5 µL das amostras de cDNA. As condições das PCRs envolveram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por 45 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min e *melting* (95°C por 10 segs, 65°C por 1 min e 97°C por 1 seg). Para cada um dos pares de iniciadores (descritos no quadro 3.2) foi realizada uma curva e cálculo de eficiência, com cDNAs conhecidamente positivos para os genes, com diluição seriada 1:10 ou 1:5. Todos os iniciadores apresentaram eficiência de no mínimo 90% e *Slope* adequado (entre -3,6 ≥ slope ≥ 3,32) (ver apêndice 1). Todas as amostras foram avaliadas em triplicata.

Gene	Sequência (5'-3')	Número de acesso	Amplicon (pb)	Referência do primer
Oct3/4	F: ATGCATTCAAACCTGAGGTGCCTGC R: AAC TTCACCTTCCCTCCAACCAGT	NM_001173531	192 pb	(YE <i>et al.</i> , 2013)
Nanog	F: ACCAGA ACTGTGTTCTCTTCCACC R: CCATTGCTATTCTTTCGGCCAGTTG	NM_024865	200 pb	(ZAEHRES <i>et al.</i> , 2005)
REX1	F: AACATGAGCCAGCAACTGAAG R: AGAAATCATCCCCTCCGAGAG	NM_174900.3	208 pb	(CICERO, LO <i>et al.</i> , 2008)
Nkx2.5	F: TTAAGTCACCGTCTGTCTCCCTCA R: ACCGACACGTCTCACTCAGCATTT	NM_001166175	124 pb	(YE <i>et al.</i> , 2013)
Gata-4	F: ACCTGGGACTTGGAGGATAGCAAA R: TCCCATCAGCGTGTAAGGCATCT	NM_002052	169 pb	(YE <i>et al.</i> , 2013)

TnTc	F: TGCAGGAGAAGTTCAAGCAGCAGA R: AGCGAGGAGCAGATCTTTGGTGAA	NM_000364	155 pb	(YE <i>et al.</i> , 2013)
cTnl	F: GGGGGCCCGGGCTAAGGAGTC R: AGGGCAGGGGCAGTAGGCAGGAAG	NM_000363.4	183 pb	(SCHITTINI <i>et al.</i> , 2010)
Brach	F: AAAGAGATGATGGAGGAACCCGGA R: AGGATGAGGATTTGCAGGTGGACA	NM_003181	~108 pb	(YE <i>et al.</i> , 2013)
EOMES	F: CAAATTCCACCGCCACCAAAGTGA R: TTGTAGTGGGCAGTGGGATTGAGT	NM_001278182.1	108 pb	(OVCHINNIKOV <i>et al.</i> , 2014)
PAX6	F: CAGCACCAGTGTCTACCAACCA R: CAGATGTGAAGGAGGAAACCG	NM_000280.4	62 pb	(OVCHINNIKOV <i>et al.</i> , 2014)
Nes	F: TCTCCAGAACTCAAGCACCACTG R: TCCTGATTCTCCTCTCCAGGAGT	NM_006617	146 pb	(ZAEHRES <i>et al.</i> , 2005)
FOXA2	F: TCCGACTGGAGCAGCTACTATG R: CCACGTACGACGACATGTTC	NM_021784.4	172 pb	(TAKEUCHI e NAKATSUJI e SUEMORI, 2014)
AFP	F: CAGCCACTTGTTGCCAACTC R: GGCCAACACCAGGGTTTACT	NM_001134.2	123 pb	PrimerBlast ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a> )
GAPDH	F: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC R: TGGTTCACACCCATGACGA	NM_002046.3	149 pb	PrimerBlast ( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a> )

Quadro 3.2: Sequência dos iniciadores utilizados para PCR quantitativa.

Os dados do equipamento foram analisados com auxílio do *software* próprio do LightCycler® 96 (Roche). Os valores de média de Cq foram normalizados baseado no gene Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) ( $\Delta Ct$ ). Os dados de  $\Delta Ct$  referentes a cada gene nos tempos D4, D8 e D15 foram comparados com os dados do tempo D1 ( $\Delta \Delta Ct$ ), sendo seguida da análise de  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  para mostrar a expressão relativa do mRNA do gene entre os tempos analisados.

### 3.20 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os ensaios que envolvem imunofluorescência seguiram, de forma geral, as seguintes etapas: os cultivos foram lavados uma vez com PBS e fixadas por 20 min com formaldeído 4%. Após, as células foram permeabilizadas em solução de PBS contendo 0,5% de Triton X-100 por 30 min e bloqueadas com PBS/BSA 1% por 60 min. As amostras bloqueadas foram incubadas com os anticorpos primários (diluídos em PBS/BSA 1%) por 1h a temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários (diluídos em PBS/BSA 1%) de 1 a 1 hora e 30min, a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas novamente com PBS e os núcleos foram marcados com DAPI (1  $\mu g/\mu L$ ) por 10min. O excesso de DAPI foi retirado com

mais 3 lavagens com PBS. As placas foram mantidas com PBS até a aquisição das imagens.

### 3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos ensaios foram plotados no programa de estatística Graphpad Prism versão 5.0. As análises estatísticas utilizadas foram o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey e, para análises agrupadas, ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Os dados estão expressos com a média  $\pm$  desvio padrão, sendo que diferenças com  $p \leq 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

### 3.22 REAGENTES E MATERIAIS

Todos os reagentes e materiais utilizados na diferenciação cardiomiogênica, assim como os anticorpos usados no trabalho, estão listados no apêndice 2.

**CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MEIOS  
CONDICIONADOS DERIVADOS DE CÉLULAS RESIDENTES  
CARDÍACAS NO CULTIVO DE CÉLULAS PROGENITORAS**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

A partir do cultivo de células residentes cardíacas, isoladas da aurícula e do ventrículo de corações humanos (REUS, 2014), coletamos o meio condicionado para realização de ensaios funcionais, incluindo a avaliação da taxa de proliferação em células-tronco mesenquimais e células H9c2, a avaliação do potencial de diferenciação cardiomiogênica em células H9c2 e do potencial de formação de vasos *in vitro* com células HUVEC. Estes ensaios foram realizados em paralelo às análises bioinformáticas, a partir de dados proteômicos obtidos previamente de cultivos com as mesmas células (REUS, 2014). O esquema abaixo representa o fluxograma metodológico realizado nesta parte do trabalho (figura 4.1).

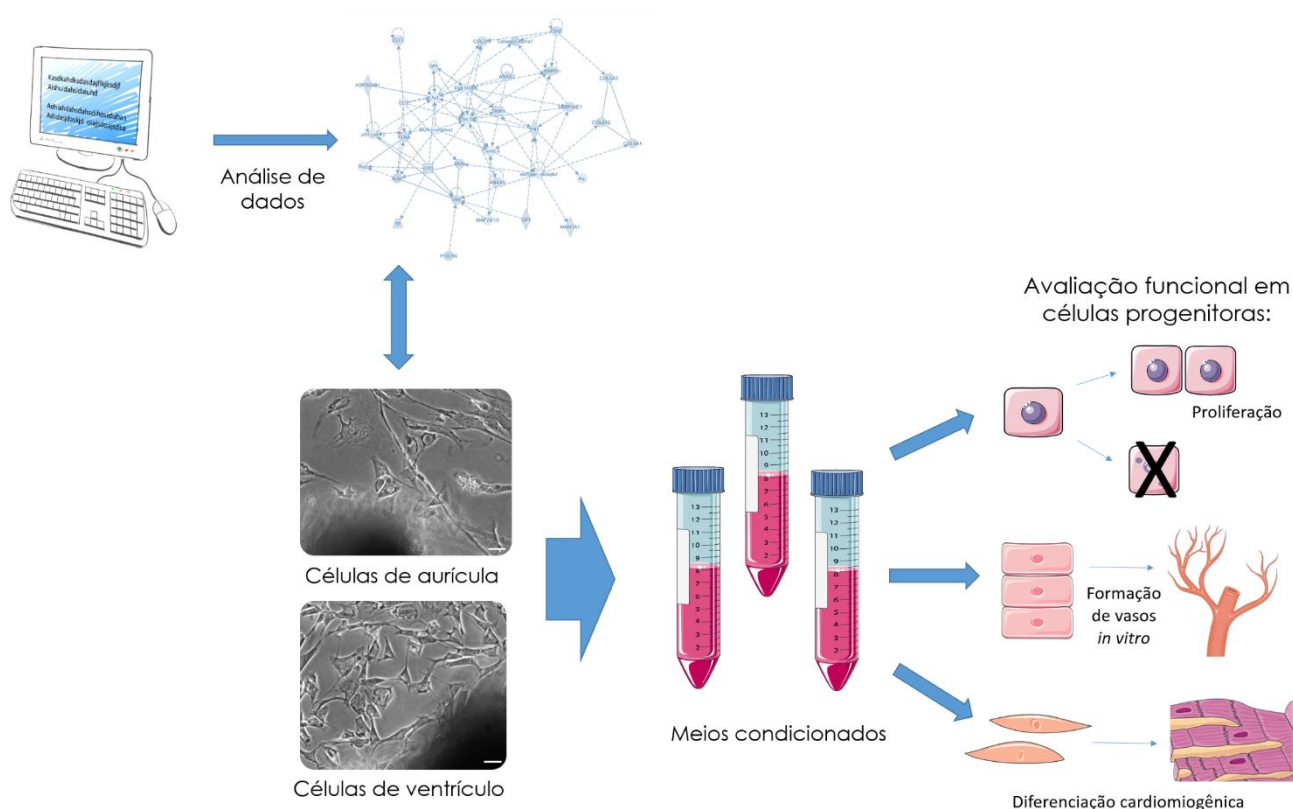


Figura 4.1: Fluxograma representativo das análises e ensaios realizados com o MC derivado de células residentes cardíacas.

Para montagem desta figura foi utilizado o acervo de imagens disponibilizado pela *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>; Servier, Suresnes, França), do site <https://pt.dreamstime.com> e o artigo de Aguiar *et al*, 2011.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DAS CÉLULAS RESIDENTES CARDÍACAS

As células residentes cardíacas (CRCs) já foram previamente isoladas e caracterizadas por nosso grupo. Resumidamente, elas foram isoladas a partir do cultivo de explantes de fragmentos do coração humano (região da aurícula e ventrículo), consistindo de uma população heterogênea de células, que inclui células-tronco mesenquimais e fibroblastos cardíacos (AGUIAR *et al.*, 2011; REUS, 2014). Além disso, em 2014, Reus realizou o isolamento e a identificação dos fatores solúveis secretados pelas CRCs, assim como avaliou o potencial destes fatores em cultivos com células-tronco mesenquimais (REUS, 2014). Tendo em vista os resultados prévios obtidos por Reus e com o objetivo de melhor caracterizar o secretoma cardíaco adulto e sua potencial atividade, optamos por aprofundar os conhecimentos já adquiridos realizando novas análises e experimentos funcionais.

Inicialmente, analisamos de forma qualitativa os dados referentes às proteínas identificadas nos meios condicionados das CRCs, comparando o MC de aurícula (MCA) com o de ventrículo (MCV) (as proteínas identificadas estão listadas no apêndice 3). A composição proteica dos dois MCs mostrou-se muito similar, sendo que apenas 8 proteínas foram identificadas exclusivamente em MCA e 2 em MCV (figura 4.2).

Ao comparar os dados das proteínas identificadas no MCA e no MCV com dados da literatura, nota-se que muitas das proteínas já foram encontradas em outros meios condicionados, inclusive no secretoma de células-tronco mesenquimais (IVANOVA *et al.*, 2016; LAVOIE e ROSU-MYLES, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014). Porém, direcionamos nossa busca para informações relacionadas ao secretoma de populações celulares isoladas do coração.

Recentemente, foi realizada uma caracterização ampla de proteínas secretadas por fibroblastos cardíacos murinos em condições normais e em hipóxia, tentando mimetizar situações fisiológicas e patológicas no coração (COSME *et al.*, 2017). Na condição de normóxia mais de 700 proteínas foram identificadas, entre as quais PCOLCE (do inglês *Procollagen C-Endopeptidase Enhancer*), periostina (POSTN), enolase 1 (ENO1), laminina subunidade alfa 4 (LAMA4), também achadas neste trabalho. Interessantemente a IL16, identificada no MCA, não apareceu nem no MC nem nos exossomos dos fibroblastos, apenas no lisado celular total (COSME *et*



*al.*, 2017). Já com relação aos fatores secretados por cardiomiócitos e células-tronco cardíacas, um trabalho de 2010 apresentou uma caracterização identificando proteínas como PCOLCE, SPARC, proteína de matriz extracelular 1 (ECM1) (STASTNA *et al.*, 2010), também encontradas no MCA e MCV.

Zhang e colaboradores, em 2015, isolaram uma população de células-tronco residentes cardíacas utilizando o marcador W8B2, com a qual realizaram uma caracterização proteômica e funcional do seu MC (ZHANG *et al.*, 2015). Tendo usado arranjos de anticorpos como estratégia para identificar as proteínas, observamos que várias delas também foram identificadas em nosso estudo. Por exemplo, IL6, IL8, SERPINE1, decorina, inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP1), entre outras. Já em 2017, Sharma e colaboradores utilizaram espectrometria de massas para caracterizar o secretoma de células progenitoras cardíacas humanas de neonatos e de adultos (c-kit<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>) (SHARMA *et al.*, 2017). Com esta abordagem, muitas outras proteínas foram descritas e, novamente, várias foram encontradas em nosso estudo, dentre elas, a fibronectina (FN1), IL6, IL8, IGFBP7, TGFB1 e outras.

Assim, constatamos que as populações de células residentes cardíacas isoladas de aurícula e ventrículo secretam proteínas que já foram descritas em outras populações celulares do coração. Isso sugere que esses tipos celulares podem estar incluídos em nossa população celular heterogênea, os quais secretam fatores que, potencialmente, tem funções importantes no tecido cardíaco.

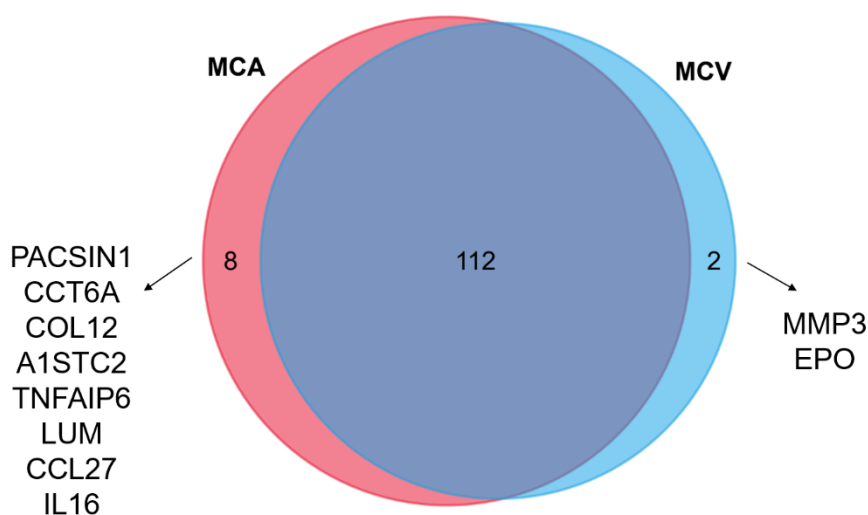


Figura 4.2: Comparação da composição proteica do secretoma dos MCs das CRCs. Diagrama de venn mostrando o número de proteínas que são comuns e exclusivas entre MCA e MCV.

Após estas considerações iniciais, investigamos os termos gerados por ontologia gênica relacionados com componentes celulares. Estas análises foram realizadas utilizando o software FunRich v3.0. Observamos que, em sua maioria, as proteínas identificadas estão relacionadas ao espaço extracelular e exossomos (figura 4.3A). Tendo em vista que estamos trabalhando com um meio condicionado, estes dados confirmam que conseguimos isolar, em sua maioria, fatores e proteínas secretadas.

Conjuntamente, ao analisarmos os processos biológicos envolvidos, encontramos termos gerais, como crescimento e manutenção celular (*cell growth and/or maintenance*), comunicação celular (*cell communication*), resposta imune (*immune response*), entre outros (figura 4.3B), essencialmente com a mesma representatividade para ambos os MCs. Para buscar outras funções e possíveis redes gênicas envolvidas com as proteínas identificadas, utilizamos o software *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA®).

Com as análises do IPA®, os termos relacionados a crescimento celular e proliferação apareceram com maior representação em ambos os MCs, assim como nas análises com a ferramenta do FunRich v3.0. Um total de 70 proteínas (p-value de 3,94E-23) foram atribuídas com esta função no MCA e 71 proteínas (p-value de 6,62E-26) no MCV (apêndice 4), ou seja, mais de 50% das proteínas encontradas apresentam alguma relação com o processo de proliferação celular. Considerando outras funções moleculares encontradas, existem aquelas categorizadas como “Desenvolvimento e Função do Sistema Cardiovascular” (*Cardiovascular System Development and Function*), sendo que os processos biológicos mais representados foram vasculogênese (p-value de 4,83E-19 e 26 proteínas para MCA; p-value de 8,01E-21 e 27 proteínas para MCV) e angiogênese (p-value de 8,57E-18 e 27 proteínas para MCA; p-value de 1,65E-19 e 28 proteínas para MCV) (apêndice 4).

Além disso, esta ferramenta conseguiu determinar a possível ocorrência de algumas redes gênicas para as proteínas encontradas nos MCs. Na figura 4.3C mostramos uma rede ligada ao desenvolvimento e atividade do sistema cardiovascular, na qual destacamos (linhas roxas) as proteínas identificadas no MCV que estão relacionadas a angiogênese (figura 4.3C). Dentre elas, observamos algumas citocinas e quimiocinas no centro da via, o que demonstra sua inter-relação com outras proteínas também relacionadas ao processo de formação de novos vasos sanguíneos.

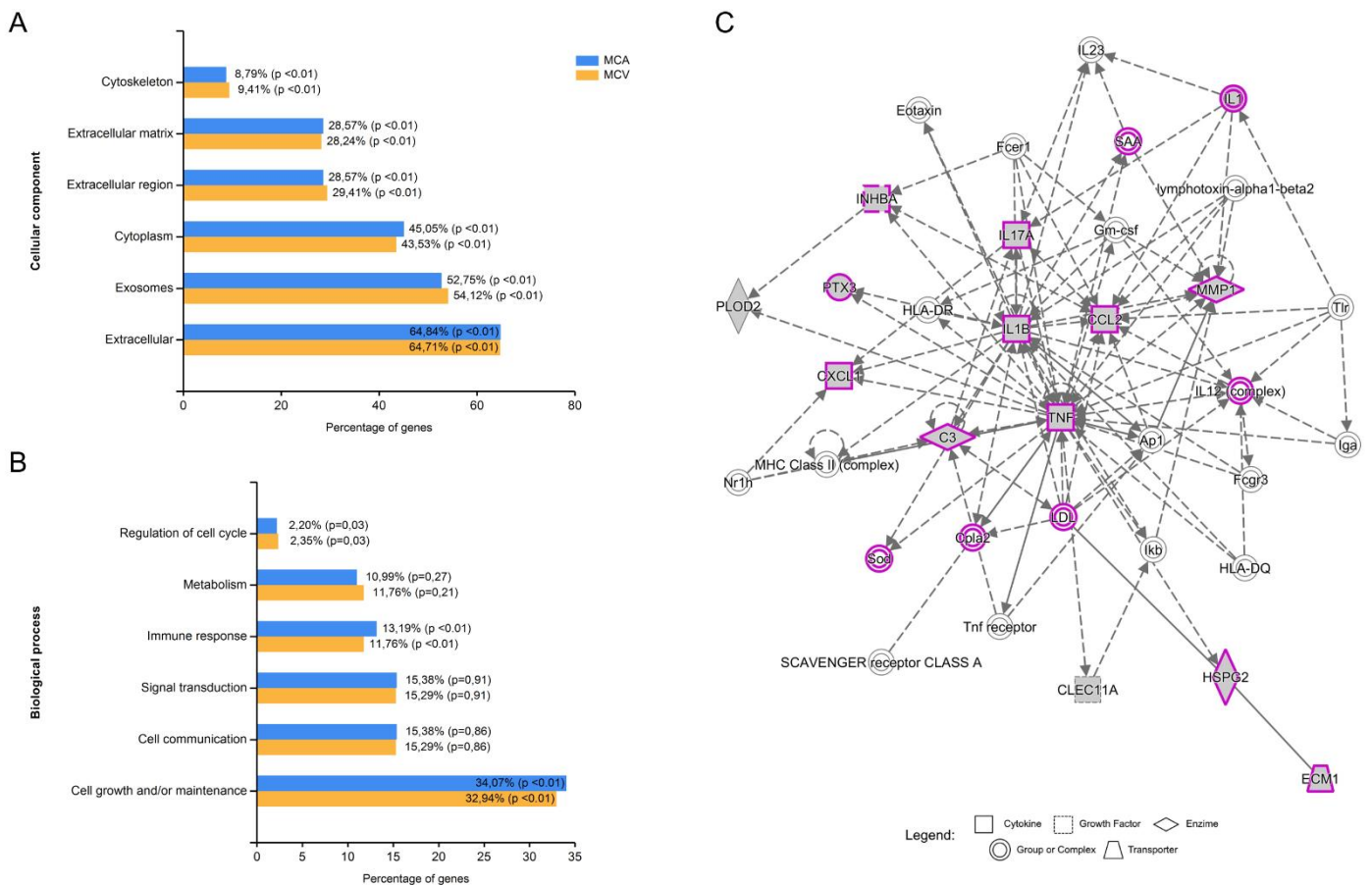


Figura 4.3: Análises de ontologia gênica e funções moleculares com as proteínas identificadas nos MCs. (A) Comparação dos componentes celulares no MCA e MCV. (B) Comparação dos processos biológicos no MCA e MCV. (C) Rede montada com o IPA® a partir dos dados do secretoma do MCV mostrando proteínas relacionadas ao desenvolvimento do sistema cardiovascular e destacando aquelas ligadas ao processo de angiogênese (linhas roxas).

Considerando algumas destas proteínas, existem relatos na literatura demonstrando que a interleucina 1 $\beta$  (IL1B) promove aumento da angiogênese de forma indireta, diminuindo a expressão de angiopoietina 1 e aumentando a expressão de VEGF (FAN *et al.*, 2004). Além disso, a IL1B é um importante ativador de células endoteliais, ativando migração e proliferação destas células, assim como induzindo secreção de outras citocinas relacionadas a angiogênese por células inflamatórias (revisado por VORONOV e CARMÍ e APTE, 2014).

Outra quimiocina em destaque na rede é a CCL2, também conhecida como MCP-1. Em 2000, foi descrito que células endoteliais apresentam o receptor para a

CCL2 (o CCR2) e que elas respondem a esta proteína promovendo a angiogênese (SALCEDO *et al.*, 2000). Trabalhos posteriores confirmaram a informação ao relatar que a MCP-1, provavelmente através da ativação de fatores de transcrição como o Ets-1 (ETS Proto-Oncogene 1, *Transcription Factor*) e o MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-Induced Protein 1*) (NIU *et al.*, 2008; STAMATOVIC *et al.*, 2006), estimularia a produção de VEGF culminando no estímulo da angiogênese (HONG e RYU e HAN, 2005).

O fator de necrose tumoral (TNF) foi outra citocina identificada em nossos dados. Embora ainda exista controvérsia sobre seu papel em estimular ou inibir a angiogênese, alguns trabalhos relataram que a TNF $\alpha$  consegue estimular a formação de novos vasos *in vivo* e que sua ação, possivelmente, depende do tempo de exposição das células a esta proteína (MONTRUCCHIO *et al.*, 1994; SAINSON *et al.*, 2008). Recentemente também foi descrito que a TNF $\alpha$  induz a secreção da glicoproteína LRG1 (do inglês, *leucine-rich-alpha-2-glycoprotein 1*), a qual estimula a angiogênese (WANG *et al.*, 2017).

Além destas, também observamos a presença de proteínas como a ECM1, uma glicoproteína secretada, e o proteoglicano de heparan sulfato, perlecan (HSPG2). Estas duas proteínas podem interagir entre si (MONGIAT *et al.*, 2003; SERCU *et al.*, 2008) e promover a angiogênese (HAN *et al.*, 2001; ZOELLER e WHITELOCK e IOZZO, 2009).

Curiosamente, identificamos no MCV, a proteína eritropoietina (EPO), a qual é uma citocina relacionada, principalmente, com o processo de hematopoiese. O seu receptor é expresso nos eritróides, porém sua presença já foi verificada em células não hematopoiéticas, como as células endoteliais. A EPO, ao entrar em contato com estas células, é capaz de estimulá-las a proliferar assim como a formar novos vasos (KERTESZ *et al.*, 2004; revisado por KIMÁKOVÁ *et al.*, 2017; MÜLLER-EHMSEN *et al.*, 2006).

Desta forma, concluímos que a composição do secretoma do MCA e do MCV é muito similar, sendo composto por proteínas relacionadas majoritariamente com a proliferação celular e com a formação de novos vasos. Portanto, o seguinte foco deste trabalho foi avaliar as potenciais funções biológicas destes MCs, verificando possíveis diferenças funcionais entre eles e relacionando os resultados com os dados de ontologia gênica obtidos.

### 4.3 MC DAS CRCS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Previamente foi observado que, tanto o MCA, quanto o MCV, são capazes de aumentar o número de ADSCs após 7 dias de cultivo. Porém, nestes ensaios prévios, os MCs foram usados em associação com meio de cultivo contendo SFB (REUS, 2014), o que pode mascarar ou alterar a atividade biológica dos MCs. Assim, para verificar de forma distintiva a influência dos MCs sobre os cultivos de ADSCs, optamos por realizar novos ensaios de proliferação utilizando apenas os MCs, ou seja, sem a adição de SFB.

Observamos que o MCA foi capaz de estimular maior proliferação que o MNCr após 3 dias de cultivo, porém, após 7 dias, o MCV induziu maiores índices de células marcadas com Ki67 e maior porcentagem de células EdU positivas (figura 4.4A-C). Esses resultados indicam que, tanto MCA, quanto MCV, são capazes de estimular a proliferação celular, fato que confirma os resultados obtidos com as análises de ontologia gênica.

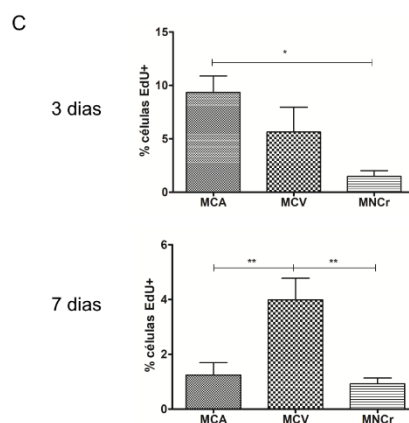
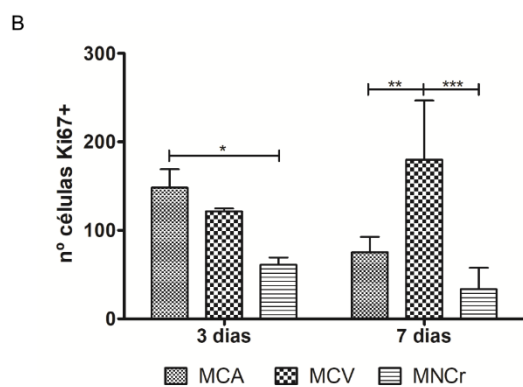
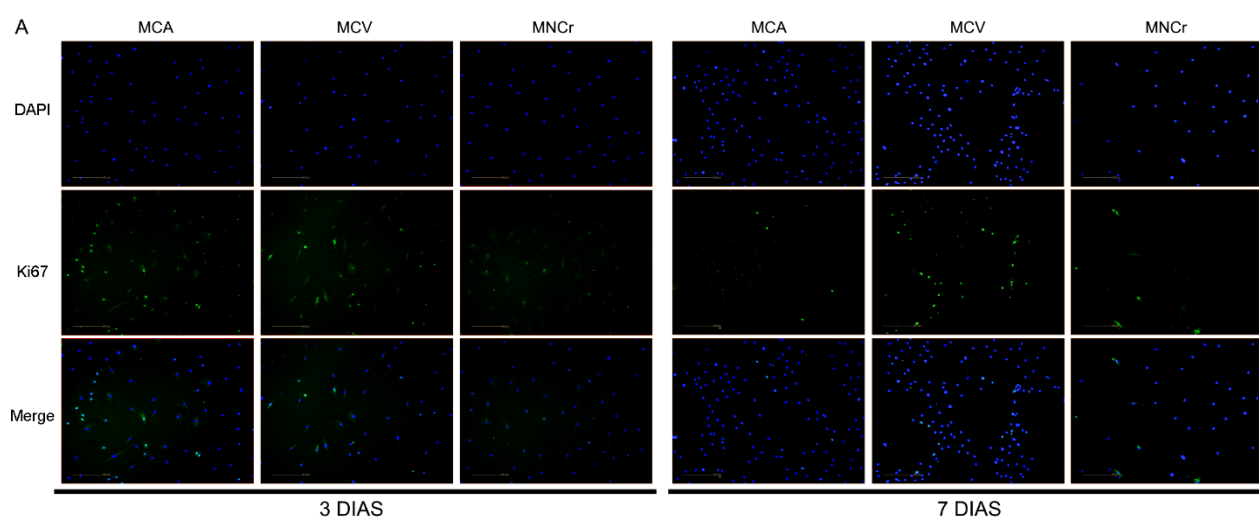


Figura 4.4: Influência dos MCs na proliferação de ADSCs quando comparado ao MNCr. As ADSCs foram cultivadas com MCA, MCV e MNCr e as células positivas para Ki67 e EdU foram avaliadas após 3 e 7 dias. (A) Imagens representativas da marcação para Ki67 e DAPI após 3 e 7 dias. (B) Média do número de células Ki67<sup>+</sup> após os tratamentos (n=3). (C) Média da porcentagem de células EdU<sup>+</sup> após 3 (acima) e 7 (abaixo) dias de cultivo com os MCs (avaliado por citometria de fluxo) (n=3). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Porém, notamos que, apesar dos MCs de aurícula e ventrículo terem uma composição muito semelhante, a resposta induzida nas ADSCs cultivadas com cada um destes MCs foi diferente. Podemos sugerir que este fato se deve a diferença na concentração dos fatores solúveis presentes em cada um dos MCs ou ainda àquelas proteínas identificadas exclusivamente em cada MC. Porém estas possibilidades não foram analisadas neste trabalho, sendo necessário realizar mais estudos para aprofundar esta questão.

#### 4.4 MC DAS CRCS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARDIOBLASTOS

Tendo em vista que isolamos o MC de CRCs com o intuito de caracterizar o microambiente cardíaco, assim como para mimetiza-lo *in vitro*, buscamos explorar se estes MCs influenciariam o comportamento de células do microambiente cardíaco. Inicialmente, avaliamos se os MCs poderiam estimular a cardiomiogênese e a proliferação de uma linhagem celular de cardiomioblastos murinos (células H9c2).

O potencial de diferenciação das células H9c2 foi avaliado após indução por 7 dias com MCA, MCV e MNCr, tendo como controle positivo da diferenciação das H9c2 em cardiomiócitos o cultivo em DMEM contendo 1% de SFB (PAGANO *et al.*, 2004). Após imunomarcação, as análises foram realizadas com auxílio do equipamento Operetta *High content imaging*, que é capaz de analisar cada foto individualmente e nos fornecer a intensidade e a área da marcação dos miócitos troponina I ou T positivos. Pequenas diferenças entre os tratamentos são passíveis de observação em cada uma das imagens da figura 4.5A. A quantificação das imagens demonstrou que, tanto MCA quanto MCV estimularam a diferenciação das células H9c2 de forma similar ao Ctle+, enquanto que o MNCr apresentou uma área marcada menor que todas as outras condições (Figura 4.5B-C).

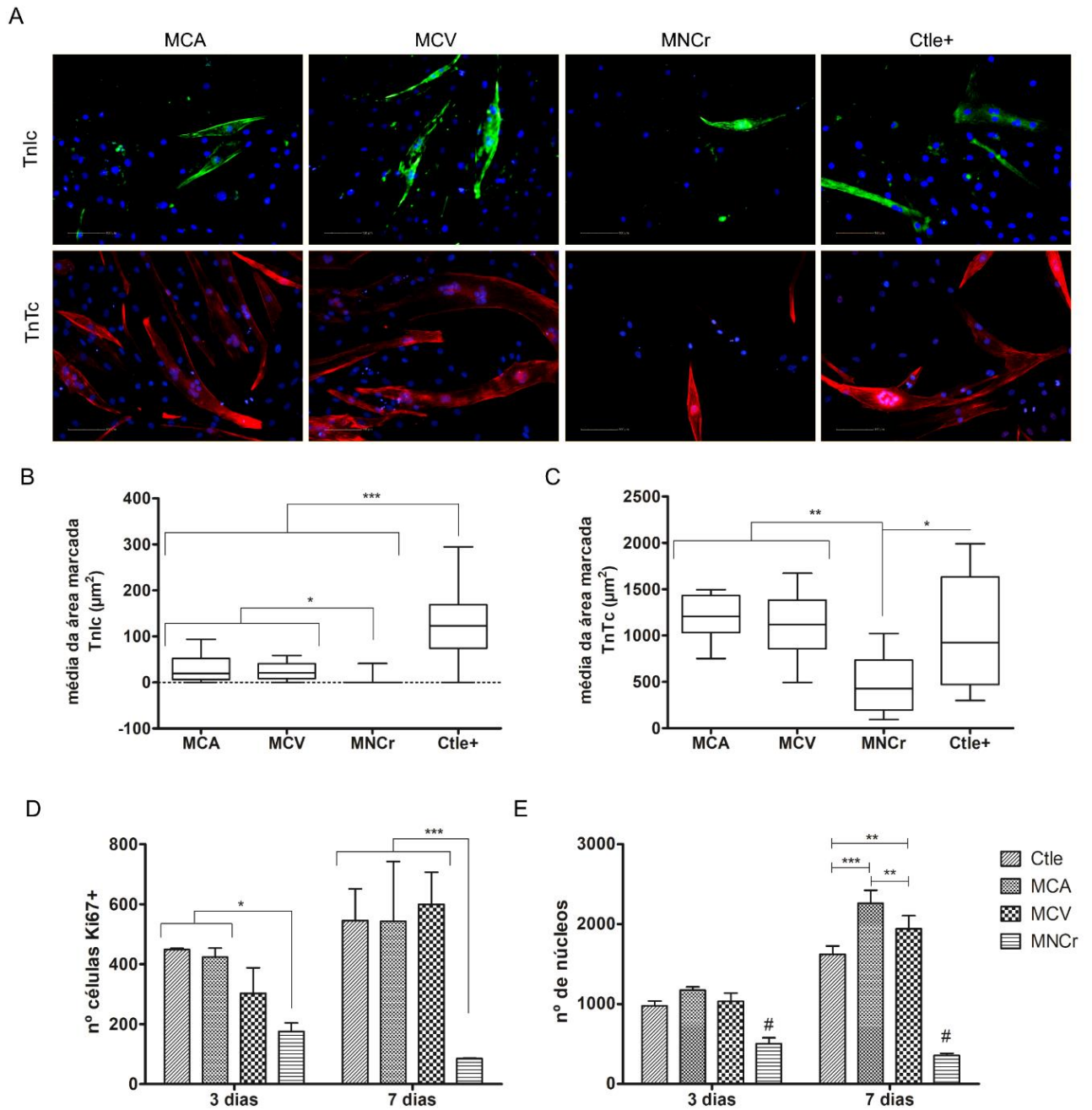


Figura 4.5: Avaliação do potencial de diferenciação e proliferação estimulado pelos MCs e MNCr em células H9c2. A) Imagens representativas da marcação de Tnlc (acima) e TnTc (abaixo) nas células H9c2, após 7 dias sob diferentes tratamentos (colunas). Média da quantificação da área marcada com Tnlc (B) e TnTc (C) (15 e 10 fotos, respectivamente). (D) Média do número de células proliferativas (Ki67<sup>+</sup>) após tratamento com os MCs ou MNCr, por 3 e 7 dias. (E) Média do número de células totais (n° de núcleos) após tratamento com os MCs ou MNCr, por 3 e 7 dias (n=3). Ctle (+) = DMEM 1% SFB. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, # p<0,001 ao comparar o MNCr com as demais condições.

O estímulo da diferenciação de progenitores cardíacos com o uso de MCs também foi apresentado em 2014 por Zhang e colaboradores, em cujo trabalho utilizaram MC de fibroblastos cardíacos de rato para estimular a diferenciação cardiomiogênica de CTMs e de células progenitoras cardíacas (Nkx2.5<sup>+</sup>). Os autores demonstraram que as células progenitoras cardíacas adquiriram fenótipo cardiomiogênico, enquanto que as CTMs não (ZHANG *et al.*, 2014). Isso também foi observado por Reus (2014) com os MCs isolados de CRCs, observando que nem o MCA nem tampouco o MCV estimularam a diferenciação de CTMs em cardiomiócitos (REUS, 2014). Porém, nossos dados demonstram que, quando estes mesmos MCs são cultivados com cardiomioblastos H9c2, estes são capazes de se diferenciar em cardiomiócitos. Além disso, relatos da literatura demonstram que a IL6, uma proteína identificada nos MCs de CRCs, consegue estimular as células H9c2 a adquirirem fenótipo cardiomiogênico (D'AMICO *et al.*, 2016).

Após estas observações, também investigamos a influência dos MCs na proliferação das células H9c2. Similar ao perfil das ADSCs, o MCA estimulou maior proliferação celular com 3 dias de cultivo. Já com 7 dias de cultivo, o número de células marcadas com Ki67 foi muito similar entre os MCs e a condição controle (DMEM com 1% de SFB), mas diferente do MNCr (figura 4.5D). Com relação ao número total de células (nº de núcleos), observamos que em 3 dias de cultivo o MNCr apresentou menos células que os demais tratamentos. Este perfil é mantido após 7 dias de cultivo, onde os MCs passaram a apresentar mais células que na condição controle (figura 4.5E).

Com relação ao potencial proliferativo dos MCs, dados da literatura demonstram que as proteínas secretadas por células progenitoras cardíacas humanas derivadas de neonatos ou isoladas com o marcador W8B2, mostraram-se capazes de estimular a proliferação *in vitro* de cardiomiócitos derivados de ratos neonatos, assim como estimula a proliferação celular *in vivo* após infarto do miocárdio (SHARMA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015). Recentemente, outro importante trabalho foi capaz de demonstrar que micropartículas funcionalizadas para mimetizar as membranas e o MC de células progenitoras cardíacas são capazes de induzir a proliferação de cardiomiócitos *in vivo* e *in vitro*, concluindo que muitos dos efeitos observados com a utilização das células se deve, principalmente, às proteínas secretadas por elas (TANG *et al.*, 2017).



Desta forma, demonstramos com estes experimentos que as proteínas presentes no MCA e no MCV estimulam a cardiomiogênese de células progenitoras, assim como induzem sua proliferação de forma diferente ao MNCr.

#### 4.5 MC DAS CRCS ESTIMULA ANGIOGÊNESE *IN VITRO*

Uma vez que grande parte das células presentes no coração são células endoteliais, analisamos a influência do MCA e do MCV sobre este tipo celular. Para isso avaliamos se os MCs poderiam induzir a formação de novos vasos realizando um ensaio de angiogênese *in vitro*, com células HUVEC, o qual foi acompanhado por 48 horas.

Na figura 4.6A podemos observar estruturas similares a vasos formadas após 12 horas de cultivo com os tratamentos. Visualmente percebemos que o MNCr apresenta menos estruturas definidas. Em seguida, ao realizar a quantificação de nodos de interseção e das estruturas similares a vasos, comprovamos que o MNCr não foi efetivo em estimular angiogênese (figura 4.6B-C). Ainda, ao comparar visualmente as condições após 24 horas (apêndice 5), percebemos que todas diminuíram o número de estruturas semelhantes a vasos. No entanto, o MNCr foi a condição que apresentou mais debris celulares, fato acentuado após 48 horas, quando já não é possível definir qualquer estrutura similar a túbulos nas amostras cultivadas com MNCr (apêndice 5).

Como comentado previamente, muitas das proteínas identificadas nos MCs tem potencial de estimular a angiogênese, conforme confirmado com este ensaio. A formação de novos vasos já foi demonstrada com o uso de MCs de diferentes origens: células-tronco mesenquimais de diferentes fontes (BHANG *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2015), células tumorais (JANG *et al.*, 2016), embrião humano (KAPITEIJN *et al.*, 2006), progenitores cardíacos (SHARMA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015) e outros. É interessante notar que alguns trabalhos usam o MC de CTMs em modelos animais de infarto do miocárdio e observam aumento no número de novos vasos formados, o que, conseqüentemente, melhora a condição do animal (TIMMERS *et al.*, 2011). O mesmo foi observado com o uso de MC derivado de células progenitoras cardíacas (SHARMA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015). Semelhantemente, neste trabalho demonstramos que células cardíacas residentes extraídas do coração humano por cultivo de explante são capazes de secretar fatores estimulantes da proliferação, diferenciação cardiomiogênica e angiogênese.

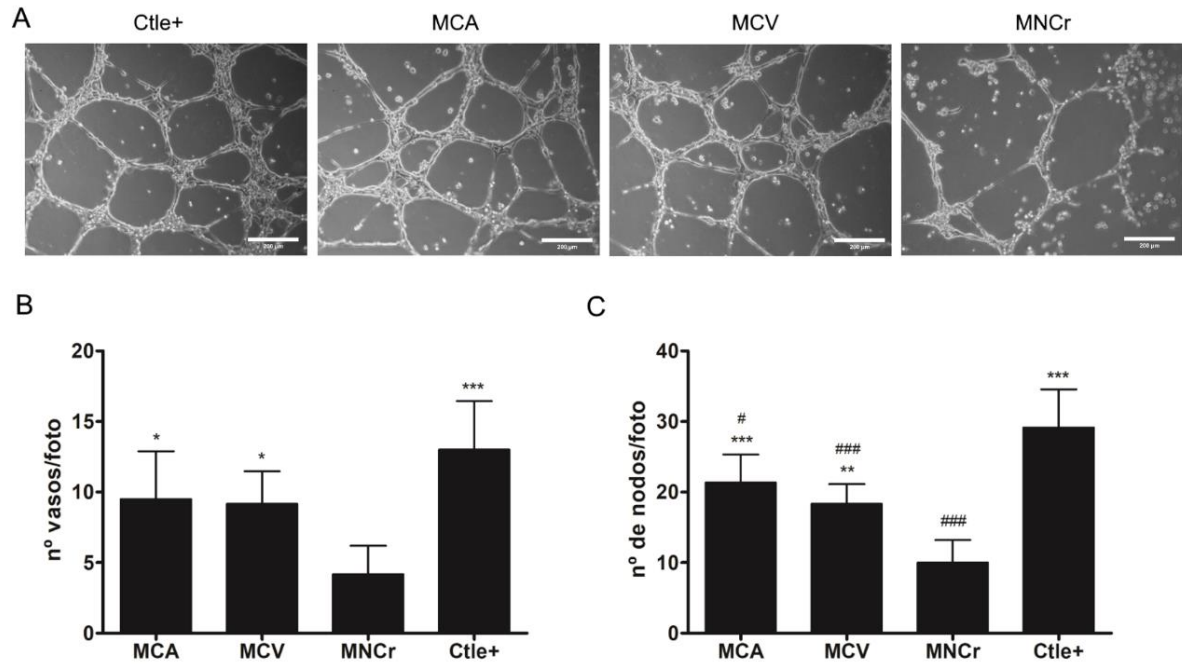


Figura 4.6: Ensaio de formação de estruturas similares a vasos com células HUVECs cultivadas durante 12 horas em uma camada de Matrigel com os MCs. (A) Imagens representativas da formação de estruturas similares a vasos para cada condição analisada (colunas). (B) Quantificação das estruturas similares a vasos formados após 12 h (média do n° vasos/ foto; 6 fotos). (C) Quantificação dos nodos formados após 12 h (média do n° de nodos/ foto; 6 fotos). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ao comparar com o MNCr; # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  ao comparar com o Ctle+ (EBM2 completo).

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO  
FUNCIONAL DOS MEIOS CONDICIONADOS OBTIDOS  
DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO  
CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO  
EMBRIONÁRIAS**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

A segunda etapa deste trabalho teve como objetivo caracterizar os fatores solúveis (meio condicionado) e a matriz extracelular que compõem o secretoma das CTEs durante o processo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro*. A figura 5.1 ilustra o fluxograma dos procedimentos que foram realizados.

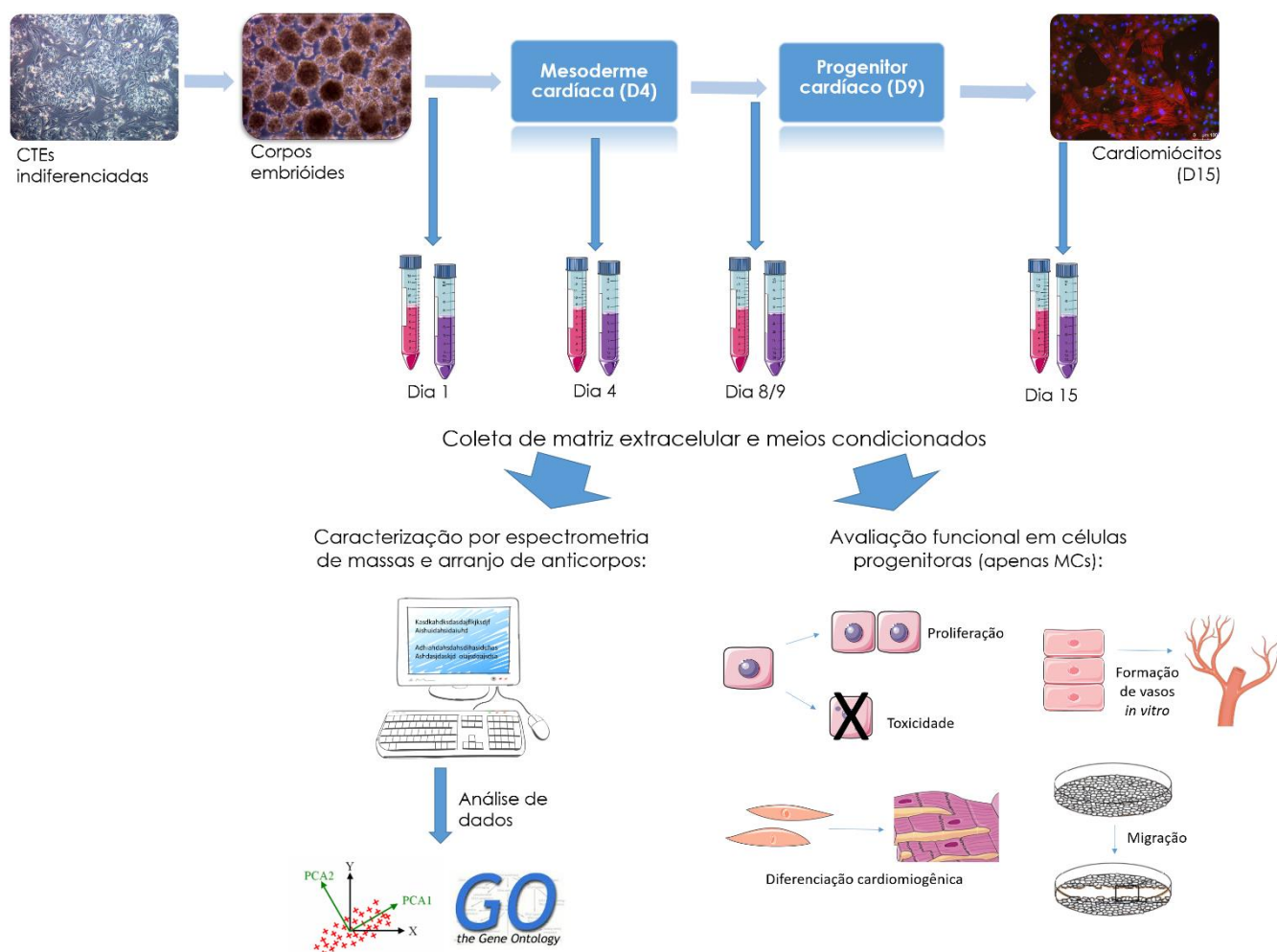


Figura 5.1: Fluxograma representativo dos procedimentos realizados nesta segunda etapa do trabalho. Iniciou-se com o estabelecimento e caracterização do protocolo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro* de CTEs (parte superior da figura). Em diferentes etapas deste protocolo (1, 4, 8/9 e 15 dias) foram coletados os MCs e a MEC para, finalmente, realizar análises funcionais e de caracterização do secretoma celular durante o processo de diferenciação cardiomiogênica.

Para montagem desta figura foi utilizado o acervo de imagens disponibilizado pela *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com/>; Servier, Suresnes, França), do site <https://pt.dreamstime.com> e o artigo de MORENO-BUENO *et al.*, 2009.

Após a padronização e otimização do protocolo de diferenciação cardiomiogênica das CTEs, o processo foi repetido e o MC dos cultivos e a MEC presente nos corpos embrióides (CEs) formados pelas CTEs foram coletados em 4 momentos específicos do processo de diferenciação celular (conforme descrito nos itens 3.5 e 3.6 dos materiais e métodos). Concomitantemente, as amostras seguiram para a caracterização proteômica (por espectrometria de massas e/ou arranjo de anticorpos) e para os ensaios funcionais *in vitro* para avaliação de sua possível função de estímulo a proliferação, migração, angiogênese e diferenciação de células progenitoras.

## 5.2 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

A linhagem de CTE utilizada neste trabalho foi a HES3 (H3), na qual o gene da proteína fluorescente verde (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) foi inserido no locus do gene *Nkx2.5*, um fator de transcrição cardíaco. Desenvolvida por Elliot e colaboradores, esta linhagem modificada facilita a padronização, o acompanhamento e a quantificação da diferenciação cardíaca das CTEs (ELLIOTT *et al.*, 2011). Inicialmente, as células foram cultivadas em Matrigel e meio mTeSR 1, sendo posteriormente adaptadas para o cultivo em MEF. Para confirmar o estado indiferenciado das CTEs, realizamos ensaios de imunofluorescência para visualizar alguns marcadores característicos de células pluripotentes e CTE (THOMSON *et al.*, 1998). Como podemos observar na figura 5.2, as células apresentaram marcação nuclear para o fator de transcrição Oct4, enquanto que para as proteínas de superfície TRA-1-60 e TRA-1-81 a marcação foi pontual ao redor das células. Assim, demonstramos a expressão característica destas proteínas, confirmando o estado indiferenciado das células.

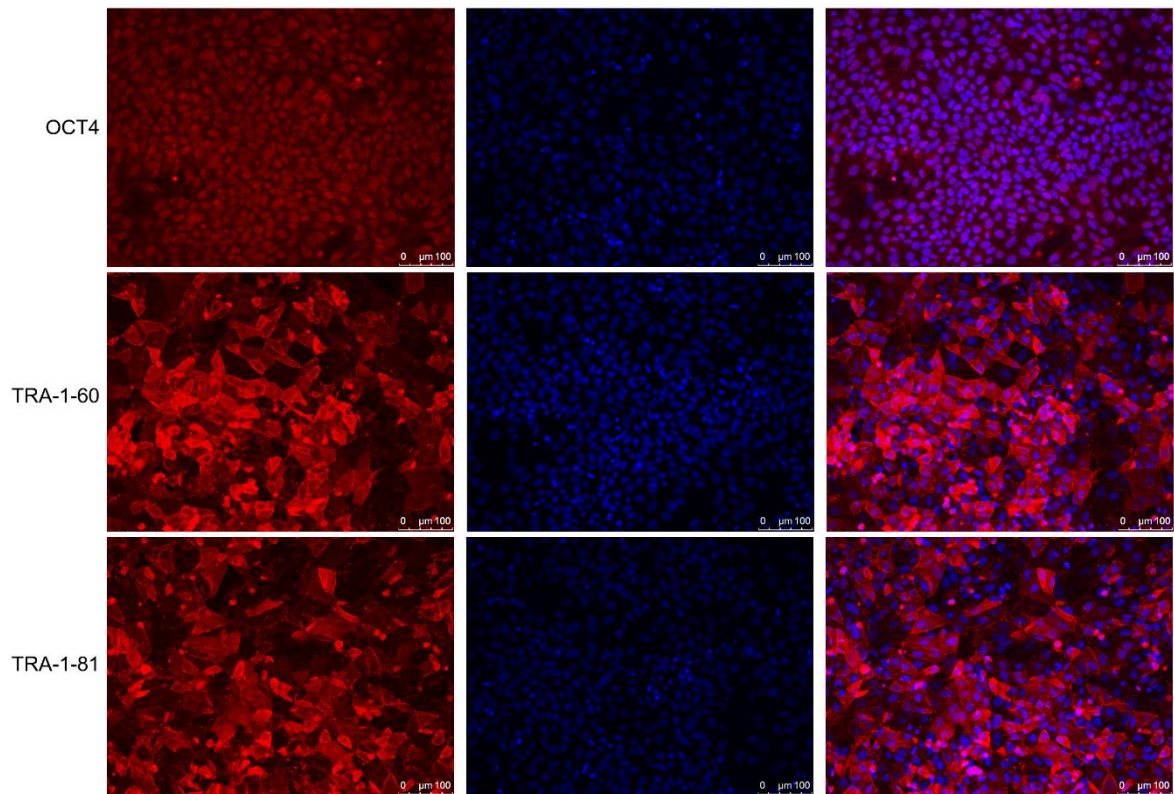


Figura 5.2: Caracterização das CTEs em seu estado indiferenciado. Oct4, TRA-1-60 e TRA-1-81 são utilizados como marcadores para verificar a presença de células-tronco pluripotentes. A primeira coluna mostra a marcação para as diferentes proteínas, indicadas ao lado. A segunda coluna mostra a marcação nuclear com DAPI. A terceira coluna é a junção das imagens anteriores (*merge*). Barra de escala: 100µm.

Outro controle importante e necessário quando são realizados trabalhos com células-tronco, principalmente as pluripotentes, é verificar se as linhagens não possuem nenhuma mutação. Como estas células são mantidas por longos períodos em cultura e tem uma alta taxa de proliferação, podem acontecer alterações de cariótipo, as quais podem alterar os perfis destas células, modificando, por exemplo, seu potencial de diferenciação (FAZELI *et al.*, 2011). Relatos também mostram que diferentes formas de cultivo das células pluripotentes podem ocasionar mutações (JACOBS *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2012). Um estudo desenvolvido em 2011 avaliou uma série de linhagens e cultivos de CTEs e iPSC e demonstrou-se que cerca de 12,5% das culturas apresentaram alguma alteração no cariótipo (TAAPKEN *et al.*, 2011). Assim, para confirmar a ausência de mutações, optamos por realizar uma análise de cariótipo nestas células (realizado em colaboração com o Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-PR). Este apresentou-se normal (figura 5.3), ou seja, sem alterações cariotípicas.

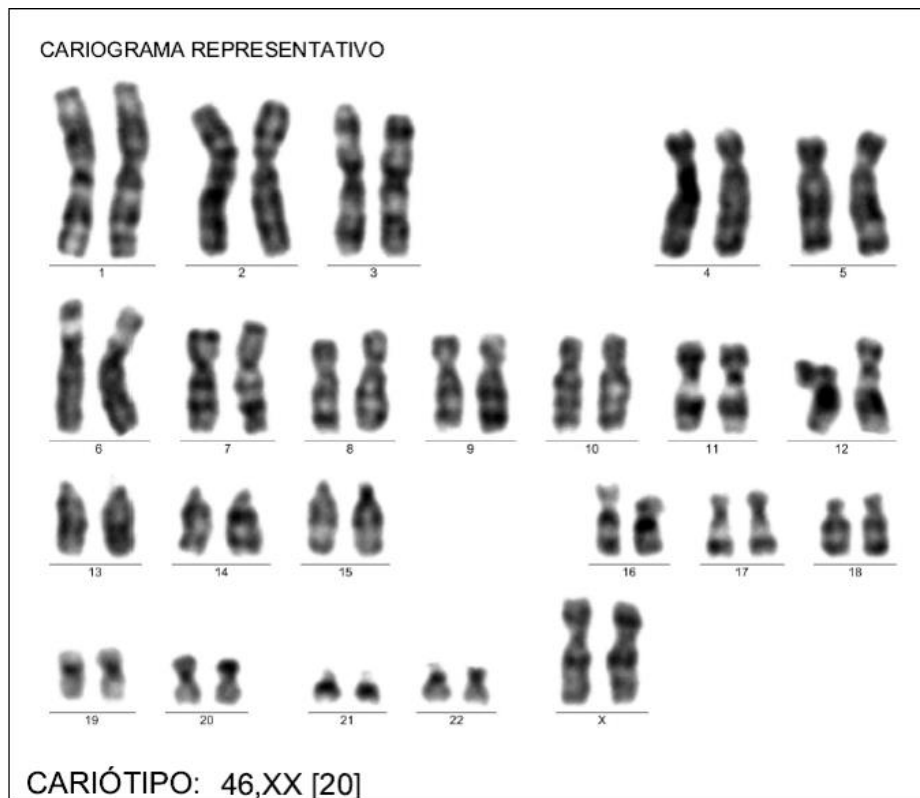


Figura 5.3: Cariótipo da linhagem de células-tronco embrionárias H3-NKX2.5<sup>eGFP/w</sup> presentes no repositório de células do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco do ICC. A cariotipagem foi realizada por bandeamento GTG, para o qual não foram verificadas anormalidades.

Assim, após esta caracterização inicial, com a confirmação da pluripotencialidade e da ausência de mutações, seguimos com a padronização e avaliação do potencial de diferenciação cardiomiogênica destas células.

### 5.3 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

O processo de diferenciação cardiomiogênica de células-tronco pluripotentes já foi descrito por vários grupos com diferentes protocolos (KATTMAN *et al.*, 2011; LIAN *et al.*, 2013). De forma geral, todos tentam mimetizar o processo de desenvolvimento cardíaco *in vivo* através do uso de moléculas sinalizadoras e ativação/inibição de vias de sinalização celular já conhecidas. Neste estudo utilizamos o protocolo padronizado no Laboratório do Dr. Gordon Keller (*University Health Network*, Canadá), no qual as CTEs passam por várias etapas de diferenciação celular que as direcionam para a linhagem cardiomiogênica. São elas: formação de CEs,

indução da diferenciação em mesoderme e, posteriormente, para progenitores cardíacos (KATTMAN *et al.*, 2011). Estas etapas são condizentes com as decorrentes do desenvolvimento cardíaco humano, as quais são relatadas na literatura.

A primeira etapa do protocolo, que envolve a formação dos CEs, é um ponto crítico para o processo de diferenciação celular. Já foi demonstrado que o tamanho dos CEs tem influência no potencial de proliferação e/ou diferenciação das células (VALAMEHR *et al.*, 2008), inclusive durante a cardiomiogênese. Outros grupos já relataram um maior número de CEs apresentando contrações quando estes apresentam tamanho de 300 – 400  $\mu\text{m}$  de diâmetro em comparação com CEs de tamanhos maiores (500 – 800  $\mu\text{m}$ ) (MOHR *et al.*, 2010; NIEBRUEGGE *et al.*, 2009). Também foi observado que, apesar de CEs de 100  $\mu\text{m}$  não apresentarem muita contração, estes possuem quantidade alta de cardiomiócitos (MOHR *et al.*, 2010).

Investigações posteriores em relação ao tamanho dos CEs e seu potencial de diferenciação demonstraram que, quanto maior o CE, menor a porcentagem de células que entram em contato com as citocinas presentes no meio de cultivo e que são capazes de manter concentrações adequadas de oxigênio (WINKLE, VAN e GATES e KALLOS, 2012). Assim, as alterações na porcentagem de células que diferenciam nos CEs, possivelmente ocorrem porque as células têm acesso a concentrações diferentes de citocinas e/ou fatores de crescimento. Sendo assim, consideramos que CEs menores favorecem mais a diferenciação e, desta forma, seguimos este critério em nossos protocolos de diferenciação celular.

No protocolo de diferenciação utilizado neste trabalho, geramos inicialmente agregados celulares pequenos, de 10 a 20 células (dia 0), os quais, após 1 dia de cultivo (dia 1) são capazes de proliferar e formar CEs relativamente pequenos (figura 5.4). Nos dias subsequentes, observamos que os CEs crescem em tamanho e parecem ficar mais densos. Porém, no momento das induções (D1 e D4), os CEs ainda estão com tamanhos reduzidos e, assim, permitindo acesso aos fatores de crescimento adicionados no meio de cultivo.



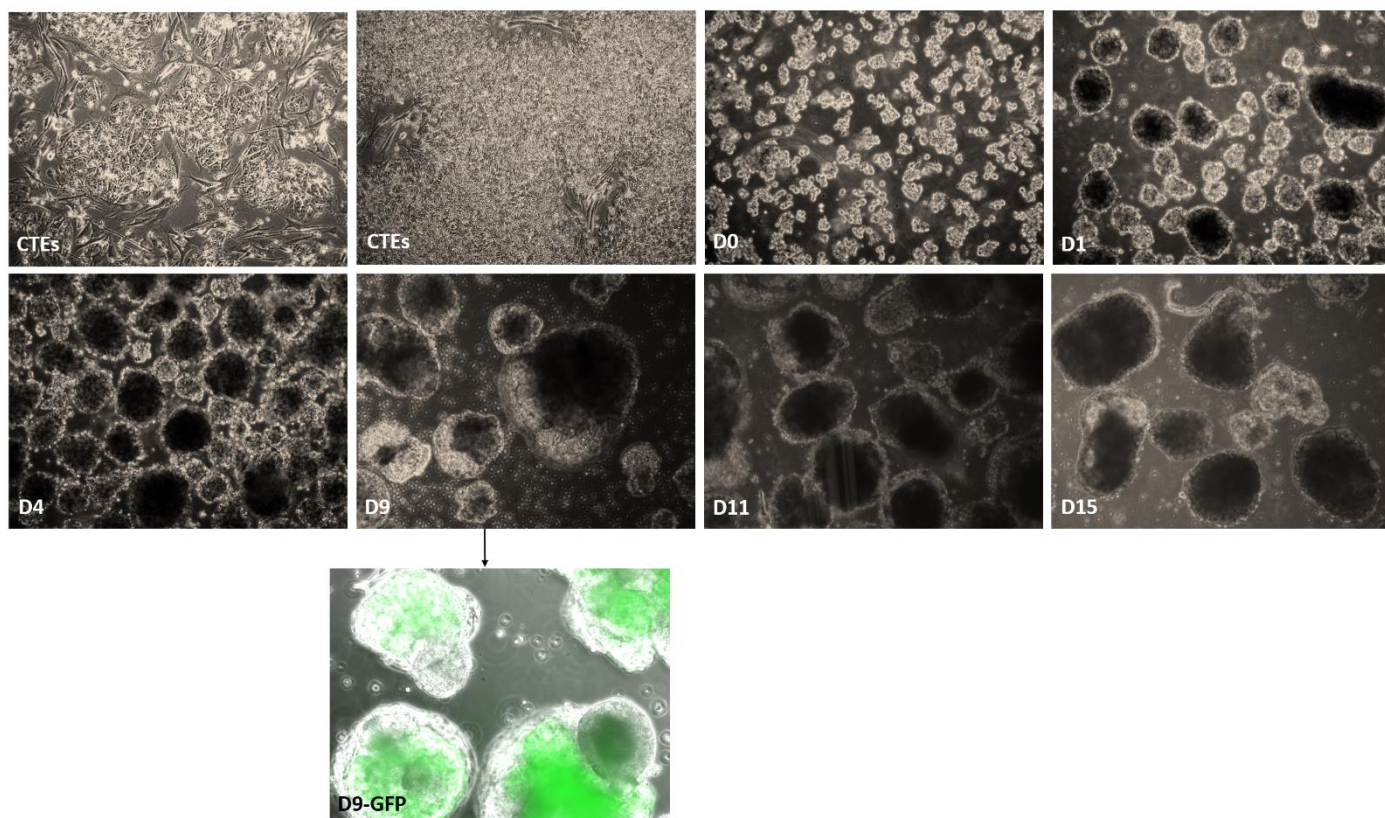


Figura 5.4: Imagens representativas dos corpos embrióides (CEs) durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs. As fotos representam, na ordem: CTEs indiferenciadas, em monocamada, pouco confluentes; CTEs indiferenciadas, em monocamada, confluentes; (D0) início do protocolo de diferenciação, com agregados de 10-20 células; (D1) CEs pequenos, 24hs após o início do protocolo; (D4) CEs no dia 4 da diferenciação; (D9) CEs no dia 9 da diferenciação; com destaque abaixo (D9-GFP) para a expressão de GFP nestas células; (D11) CEs no dia 11 da diferenciação; (D15) CEs no dia 15 da diferenciação.

Embora algumas mudanças sejam visíveis, ao longo do processo de diferenciação realizamos uma série de pontos de checagem, os quais garantem a passagem das células por todas as etapas de diferenciação, além de verificar a eficiência do protocolo. Após a formação dos CEs do dia 0 para o dia 1, as células são induzidas a diferenciarem-se em mesoderme. Após mais 2 ou 3 dias (dia 3 ou 4), as células passam pelo primeiro ponto de checagem, através da verificação da presença da molécula de superfície CD56 (ou molécula de adesão neuronal – NCAM). Em 2010, um estudo mostrou que células expressando CD56 e sem CD326 ( $CD56^+/CD326^-$ ) representam uma população de células progenitoras multipotentes relacionadas a mesoderme, com capacidade para gerar todas as células da linhagem mesodérmica, incluindo os cardiomiócitos (EVSEENKO *et al.*, 2010). A marcação de CD56 em

populações mesodermis já foi utilizada e confirmada por outros trabalhos (CRAFT *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015). Assim, optamos por utilizar a molécula CD56 como um marcador da diferenciação em mesoderme.

A verificação do CD56 foi realizada por citometria de fluxo, sendo possível confirmar que mais de 65% da população induzida a diferenciação apresenta este marcador (figura 5.5A). Neste ponto, o protocolo de diferenciação pode ser interrompido se até o dia 4 as células não atingirem um mínimo de 40% de marcação para CD56, pois isto indica que a população de células mesodermis é baixa e pode afetar negativamente a eficiência de diferenciação final.

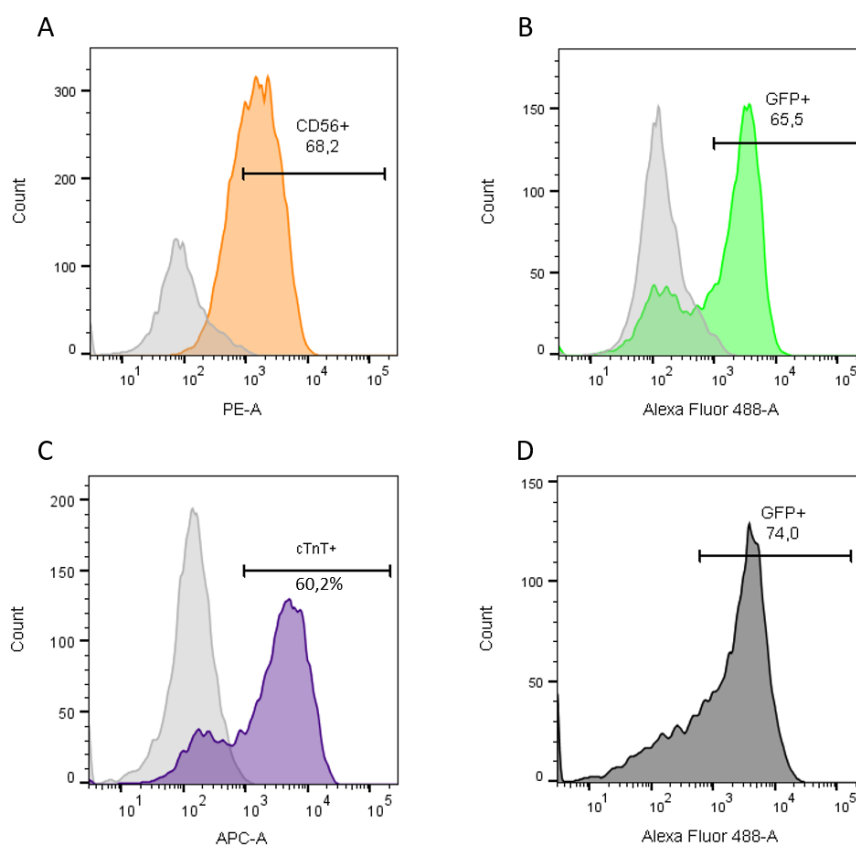


Figura 5.5: Avaliação da expressão de marcadores nos pontos de checagem do processo de diferenciação cardiomiogênica. A) Histograma representando a expressão de CD56 no dia 4 da diferenciação. B) Histograma representando a expressão de GFP (Nkx2.5) no dia 9 da diferenciação. C) Histograma representando a expressão de troponina T cardíaca (cTnT) no dia 15 da diferenciação. D) Histograma representando a expressão de GFP (Nkx2.5) no dia 15 da diferenciação. Histogramas em cinza claro: controles negativos.

Tendo confirmado a diferenciação em mesoderme no dia 4, as células foram incubadas em meio contendo a molécula XAV939, a qual estimula a degradação da  $\beta$ -catenina, inibindo a via Wnt (HUANG *et al.*, 2009). Conhecendo o importante papel

desta via para a diferenciação celular, muitos trabalhos relatam a modulação da via Wnt como forma de diferenciar células-tronco pluripotentes em cardiomiócitos, seja com auxílio de proteínas recombinantes, como Dkk1, ou com outras pequenas moléculas (MINAMI *et al.*, 2012; RAI *et al.*, 2012).

Então, através da inibição desta via nesta etapa do protocolo, as células da mesoderme se diferenciam em células progenitoras cardíacas, as quais tem a capacidade de dar origem a três tipos celulares diferentes: células endoteliais, células de músculo liso ou cardiomiócitos. Estes progenitores expressam fatores como o Isl1 e o Nkx2.5 (ZHOU *et al.*, 2008). Portanto verificar a presença de um destes marcadores constitui o segundo ponto de checagem da diferenciação.

Como as células utilizadas neste trabalho possuem a eGFP associada a expressão do Nkx2.5, foi possível avaliar e acompanhar a presença de eGFP/Nkx2.5 tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência. As análises foram realizadas a partir do dia 9 (D9). Neste momento, consideramos que um protocolo está sendo eficiente quando temos mais de 40% de células eGFP<sup>+</sup>, como pode ser observado na figura 5.5B. Interessantemente, pode-se notar que, muitas vezes, no dia 9, a expressão de GFP está presente apenas em algumas regiões dos corpos embrióides (Figura 5.4).

A partir do dia 10 do protocolo já é possível observar vários CEs contraindo espontaneamente em cultivo, porém esse fenômeno é maior no dia 15 (Vídeo 1, Apêndice 6). Neste dia, os agregados passaram por um processo de dissociação, fixação e, em seguida, imunomarcagem intracelular para visualização da proteína troponina T cardíaca (TnTc). As células foram então analisadas por citometria de fluxo, permitindo a quantificação da diferenciação, que é relativa a eficiência do protocolo. As diferenciações realizadas apresentaram cerca de 50-60% de marcação para TnTc no dia 15 (figura 5.5C). Conjuntamente, avaliamos a expressão de eGFP, a qual apresentou-se maior do que no dia 9 (figura 5.5D).

Adicionalmente, também avaliamos a diferenciação através de imunofluorescência para proteínas e fatores de transcrição relacionados ao fenótipo cardiomiogênico. Para isso, os CEs foram dissociados no dia 15, plaqueados em monocamada, no matrigel, e mantidos por mais 5 – 7 dias em cultura. Neste cultivo em monocamada foi possível observar que as células aderiram e começaram a contrair (Vídeo 2, Apêndice 6). A diferenciação foi então verificada através de marcação por imunofluorescência para os fatores de transcrição GATA-4 e Nkx2.5,

para as proteínas troponinas I (Tnlc) e T (TnTc) cardíacas e para a proteína de junções comunicantes (junções do tipo *gap*) conexina 43 (Cx43) (figura 5.6).

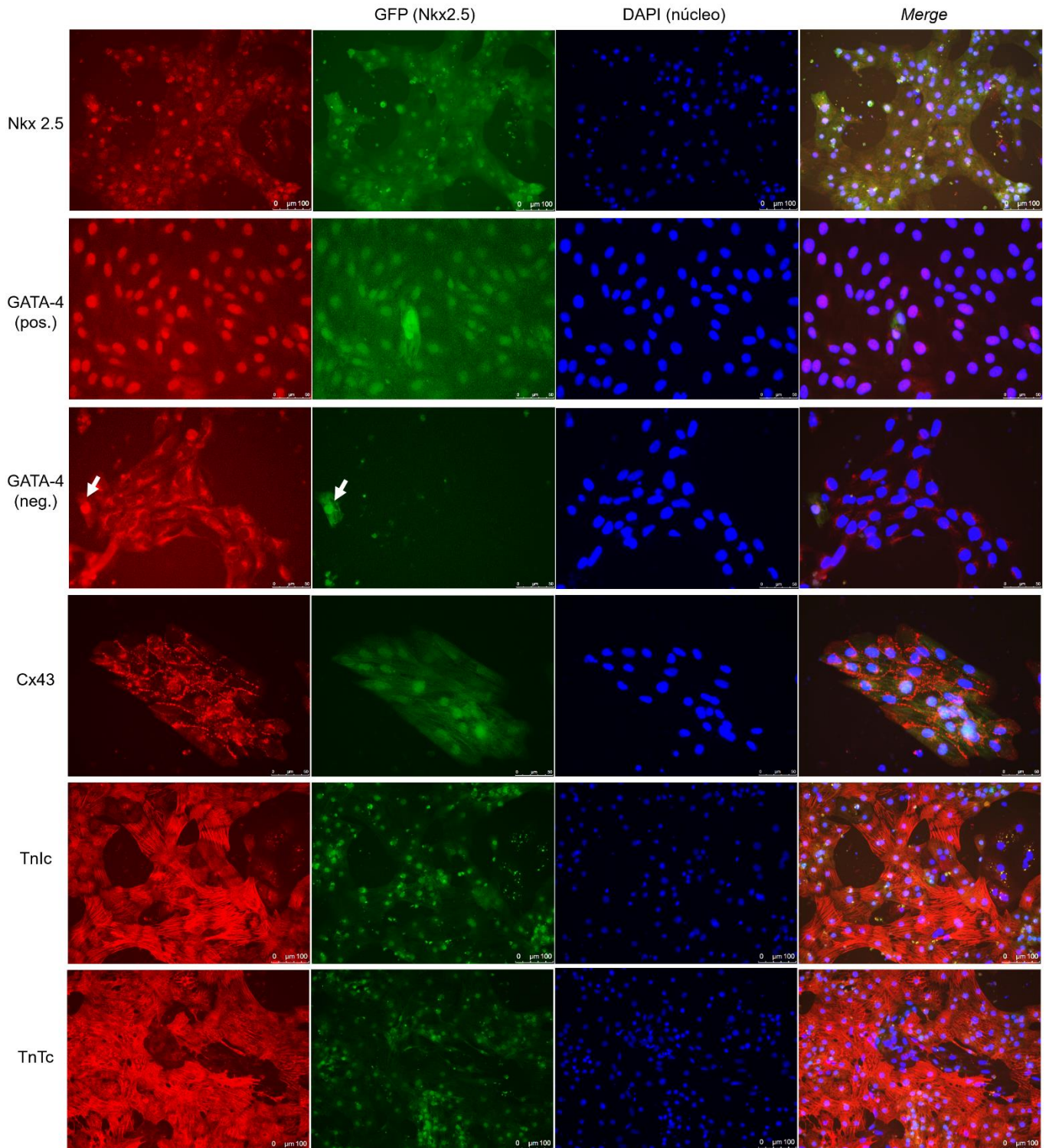


Figura 5.6: Identificação de proteínas relacionadas ao fenótipo cardiomiogênico nas CTEs após indução da diferenciação em cardiomiócitos. A primeira coluna mostra a marcação (vermelho) para as diferentes proteínas, nomeadas ao lado de cada figura. A segunda coluna mostra a expressão de eGFP (verde). A terceira coluna mostra a marcação nuclear

com DAPI (azul). A quarta coluna é a junção de todas as imagens anteriores (merge). Barra de escala: 50µm – 100µm. Na imagem representativa de um campo visual com células que não expressavam eGFP nem GATA-4 (GATA-4 neg.) as setas indicam a presença de apenas uma célula GATA-4<sup>+</sup> eGFP<sup>+</sup>.

Na figura 5.6 podemos visualizar padrões característicos para todos os marcadores: a conexina 43 está presente apenas nas junções célula-célula, as troponinas I e T compoem o citoesqueleto de cardiomiócitos, enquanto GATA-4 e Nkx2.5 encontram-se no núcleo, colocalizando com eGFP. Com as marcações também foi possível observar populações de células que não expressavam GFP nem GATA-4 (figura 5.6, terceira linha), confirmando a especificidade das marcações e da diferenciação celular.

Os CEs podem ser considerados como uma forma de mimetizar *in vitro* o “desenvolvimento do embrião”, uma vez que as CTEs, neste modelo, podem se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (DOETSCHMAN *et al.*, 1985). Embora o protocolo de diferenciação utilizado estimule a cardiomiogênese, evidenciamos que temos uma população de cardiomiócitos em torno de 60%, ou seja, não trabalhamos com uma população 100% pura. Então, na tentativa de caracterizar e conhecer melhor a população de células ao longo do processo da diferenciação e confirmar seu fenótipo, o RNA destas células foi extraído ao longo do processo, nos mesmos tempos de coleta dos MCs (D1, D4, D8 e D15). O nível de expressão de genes característicos de cada linhagem foi então verificado por PCR quantitativa.

As primeiras análises mostraram que o nível de expressão de fatores de transcrição relacionados a pluripotência, como Oct4, Nanog e Rex1 diminuem muito ao longo da diferenciação, confirmando que as células deixaram de ser pluripotentes (Figura 5.7).

Em seguida, avaliamos a expressão de genes relacionados aos três folhetos embrionários: endoderme (FOXA2 e alfa fetoproteína – AFP), mesoderme (eomesodermina – EOMES e Brach – Brachyury) e ectoderme (PAX6 e nestina – NES). Os genes de FOXA2, EOMES e Brach foram mais expressos no dia 4, sendo que o nível de expressão dos dois últimos reduz bruscamente no dia 8, enquanto FOXA2 apresenta expressão reduzida (figura 5.8 A, C-D). Tanto a EOMES (AMEELE, VAN DEN *et al.*, 2012) quanto o Brachyury (FAIAL *et al.*, 2015) são genes característicos de células da mesoderme, momento em que se encontram a maioria das células no dia 4 da diferenciação. Já FOXA2 é um reconhecido marcador de

endoderme (GOLDMAN *et al.*, 2014), apesar de, recentemente, ter sido demonstrado que células progenitoras expressando este gene durante a fase de gastrulação contribuem para o desenvolvimento cardíaco (BARDOT *et al.*, 2017). Os dados verificados neste estudo confirmam este último achado.

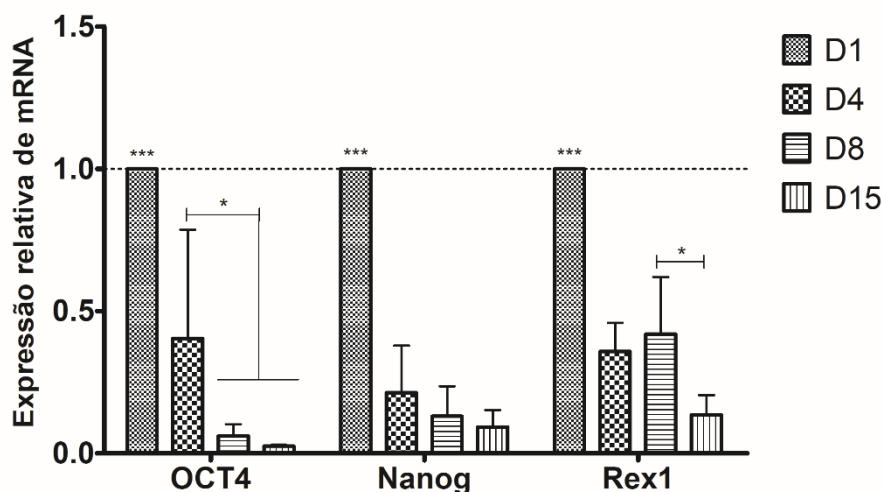


Figura 5.7: Expressão relativa de genes de pluripotência (Oct-4, Nanog e Rex1) ao longo do processo de diferenciação. A quantidade de mRNA para cada gene foi determinada por qPCR e, posteriormente, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito nos materiais e métodos.

É interessante notar a alta expressão de AFP, marcador de endoderme (ABE *et al.*, 1996; GOLDMAN *et al.*, 2014) no dia 8, a qual aumenta ainda mais no dia 15 (figura 5.8B, *fold change* em torno de 250). A AFP é a principal proteína do soro presente durante o desenvolvimento, estando normalmente ausente nos tecidos adultos. Ela é produzida, principalmente, pelo fígado fetal e pelo saco vitelino (JONES *et al.*, 2001), sendo também utilizada como um marcador de especificação da linhagem hepática (hepatócitos imaturos). Ao investigar sobre o processo de diferenciação de hepatócitos *in vitro*, observamos que algumas das moléculas que utilizamos para indução da cardiomiogênese também são utilizadas na diferenciação em hepatócitos, embora em concentrações e momentos diferentes (HANNAN *et al.*, 2013; MALLANNA e DUNCAN, 2013; SILLER *et al.*, 2015). Em 2005, foi relatado a presença de “células similares a hepatócitos” em um protocolo de diferenciação cardiogênica induzida com FGF2. O grupo descreve que estas células estão ao redor de regiões com cardiomiócitos e sugerem que elas secretam moléculas que favorecem a diferenciação (PAL e KHANNA, 2005).

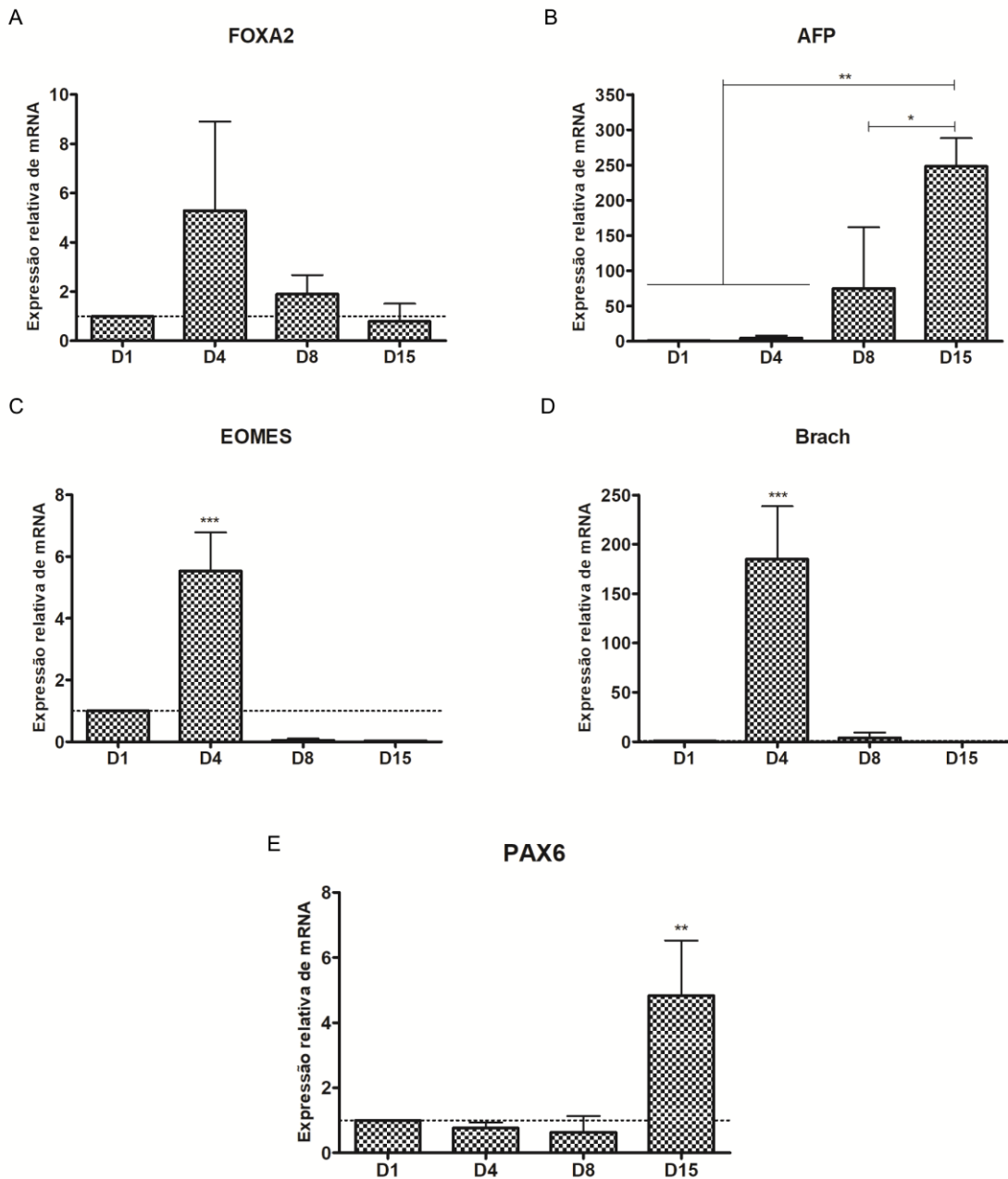


Figura 5.8: Expressão relativa de genes marcadores das linhagens endodermal, mesodermal e ectodermal ao longo do processo de diferenciação cardiomiogênica. A quantidade de mRNA para cada gene foi determinada por qPCR e, posteriormente, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito nos materiais e métodos.

Além disso, um dos primeiros protocolos descritos para induzir a diferenciação cardiomiogênica de CTEs humanas foi através do co-cultivo destas com uma linhagem de células endoteliais (END-2), sugerindo que fatores secretados pelas células endodermais são importantes na diferenciação cardiomiogênica (MUMMERY

*et al.*, 2003, 1991; PASSIER *et al.*, 2005). Recentemente, Giacomelli e colaboradores, utilizando a mesma linhagem de CTEs usada em nosso trabalho (ELLIOTT *et al.*, 2011), estabeleceram condições para a diferenciação simultânea em cardiomiócitos e células endoteliais. Ao analisarmos o protocolo de diferenciação simultânea observamos que, no 3º dia do protocolo, após indução com BMP4, Activina e CHIR99021, é adicionado um meio contendo XAV939 e VEGF. O VEGF é utilizado para induzir a diferenciação em células endoteliais, sendo mantido até o final do tempo do protocolo. Os resultados mostrados com esta metodologia concluem que o VEGF não interfere na formação dos cardiomiócitos e que, em torno de 16% das células são eGFP<sup>+</sup> e CD31<sup>+</sup> (GIACOMELLI *et al.*, 2017). O protocolo utilizado em nosso estudo é muito similar ao desenvolvido pelo grupo, uma vez que após a indução a mesoderme também utilizamos o XAV939 associado com VEGF. Então, é possível que tenhamos obtido alguma contaminação com células de linhagens endodermis, mesmo que sem influência direta na eficiência da diferenciação ou então contribuindo para o processo. Contudo, a confirmação destas hipóteses depende de experimentos adicionais.

Também foi verificado um aumento na expressão de PAX6 (figura 5.8E), fator de transcrição importante na diferenciação de neuroectoderme (ZHANG *et al.*, 2010), enquanto que NES não apresentou expressão diferencial em nenhuma das condições (dados não mostrados).

Finalmente, avaliamos a expressão de mRNAs dos genes cardíacos Nkx2.5, GATA-4, TnTc e Tnlc. Em todos esses casos percebemos um aumento no nível de expressão no dia 8, quando temos uma população enriquecida de progenitores cardíacos, tornando-se esse aumento mais acentuado no dia 15, na população de cardiomiócitos (figura 5.9A-D). Esses dados são compatíveis com os dados obtidos previamente pelo sequenciamento de mRNA obtidos durante a diferenciação cardiomiogênica (Pereira *et al.*, dados não publicados) (apêndice 7), assim como com trabalhos da literatura (DUBOIS *et al.*, 2011; ZWI *et al.*, 2009). Através destes resultados, constatamos que o protocolo de diferenciação cardiomiogênica estabelecido é funcional, induzindo a diferenciação cardiomiogênica de grande parte da população de CTEs.



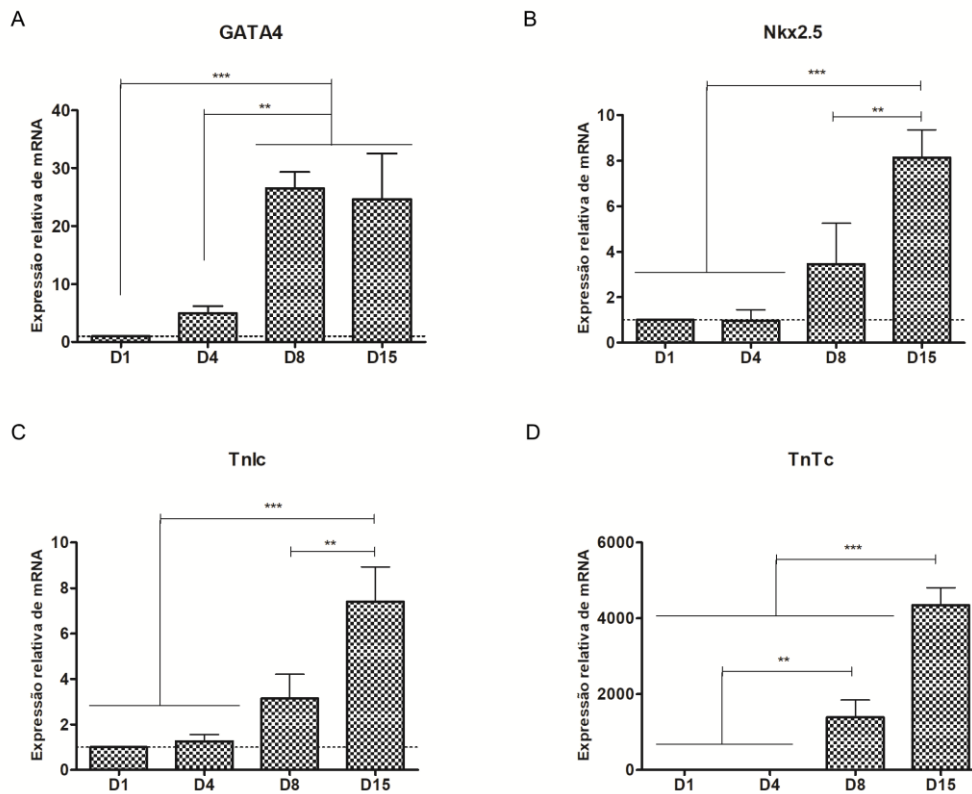


Figura 5.9: Expressão relativa de genes relacionados ao fenótipo cardiomiogênico ao longo do processo de diferenciação. A quantidade de mRNA para cada gene foi determinada por qPCR e, posteriormente, utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito nos materiais e métodos.

Os resultados combinados de expressão de eGFP ao longo da diferenciação, a porcentagem de células expressando TnTc ao final do protocolo, as imunofluorescências e as informações obtidas com a qPCR demonstram que, embora o protocolo de diferenciação seja eficiente e gere uma alta quantidade de cardiomiócitos, a população com o qual trabalhamos não é 100% pura. Inclusive, provavelmente, temos algumas células das linhagens endodermal e ectodermal presentes no dia 15, porém em quantidades menores que os cardiomiócitos.

Outra consideração refere-se a eficiência da diferenciação, a qual varia muito entre os trabalhos publicados, partindo de 30% (LAFLAMME *et al.*, 2007), a 60%-75% (JHA e XU e XU, 2015; KATTMAN *et al.*, 2011), ou ainda, maiores que 80% (BURRIDGE *et al.*, 2014; LIAN *et al.*, 2013). Sendo que alguns chegaram a relatar eficiência de 98% de diferenciação (ZHANG *et al.*, 2012). Quando consideramos o protocolo no qual nos baseamos, a eficiência é muito parecida com o descrito por Kattman e colaboradores (2011). Essas variações se devem a diferenças nos

protocolos e também a linhagem de CTEs ou iPSC utilizadas (MOORE *et al.*, 2008; SA e MCCLOSKEY, 2012). Atualmente continua-se a busca por estratégias mais eficientes de diferenciação, além de estarem sendo pesquisadas técnicas de purificação de cardiomiócitos (revisado por BAN e BAE e YOON, 2017).

Tendo em vista que o protocolo estabelecido se encontra dentro dos padrões de eficiência já relatados na literatura, demos seguimento ao entendimento do microambiente cardíaco durante o desenvolvimento.

#### 5.4 COLETA DOS MEIOS CONDICIONADOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR

Os MCs foram coletados nos dias 1 (MCD1c), 4 (MCD4c), 8 (MCD8c) e 15 (MCD15c) do processo de diferenciação cardiomiogênica. Os dias de coleta são referentes ao dia de troca de meio e a momentos específicos e marcantes do processo de diferenciação: células em corpos embrióides (D1), mesoderme (D4), progenitores cardíacos (D8) e cardiomiócitos (D15). Os meios foram coletados de vários ensaios ao longo do trabalho, porém, para todos os ensaios seguiram-se os mesmos padrões de eficiência de diferenciação. Todas as diferenciações utilizadas para coleta de MC apresentaram marcações altas para CD56 em D3 ( $63 \pm 5\%$ ) e em D4 ( $82 \pm 8\%$ ), alta expressão de eGFP em D9 ( $62 \pm 4\%$ ) e expressão de TnTc em D15 ( $58 \pm 9\%$ ) na maior parte da população celular.

Além dos MCs, também foi coletada a MEC dos CEs através do processo de descclularização dos CEs. Embora existam poucos trabalhos que realizam descclularização de CEs, o processo utilizado se encontra padronizado por outros grupos (GOH e OLSEN e BANERJEE, 2013; NAIR e NGANGAN e MCDEVITT, 2008; SART e MA e LI, 2014). Após a finalização do procedimento, foi preciso confirmar se as amostras estavam realmente descclularizadas. Para isso é preciso demonstrar a redução do conteúdo de DNA da amostra, tanto por dosagem de DNA quanto por marcação com DAPI ou hematoxilina-eosina (CRAPO e GILBERT e BADYLAK, 2011). Entretanto, como não é mais possível definir os CEs após seu processamento e as amostras se tornam muito compactadas, não foi possível realizar a verificação através da marcação com DAPI. Porém, foi realizada a dosagem de DNA, a qual mostrou quantidade de DNA cerca de 90% menor nas amostras descclularizadas em comparação com a amostra controle (figura 5.10), confirmando a retirada da maior parte dos núcleos celulares presentes nos CEs, assim como a eficiência do processo de descclularização.

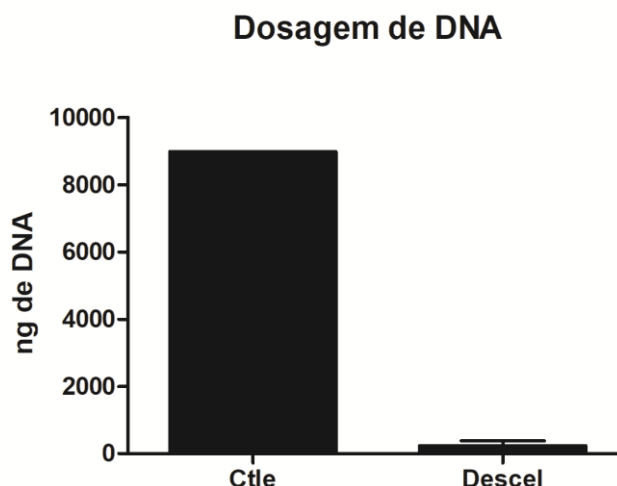


Figura 5.10: Confirmação da descelularização. O gráfico apresenta a dosagem de DNA nos corpos embriões descelularizados (Descel) ou na condição controle (Ctle).

Ao nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que coleta o MC e a MEC durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs com o intuito de caracterizá-los e avaliar seus efeitos sobre cultivos celulares.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MEIOS CONDICIONADOS OBTIDOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

O MC é uma complexa mistura de diversas proteínas, vesículas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, sendo que corresponde ao conjunto de fatores secretados pelas células durante o período em que é coletado (MAKRIDAKIS e ROUBELAKIS e VLAHOU, 2013). Buscando caracterizar as proteínas secretadas durante a diferenciação cardíaca, foi realizada a técnica de imunomarcação através de arranjo de anticorpos.

A escolha das 60 proteínas para compor o arranjo de anticorpos foi baseada nos dados prévios de secretoma cardíaco adulto (REUS, 2014; ROBERT *et al.*, 2017) e em dados de sequenciamento de mRNAs associados a polissomos. Estes últimos foram obtidos recentemente pelo nosso grupo e consideram as mesmas etapas do processo de diferenciação utilizado neste trabalho e o mesmo protocolo de diferenciação (PEREIRA *et al.*, dados não publicados). Abaixo encontram-se os *heatmaps* gerados a partir do log<sub>2</sub> de RPKM (do inglês, *Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) de alguns genes relacionados com proteínas secretadas (figura 5.11).

Mais informações sobre a média da quantidade de leituras (*reads*) de cada gene e os valores do log2 de RPKM podem ser verificados no apêndice 8. Nós buscamos genes que indicassem regulação ao longo do tempo, ou seja, que estivessem com o número de leituras (ou log2RPKM) maior em algum dos tempos em relação aos demais (figura 5.11, apêndice 8).

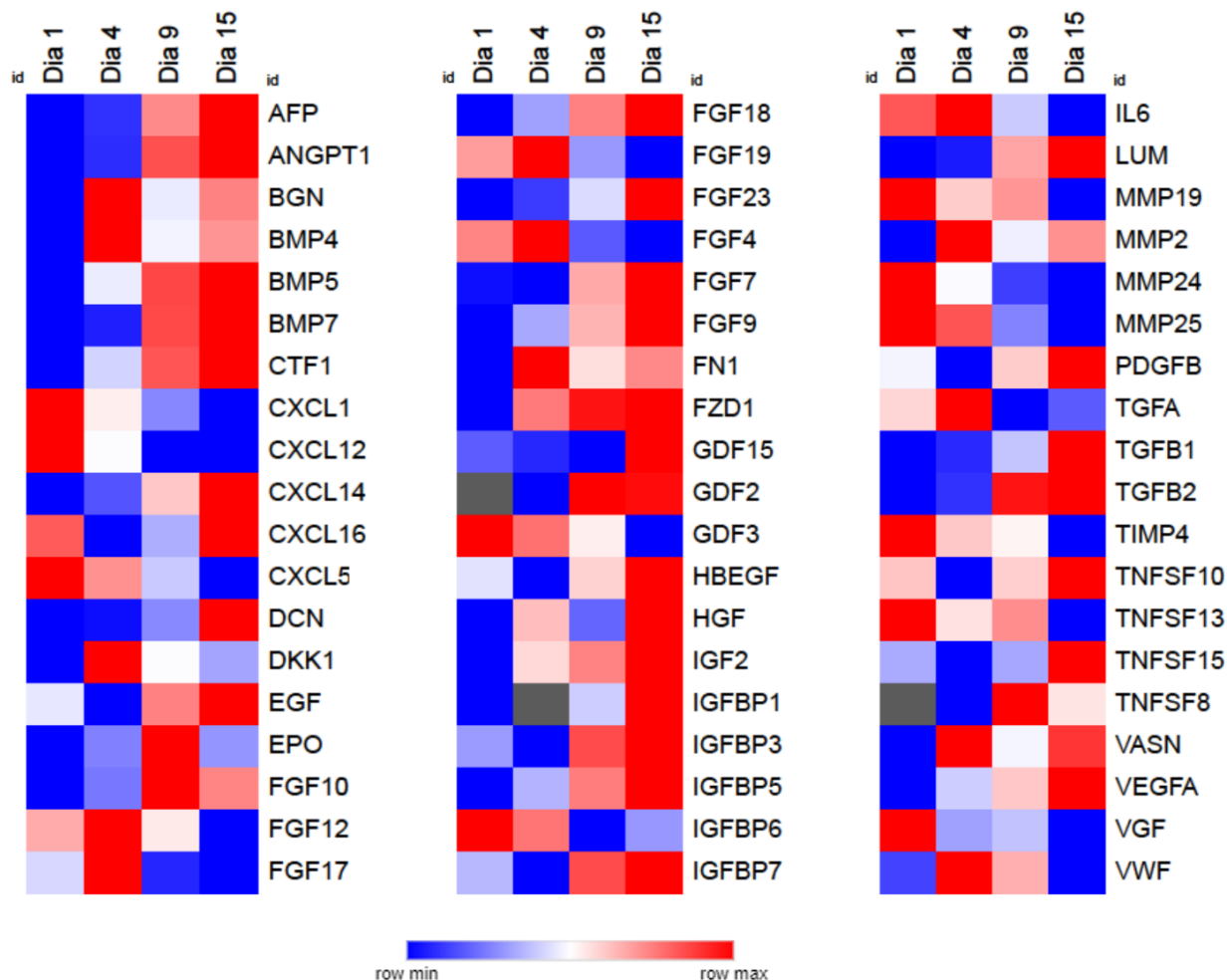


Figura 5.11: *Heatmaps* representativos dos resultados de sequenciamento das proteínas secretadas que foram escolhidas para compor o arranjo de anticorpos. Cada linha representa a intensidade do log2RPKM ( $\log_2$  Reads Per Kilobase per Million mapped reads) de um gene, em cada tempo analisado. As colunas são relativas aos dias de cultivo ao longo do protocolo de diferenciação cardiomiogênica das CTEs. A cor azul indica valores de log2RPKM mais baixos, enquanto os vermelhos indicam valores de log2RPKM mais altos. A cor cinza indica que não houve identificação do gene no sequenciamento. Os *heatmaps* foram gerados com auxílio do software Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>).

Após a seleção das proteínas e a obtenção das membranas com os anticorpos, estas foram incubadas com o equivalente a 7 mg de proteína de cada mistura de MC (utilizado para os ensaios funcionais). Visualmente podemos perceber que alguns pontos se destacam mais que outros e que há diferença entre os MCs e o MNC (figura 5.12). Interessantemente, é possível perceber a presença de 2 pontos mais intensos no MNC (circulado na figura 5.12), além dos pontos relativos aos controles positivos presentes nos cantos superior esquerdo e inferior direito das membranas, e que também estão nos demais meios. A proteína em questão é a vasorina e, portanto, ela foi excluída das análises.

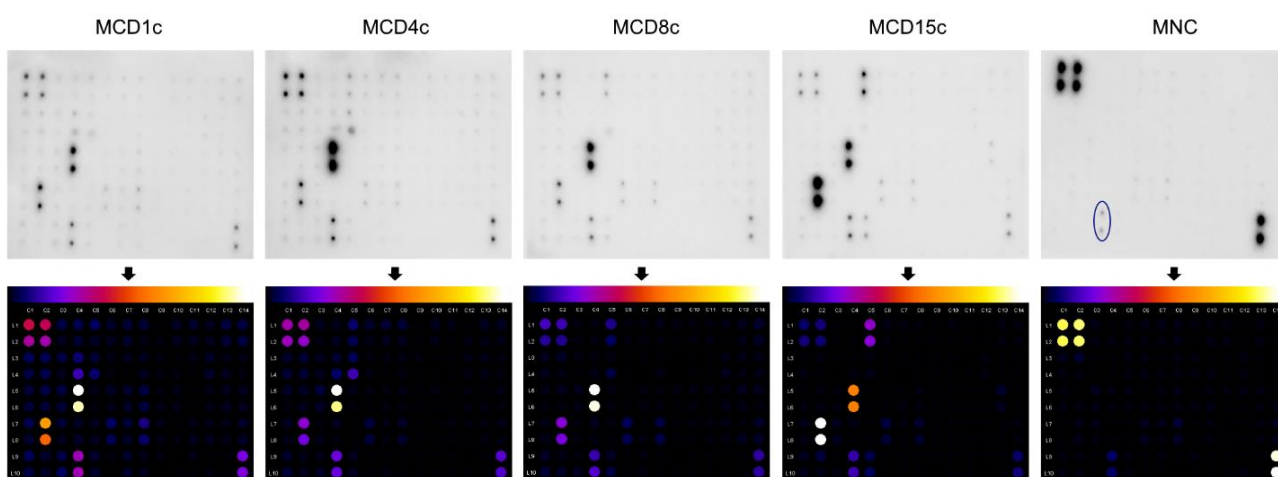


Figura 5.12: Imagens representativas dos arranjos de anticorpos realizados com os meios condicionados e com o meio não condicionado (MNC). Em destaque no MNC (círculo) estão os pontos relativos a proteína vasorina.

Após a revelação, foram realizadas as análises e a quantificação da intensidade de pixels dos vários pontos na membrana. A intensidade final foi calculada diminuindo-se a intensidade de cada MC daquela obtida no MNC. Os pontos que apresentaram valores positivos após esta filtragem inicial foram considerados válidos. Além disso, só estão destacadas na figura 5.13 aquelas proteínas que, em algum dos pontos, apresentaram uma intensidade final maior que 50.

Das 60 proteínas totais, apenas 20 foram consideradas positivamente marcadas, sendo que para MCD1c e MCD4c este número foi de 11 e 13 proteínas, respectivamente. Podemos perceber que a quantidade de proteínas detectadas foi bastante baixa, mas isso pode ocorrer devido a baixa concentração destes fatores de crescimento e citocinas nos MCs. Além disso, embora os genes destas proteínas

tenham sido identificados por sequenciamento, a proteína pode estar presente em baixas quantidades no MC ou ainda não ter sido secretada.

Dentre as proteínas identificadas com maior intensidade temos a fibronectina, com expressão muito similar em todos os MCs, a AFP e a IGFBP7 (proteína ligadora do fator de crescimento semelhante a insulina 7), as quais apresentaram-se mais intensas no MCD15c (figura 5.13A). É interessante notar que a expressão destas proteínas segue o mesmo perfil dos dados obtidos por sequenciamento (figura 5.11, apêndice 8) e, no caso da AFP, também da qPCR.

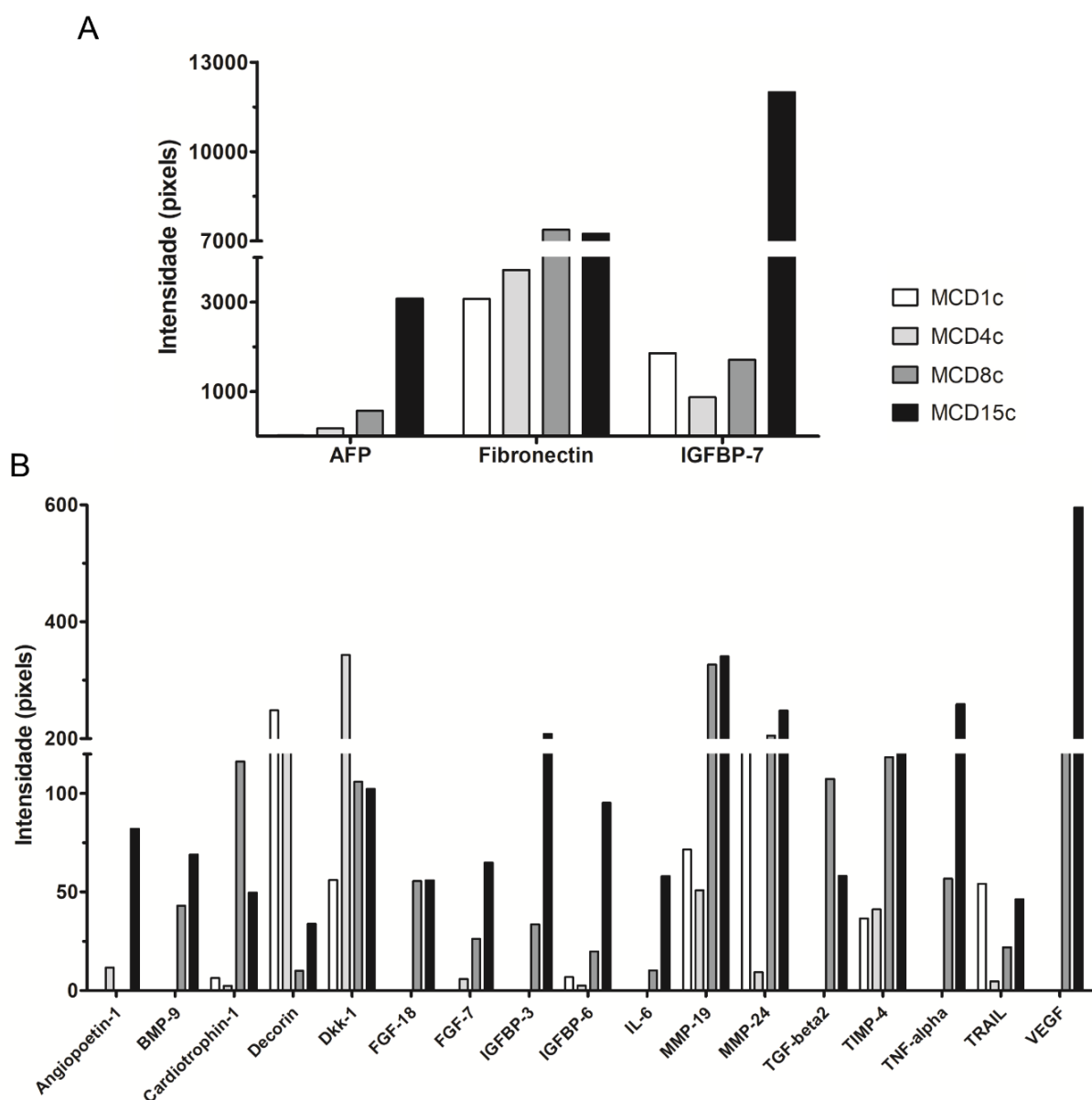


Figura 5.13: Representação das intensidades dos pontos relativos às proteínas identificadas nos arranjos de anticorpos.

Com o intuito de discutir estes resultados, relacionamos algumas das proteínas encontradas na caracterização dos MCs com dados da literatura. A fibronectina (FN), por exemplo, é uma glicoproteína de MEC capaz de formar uma matriz fibrilar ao longo de todos os tecidos, interagindo, principalmente via ligação com integrina  $\alpha 5\beta 1$  (revisado por SINGH e CARRAHER e SCHWARZBAUER, 2010). Sua presença é essencial no desenvolvimento, sendo que sua ausência causa letalidade embrionária precoce (GEORGE *et al.*, 1993). A FN também foi identificada como uma molécula de comunicação entre as células, estando presente em vários tecidos no período de desenvolvimento embrionário (ALMEIDA, DE *et al.*, 2016), além de estar relacionada ao comprometimento celular mesendodermal (CHENG *et al.*, 2013) e ao desenvolvimento do eixo bilateral dos embriões vertebrados (PULINA *et al.*, 2011).

Os resultados mostrados com o arranjo confirmam que as CTEs, durante todos os estágios do processo de diferenciação cardíaca, secretam FN (figura 5.13A), possivelmente como uma condição natural do desenvolvimento. Especificamente sobre o desenvolvimento do coração, foi relatado que o papel da FN está envolvido na morfogênese do trato de saída cardíaca e dos ventrículos direito e esquerdo, provavelmente por mediar a proliferação de progenitores cardíacos da mesoderme visceral (MITTAL *et al.*, 2013).

Outras proteínas encontradas pertencem a família das IGFBPs, proteínas de ligação a IGF, que representa um sinal essencial no desenvolvimento por regular a circulação e presença de IGF nos tecidos (revisado por DUAN e REN e GAO, 2010). Enquanto as IGFBPs1-6 apresentam alta afinidade pelas IGFs (IGF I e II), a IGFBP7 tem alta afinidade por insulina e baixa pelas IGFs (BURGER *et al.*, 2005; COLLET e CANDY, 1998). A IGFBP7, também denominada de angiomodulina (ANG), é descrita como sendo necessária para o processo de cardiomiogênese. Demonstrou-se que a expressão de ANG aumenta ao longo da diferenciação cardiomiogênica de CTEs murinas e que ao silenciá-la há menor expressão de marcadores cardiomiogênicos (WOLCHINSKY *et al.*, 2014). Também já foi relatado sua interação com VEGF, podendo estimular (HOOPER *et al.*, 2009) ou inibir a formação de vasos (TAMURA *et al.*, 2009). Além disso, recentemente foi descrito que esta proteína está associada a hipertrofia e insuficiência cardíaca (CHUGH *et al.*, 2013), podendo funcionar como um biomarcador de doenças correlacionadas (BARROSO *et al.*, 2016; GANDHI *et al.*, 2014, 2016). Baseado nestes dados e nos resultados obtidos neste trabalho, observamos que a IGFBP7 poderia ter alguma função relevante na diferenciação cardíaca e/ou vascular.

Interessantemente, Dkk1 foi encontrado em maior quantidade no MCD4c (figura 5.13B), também concordante com os dados de RNAseq. Dkk1 é um potente inibidor da via Wnt (NIIDA *et al.*, 2004), importante via de sinalização no desenvolvimento embrionário. No caso da cardiomiogênese, a via Wnt tem um efeito bifásico, ou seja, precisa ser ativada no início para o comprometimento a linhagem mesodérmica e, neste ponto, ser inibida para promover a diferenciação a progenitores cardíacos (UENO *et al.*, 2007). Complementar a isso, foi descrito que o fator de transcrição MesP1 (do inglês, *Mesoderm Posterior BHLH Transcription Factor 1*), marcador característico de células da mesoderme, interage com Dkk1, sendo que a expressão reduzida do primeiro diminuiu a presença do segundo (DAVID *et al.*, 2008). O meio coletado no dia 4 é justamente o momento em que a maioria das células estão comprometidas à diferenciação mesodermal, mostrando que, neste ponto, as células produzem Dkk1, possivelmente, encaminhando a inibição da via Wnt. Neste ponto foi adicionado o XAV939, um inibidor químico da via Wnt, o que potencializa o efeito e melhora a eficiência da diferenciação *in vitro*.

Por outro lado, a interleucina 6 (IL6) apresenta um perfil inverso na relação mRNA e proteína. A média do nº de leituras encontrada no RNAseq foi baixa (menos de 60 *reads*) em todos os MCs, porém foi ainda menor no MCD15c (figura 5.11, apêndice 8). Já os dados do arranjo mostram a presença da proteína apenas no MCD8c e, em maior quantidade, no MCD15c (figura 5.13B). A IL6 é uma citocina capaz de ativar células do sistema imune, além de poder ter um efeito cardio-protetor após lesão cardíaca (revisado por FONTES e ROSE e CIHÁKOVÁ, 2015). Também verificamos a presença desta proteína nos MCs derivados de tecido cardíaco adulto (ROBERT *et al.*, 2017) e de CRCs, mostrando que esta é uma proteína produzida por células cardíacas. Trabalhos anteriores descrevem que cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos produzem e secretam IL6 no sobrenadante de cultivo, sendo que em condições de estresse, como hipóxia, aumentam os níveis produzidos desta proteína (ANCEY *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2016; YAMAUCHI-TAKIHARA *et al.*, 1995).

Com relação as demais proteínas encontradas no arranjo observamos que nem todas seguem o mesmo perfil de expressão encontrado nos dados de sequenciamento (figura 5.12B, apêndice 8). Já se sabe que a relação quantidade de mRNA – quantidade de proteína nem sempre é proporcional devido a existência de mecanismos de regulação pós transcricional e pós traducional (SCHWANHÄUSSER *et al.*, 2011; VOGEL e MARCOTTE, 2012), embora novas metodologias estejam



sendo desenvolvidas para melhorar a predição da quantidade de proteína baseado em dados de RNAseq (EDFORS *et al.*, 2016).

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES EXTRACELULARES OBTIDAS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

Para caracterizar a MEC durante a diferenciação cardiomiogênica, os CEs foram desculturizados para promover o enriquecimento destas proteínas e facilitar sua identificação. Em seguida, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas. Considerando todas as amostras avaliadas, foram identificadas 918 proteínas. Este número de proteínas identificadas pode ser considerado alto, uma vez que isolamos a MEC. Porém, ao realizar uma análise de ontologia gênica de componentes celulares, observamos que, na verdade, a maioria das proteínas identificadas está relacionada a partes celulares e organelas (figura 5.14).

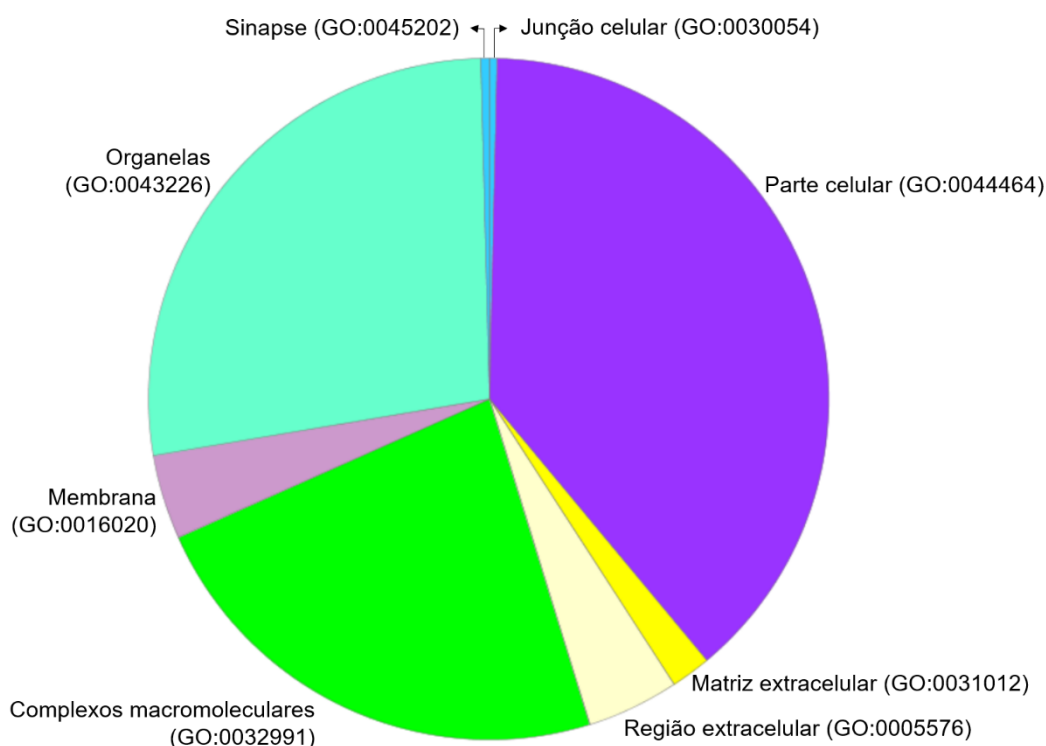


Figura 5.14: Análise de ontologia gênica de componentes celulares das proteínas identificadas nos CEs desculturizados. Análise realizada com o software Panther (<http://pantherdb.org/>).

O fato de um tecido descelularizado apresentar relativamente poucas proteínas de MEC e muitos contaminantes celulares, já foi descrito em outros trabalhos (CALLE *et al.*, 2016; DE CASTRO BRÁS *et al.*, 2013) e previamente também pelo nosso grupo (ROBERT *et al.*, 2017), sendo considerado um desafio na área (CHANG *et al.*, 2016). Porém, considerando que as proteínas de MEC constituem em torno de 1-1,5% do proteoma de mamífero (não considerando variantes de splicing e algumas proteínas associadas), o processo de descelularização auxilia na identificação destas proteínas em diferentes amostras (HYNES e NABA, 2012; HYNES, 2014).

Com relação a descelularização de CEs, este ainda é um processo pouco estudado. Nenhum dos trabalhos já descritos realizou uma caracterização proteômica mais profunda dos CEs, apenas ensaios de imunofluorescência para algumas proteínas de MEC utilizando CEs induzidos a diferenciação espontânea ou neuronal (GOH e OLSEN e BANERJEE, 2013; NAIR e SHUKLA e MCDEVITT, 2008).

Em nossas amostras obtidas durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs conseguimos identificar 46 proteínas de MEC ou relacionadas ao espaço extracelular (figura 5.14, quadro 5.1). Por exemplo, proteínas como colágeno tipo I, IV e VI, diferentes subunidades de laminina, perlecan (HSPG2) e SERPINA B9 foram identificadas em todos os pontos avaliados na diferenciação.

<b>Proteína</b>	<b>MEC_D1</b>	<b>MEC_D4</b>	<b>MEC_D9</b>	<b>MEC_D15</b>
ADAMTS3	ni	ni	ni	X
AGRN	X	ni	X	X
BMP1	ni	ni	ni	X
BMPER	ni	ni	X	X
CER1	ni	X	ni	ni
COL11A1	ni	ni	ni	X
COL18A1	ni	ni	X	ni
COL1A1	X	X	X	X
COL22A1	X	X	X	X
COL2A1	ni	ni	X	X
COL3A1	ni	ni	ni	X
COL4A1	X	X	X	X
COL4A2	ni	ni	X	X
COL4A3	X	ni	ni	ni
COL4A5	ni	ni	X	ni
COL6A2	X	X	X	X
EMILIN1	ni	ni	X	ni
EMILIN2	ni	ni	X	X
FBN1	ni	ni	X	X
FBN3	ni	ni	ni	X

FN1	ni	ni	X	X
FREM2	ni	ni	X	X
GPC2	ni	ni	X	X
GPC3	ni	ni	ni	X
GPC4	X	X	X	X
HAPLN1	ni	ni	X	ni
HPX	ni	ni	X	X
HSPG2	X	X	X	X
ILF3	ni	ni	X	ni
ITGB1	ni	X	X	X
LAMA1	X	X	X	X
LAMA5	X	X	X	X
LAMB2	X	X	X	X
LAMC1	X	X	X	X
LEFTY1	ni	X	X	X
LEFTY2	ni	X	X	X
LTBP1	ni	ni	X	ni
MFAP1	ni	ni	ni	X
MFAP2	ni	ni	X	X
P3H1	ni	X	ni	X
SERPINB9	X	X	X	X
SERPINE1	X	X	ni	ni
SERPINE2	X	X	X	X
THSD4	ni	ni	ni	X
TIMP3	ni	ni	ni	X
WNT11	ni	ni	ni	X

Quadro 5.1: Proteínas de matriz extracelular identificadas por espectrometria de massas. MEC\_D1 = MEC obtida de CEs descelularizados no dia 1 da diferenciação cardíaca. MEC\_D4 = MEC obtida de CEs descelularizados no dia 4 da diferenciação cardíaca. MEC\_D9 = MEC obtida de CEs descelularizados no dia 9 da diferenciação cardíaca. MEC\_D15 = MEC obtida de CEs descelularizados no dia 15 da diferenciação cardíaca. ni = não identificado.

Ao analisar as proteínas identificadas, notamos que alguns componentes da membrana basal, como colágeno IV, lamininas, perlecan e agrina são encontrados em praticamente todos os tempos analisados. A membrana basal serve como uma extensão da membrana plasmática, protegendo os tecidos de estresses físicos e permitindo ligação com o microambiente celular. Essas matrizes começam a ser expressas logo no início da embriogênese e são compostas, principalmente, de lamininas, colágeno tipo IV, nidogênios e proteoglicanos (YURCHENCO, 2011). Estas proteínas são essenciais para o desenvolvimento normal do embrião.

É interessante observar que a laminina se liga a receptores celulares, como integrinas e  $\alpha$ -dístroglicanas, mas também depende de ancoragem lateral fornecida pelos proteoglicanos perlecan (HSPG2) e agrina (AGRN). Esta rede interage ainda com o colágeno de tipo IV, compondo a lâmina basal mais madura (revisado por HOHENESTER e YURCHENCO, 2013; KRUEGEL e MIOSGE, 2010). Trabalhos da literatura relatam que a montagem de uma membrana basal inicial durante as primeiras fases do desenvolvimento depende essencialmente da laminina, porém, em estágios posteriores, a presença de colágeno tipo IV é fundamental para definir integridade, estabilidade e funcionalidade da membrana (POSCHL *et al.*, 2004). A correta montagem desta MEC é importante em todos os tecidos, inclusive no tecido cardíaco (HOLLFELDER e FRASCH e REIM, 2014). Porém, sua importância e função nos CEs carece de investigação. Entretanto, considerando que a diferenciação das CTEs em CEs é uma forma de mimetizar *in vitro* o desenvolvimento natural, confirmamos as informações da literatura de que componentes da lâmina basal estão presentes desde o início do desenvolvimento e são importantes durante todo o processo de diferenciação celular.

Além disso, Bassat e colaboradores, em 2017, demonstraram que a agrina estimula a proliferação de cardiomiócitos de cultivo primário e a diferenciação de células-tronco pluripotentes. Porém, ela também é capaz de atrasar a maturação destas células. Além disso, os autores observaram que a administração de agrina após infarto induz melhora dos animais tratados (BASSAT *et al.*, 2017).

A FN, no entanto, foi identificada apenas na MEC do dia 9 e do dia 15, diferentemente do observado nos MCs. Essa aparente discrepância pode ter vários motivos, dentre eles: (1) os parâmetros escolhidos para análise foram estritos ao ponto de ter eliminado algumas proteínas; (2) a FN pode não ter sido identificada pela espectrometria de massas devido a sua baixa concentração ou por dificuldades de solubilização; (3) nos dias 1 e 4 a FN poderia ser, em sua maior parte, solúvel, então não conseguiríamos identifica-la pela análise da MEC; e/ou (4) o processo de descelularização pode ter acarretado a perda desta proteína.

Entre algumas proteínas relacionadas ao espaço extracelular, encontramos por exemplo, os fatores de determinação bilateral 1-2 (Lefty1-2), os quais estão associados com todas as matrizes dos CEs, exceto a do dia 1 (quadro 5.1). Como o nome sugere estas proteínas são responsáveis por determinar a assimetria do embrião, principalmente através da limitação da expressão da via Nodal (HAMADA *et al.*, 2002; revisado por LEVIN, 2005; MENO *et al.*, 1998). Essa assimetria é importante

inclusive na mesoderme cardíaca para a determinação da localização e correto dobramento das estruturas do coração, sendo que defeitos nesta sinalização estão associados a malformações cardíacas congênitas (revisado por RAMSDELL, 2005).

Apesar de não termos avaliado experimentalmente as possíveis funções das proteínas de MEC em ensaios celulares, podemos sugerir que suas presenças e modulações temporais nos CEs ao longo da diferenciação sejam importantes para o processo de aquisição do fenótipo cardiomiogênico das CTEs.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA VIABILIDADE E NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Com o objetivo de testar possíveis sinais dos MCs em cultivos celulares, decidimos primeiramente avaliar sua toxicidade quando cultivados com ADSCs, células H9c2 ou HUVECs. Estes testes foram realizados através do ensaio de captação do vermelho neutro (VN), o qual indica a viabilidade celular relativa nos fornecendo informações preliminares a respeito da citotoxicidade dos MCs.

Na literatura encontramos protocolos que avaliam os efeitos dos MCs associando-os a meios novos ou SFB em diferentes proporções (OH *et al.*, 2017; YOUSEF *et al.*, 2014). Muitas vezes isso é feito em virtude da citotoxicidade presente nos MCs. Neste trabalho, consideramos utilizar diluições dos MCs uma vez que as CTEs são altamente proliferativas e, portanto, consomem bastante os nutrientes dos meios de cultivo. Então, antes de iniciar os ensaios funcionais, testamos uma série de diluições dos MCs para descobrir qual seria a melhor proporção para trabalhar. Inicialmente os experimentos foram conduzidos com ADSCs. Os testes foram realizados com meio DMEM contendo 5% de SFB ou DMEM sem SFB e com o MCD1c e MCD8c puros. Utilizamos as seguintes proporções: 25% de DMEM para 75% de MC, 50% de DMEM para 50% de MC e 75% de DMEM para 25% de MC. Curiosamente, os resultados com o meio contendo 5% de SFB seguiu o mesmo perfil do experimento utilizando apenas o meio sem SFB (Figura no apêndice 9). Assim, tendo em vista que a presença de SFB não alterou o comportamento celular em comparação a ausência deste, optamos pelo meio sem SFB, uma vez que a composição deste não é conhecida, varia de acordo com o lote e pode levar a resultados não relacionados apenas ao MC.

Como forma de confirmação, o ensaio foi repetido com células ADSCs e H9c2 utilizando-se apenas DMEM sem SFB (Figura 5.15A-B). Observamos que o MCD8c

puro diminuiu a viabilidade das células, porém ao diluí-lo em um pouco de meio novo (proporção 25:75) as células já apresentaram um comportamento mais parecido com o cultivo em DMEM sem SFB, condição na qual as células ainda mantêm-se viáveis em cultivo. Desta forma, comprovou-se que, para os dois tipos celulares, a melhor condição foi a de 25% de DMEM sem SFB para 75% de MC (MCD1 ou MCD8 25:75).

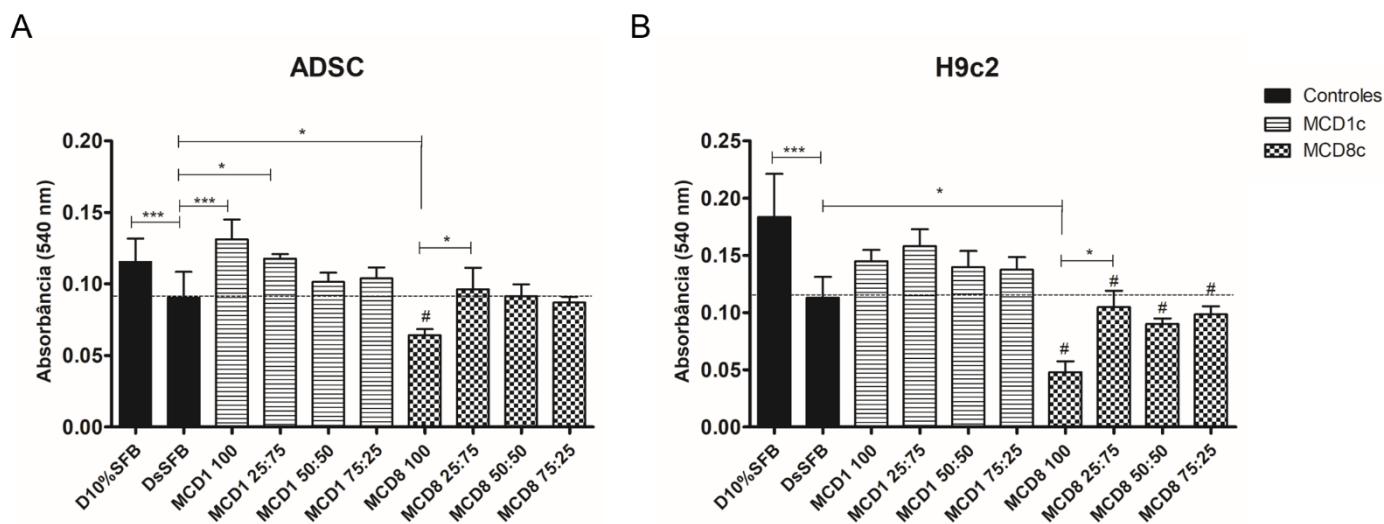


Figura 5.15: Padronização da proporção de meio condicionado a ser utilizado nos ensaios funcionais. Os gráficos mostram os níveis de absorbância do vermelho neutro, indicando a viabilidade celular relativa dos cultivos. As proporções testadas estão dispostas nos gráficos de forma que a proporção do DMEM é indicada antes da do MC (%DMEM: %MC). A) Média da absorbância dos cultivos de ADSCs com proporções de DMEM sem SFB e MC. B) Média da absorbância dos cultivos de células H9c2 com proporções de DMEM sem SFB e MC.

Após esta padronização inicial, seguiu-se ao experimento de viabilidade com todos os MCs e o MNC, para os três tipos celulares. Para facilitar a visualização e comparação dos efeitos dos MCs, optamos por representar graficamente a porcentagem da viabilidade (razão em relação ao Ctle<sup>+</sup>, ou seja, DMEM com 10% SFB para ADSCs e H9c2, EBM2 completo para HUVEC). Em todos os casos, o MCD1c apresentou viabilidade relativa igual ao controle positivo e melhor que o MCD8c, MCD15c e MNC (5.16A-C). Nos cultivos com ADSCs, as demais condições não apresentaram diferenças significativas nem em relação ao controle positivo, nem em relação ao MNC. Já com relação as células H9c2 e HUVEC observamos que o MCD4c apresentou diferenças em relação ao MCD8c e ao MNC (figura 5.16B-C). Além disso, observamos que o MNC, MCD8c e MCD15c também foram diferentes se comparados

ao Ctle<sup>+</sup>. É importante lembrar que os MCs e o MNC não contêm SFB, diferente dos controles. Então, apesar desta redução na viabilidade celular relativa das células H9c2 e HUVEC com alguns dos tratamentos, de forma geral, concluímos que todos os MCs mantêm os cultivos celulares com no mínimo 60% de viabilidade. Também é possível perceber que a resposta aos MCs pode variar dependendo do tipo celular utilizado, assim como, aparentemente, influenciam o comportamento celular de alguma forma.

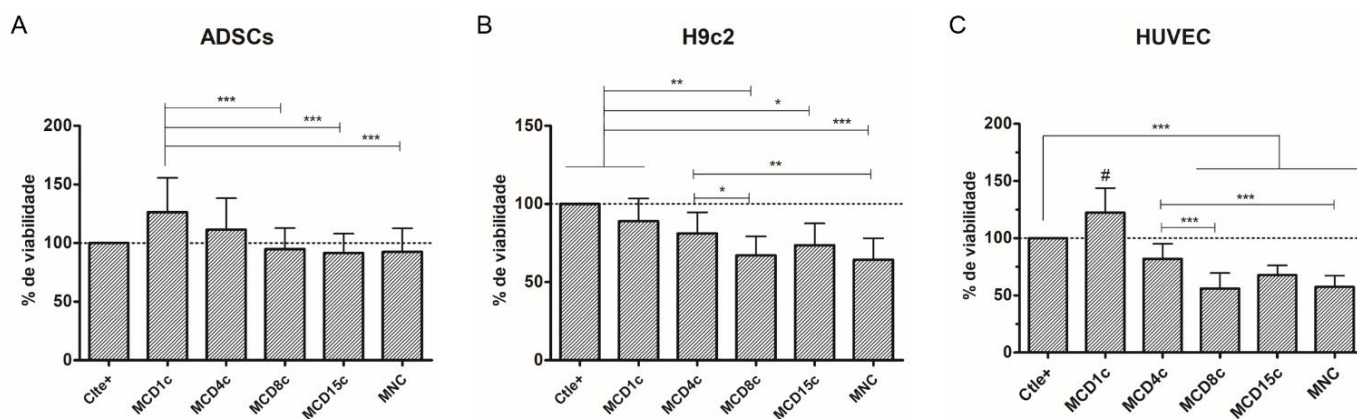


Figura 5.16: Viabilidade celular relativa dos cultivos celulares com os MCs. Gráficos representativos de ADSCs (A), de células H9c2 (B) e HUVECs (C) quando tratadas com os meios condicionados na proporção de 25% DMEM sem soro: 75% de MC (% de viabilidade em relação ao Ctle<sup>+</sup> específico para cada célula). # indica que o MCD1c tem  $p < 0,001$  quando comparado com todos os MCs, exceto Ctle<sup>+</sup> (EBM2). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Buscando aprofundar os resultados observados nos ensaios de viabilidade celular relativa, realizamos ensaios para avaliação da proliferação celular com ADSCs e células H9c2. O ensaio seguiu os mesmos tempos e parâmetros utilizados no ensaio do vermelho neutro. Após a finalização do período de contato com o meio condicionado, as células foram fixadas e marcadas com anticorpo anti-Ki67 e com DAPI. O Ki67 é uma proteína que está presente em todas as fases ativas do ciclo celular, mas ausente nas células em G0, tornando-o um marcador de proliferação (SCHOLZEN e GERDES, 2000). A obtenção das imagens e as análises foram realizadas com equipamento Operetta *high Content screening*. Este tipo de equipamento combina a eficiência de sistemas *high-throughput* com obtenção de imagens e análises quantitativas, podendo ser utilizado para uma série de ensaios (MARTIN *et al.*, 2014; ZANELLA e LORENS e LINK, 2010).

Quando avaliamos a proliferação das ADSCs com os MCs, os resultados mostram que o número de núcleos é maior no controle positivo e no MCD1, enquanto que nas demais condições o número se mantém constante (figura 5.17A). Porém, quando avaliamos o percentual de células em proliferação, baseado na marcação do Ki67 em relação ao número de núcleos, vemos uma grande diferença entre os tratamentos (figura 5.17B). Os MCs dos dias iniciais (MCD1c e MCD4c) mostram maiores níveis de células proliferantes Ki67<sup>+</sup> quando comparados com o MNC e os meios dos dias finais da diferenciação (MCD8c e MCD15c). Apesar disso, o meio de D15 foi capaz de induzir a presença de células Ki67<sup>+</sup> em percentual estatisticamente maior que o MNC, indicando que estimula as ADSC a proliferar. Assim, com esses dados, podemos inferir que o meio de D8 e MNC promovem uma baixa taxa de proliferação das ADSCs.

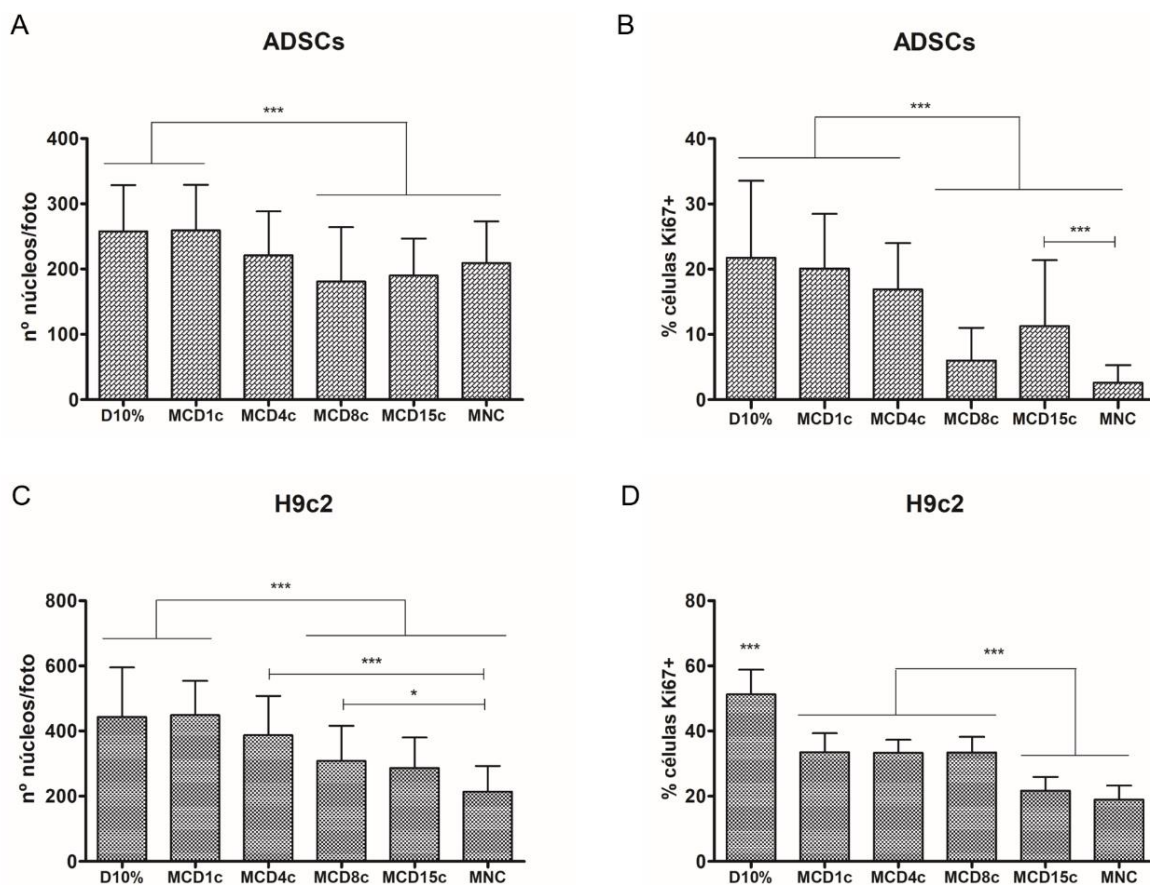


Figura 5.17: Análise da proliferação celular dos cultivos de ADSCs e células H9c2 quando cultivadas com os MCs. Foram avaliadas, no total, 54 fotos obtidas de 3 experimentos independentes, para cada tipo celular. A) Gráfico indicando a média do número de núcleos dos cultivos de ADSCs com MCs. B) Gráfico indicando a média da proporção de células marcadas com Ki67 nos cultivos de ADSCs com MCs. C) Gráfico indicando a média do



número de núcleos dos cultivos de células H9c2 com MCs. D) Gráfico indicando a média da proporção de células marcadas com Ki67 nos cultivos de células H9c2 com MCs. (n=3). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Por outro lado, quando avaliamos os resultados referentes às células H9c2 vemos um perfil um pouco diferente. O MNC apresenta a menor quantidade de núcleos quando comparado com as demais condições (figura 5.17C). Novamente, o controle positivo e o MCD1c mostram uma quantidade significativamente maior de células quando comparados ao tratamento com o MCD8c e MCD15c (figura 5.17C). Quando consideramos as células tratadas com os MCs de D1c, D4c e D8c percebemos que o percentual de células Ki67<sup>+</sup> é estatisticamente maior de quando as células são cultivadas com MCD15c e MNC (figura 5.17D). Estes achados demonstram que os MCs das fases iniciais do protocolo de diferenciação cardiomiogênica de CTEs são capazes de estimular maior proliferação de células progenitoras H9c2 quando comparados com o MCD15c e o MNC.

Considerando as informações obtidas a partir deste experimento, demonstra-se, novamente, que o mesmo meio pode ter ação diferente dependendo do tipo celular. No caso da proliferação, ambos os tipos celulares responderam bem no cultivo com o meio do dia 1, fato que acontece, possivelmente, por se tratar de um meio no momento inicial da diferenciação, onde a maioria das células encontra-se ainda indiferenciada. O MNC também apresentou o mesmo padrão, com pouca proliferação, nas duas linhagens.

A avaliação da influência de diferentes MCs obtidos durante um processo de diferenciação celular ainda é algo pouco estudado. Em 2014, Ngangan e colaboradores, coletaram MC durante a diferenciação espontânea de CTEs murinas e avaliaram seus efeitos no cultivo com fibroblastos e células HUVEC. O grupo observou que dependendo do MC, as células respondiam de maneira diferente, por exemplo, quanto a proliferação: enquanto os fibroblastos proliferaram em maior quantidade com meios coletados nos dias 6 e 12, as HUVEC proliferaram menos e de forma mais parecida com o meio não condicionado, exceto pelo meio do dia 12 que mostrou maior proliferação (NGANGAN *et al.*, 2014).

Com relação ao MC de CTEs indiferenciadas, trabalhos mostraram que este é capaz de estimular a proliferação de mioblastos (apesar de reduzir sua diferenciação) (YOUSEF *et al.*, 2014), como também de fibroblastos de derme (BAE e SUNG e KIM, 2017). O MC de células iPS também já foi utilizado em cultivo com CTMs, sendo capaz

de aumentar a proliferação e diminuir a apoptose destas células (LIAN *et al.*, 2016). Por outro lado, trabalhos recentes têm demonstrado que o MC de CTEs pode reduzir a proliferação, migração e o potencial tumorigênico de vários tipos de tumor (HE *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2017). Assim, percebemos que dependendo do tipo celular, podemos obter respostas diferentes.

Quando mimetizamos o processo de diferenciação *in vitro*, acompanhamos a mudança de tipo celular e, conseqüentemente, dos fatores secretados pelas células. Em relação ao microambiente cardíaco, demonstramos previamente que MCs obtidos de tecido ou células cardíacas adultas conseguem estimular a proliferação de células-tronco mesenquimais e células H9c2. Sharma e colaboradores (2016) também já demonstraram que o MC de progenitores cardíacos humanos neonatais é capaz de estimular a proliferação de cardiomiócitos (SHARMA *et al.*, 2017). Além disso, os próprios cardiomiócitos secretam moléculas que são capazes de estimular a proliferação de tipos celulares bem distintos como, por exemplo, de células precursoras de oligodendrócitos (KURODA e MURAMATSU e YAMASHITA, 2017).

Interessantemente, evidenciamos neste trabalho que o meio obtido no dia 15, com células já diferenciadas em cardiomiócitos, é capaz de promover a proliferação das ADSCs, enquanto que o MCD8c, meio obtido de células em fase de progenitores cardíacos, teve uma taxa de proliferação baixa. Considerando as células H9c2, com o mesmo meio (D8), vemos um percentual de células Ki67<sup>+</sup> igual ao do MCD1c. Como já citado, esta é uma linhagem de cardioblastos (pré-cardiomiócitos), sendo assim, um meio como o MCD8c obtido de progenitores, que possivelmente estão em fase próxima ao estado de diferenciação em que esta célula está, pode ser capaz de influenciá-la de forma mais acentuada se comparada a outros tipos celulares.

Então, podemos concluir que os MCs coletados durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs não apresentaram toxicidade quando cultivadas com 3 tipos celulares diferentes e mostraram-se capazes de estimular a proliferação celular. Além disso, observamos que estes tipos celulares responderam de formas diferentes a um mesmo meio, mostrando que um ensaio pode ter resultados diferentes dependendo da célula utilizada.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS HUVEC E NA FORMAÇÃO DE VASOS *IN VITRO*

Considerando o desenvolvimento embrionário do coração e os vários processos envolvidos neste, optamos por investigar os efeitos dos MCs na migração e na angiogênese de células endoteliais.

A migração foi avaliada com o ensaio de fechamento de lesão ou *scratch*, que consiste em realizar um risco na monocamada de células e avaliar o processo de migração celular no local onde as células foram retiradas (LIANG e PARK e GUAN, 2007). A migração foi acompanhada pelo período de 16 horas. Entretanto, para evidenciar os efeitos dos tratamentos, foram utilizados nas análises os dados da área recoberta por células referentes aos tempos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 horas (imagens representativas no apêndice 10). Quando avaliamos a área total do risco observamos, de forma geral, que esta diminuiu ao longo do tempo para todas as condições, mas podemos perceber que o MCD15c e o MNC apresentam uma área aberta maior após 15hs em comparação com o controle positivo (figura 5.18A).

Embora essa informação nos forneçam indícios de que, por exemplo, o MCD15c não estimula a migração, também é preciso observar que, nesta metodologia, pode haver diferenças entre as áreas do risco inicial. Assim, para avaliar o fechamento do risco e, conseqüentemente, a eficiência de migração das células, analisamos a porcentagem da área reduzida comparando a área inicial (0h) com os demais tempos (3, 6, 9, 12, 15h).

Durante as primeiras 3 horas não houve diferença significativa entre os tratamentos (figura 5.18B), porém, após 6 horas foi possível ver que o MCD1c fechou menos a área do risco em comparação com o Ctle<sup>+</sup> (figura 5.18C). Já com 9, 12 e 15 horas evidenciamos diferença do Ctle<sup>+</sup> para MCD8c, MCD15c e MNC. Nestes mesmos tempos, observamos que o MCD1c e o MCD4c fecharam o risco, praticamente na mesma proporção que o Ctle<sup>+</sup> (figura 5.18D-F).

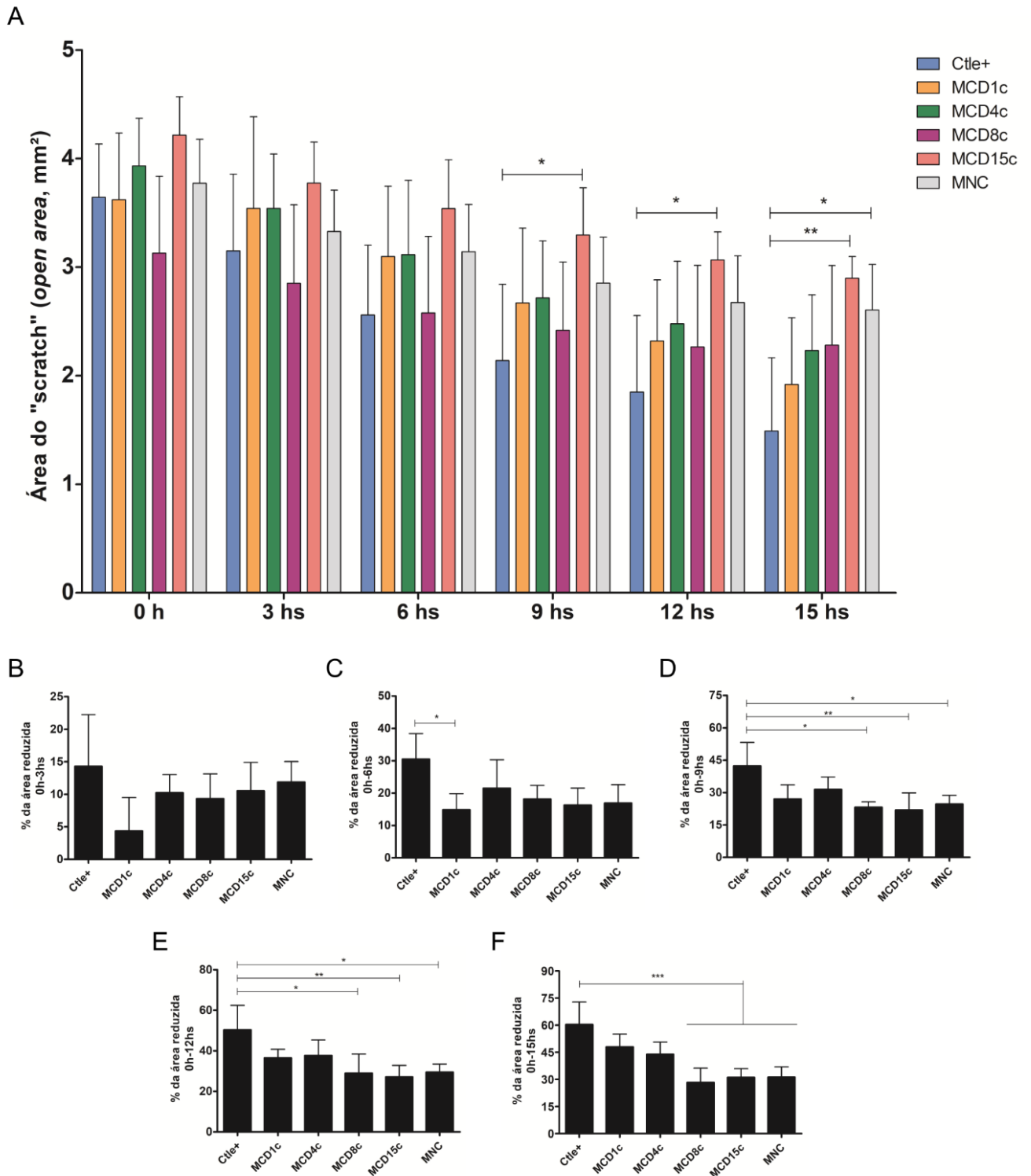


Figura 5.18: Avaliação da migração de células HUVEC em contato com o MC. A) Área aberta (risco/ *scratch*) ao longo do tempo, com os diferentes tratamentos. Média da porcentagem da área reduzida ao longo de 3 (B), 6 (C), 9 (D), 12 (E) e 15 (F) horas de cultivo com os MCs. (n=4). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Durante a embriogênese, as células passam por uma série de eventos complexos responsáveis por definir a forma e o posicionamento correto de todos os

órgãos e tecidos. Entre estes eventos, encontra-se a migração celular, mecanismo evolutivamente conservado que ocorre em processos normais e patogênicos (KUROSAKA e KASHINA, 2008). Nós observamos maior migração nos meios obtidos dos momentos mais iniciais da diferenciação. Recordando o que foi previamente comentado, o coração se origina das células da mesoderme, as quais migram ao longo da linha primitiva para a região cardiogênica. No ensaio de migração observamos que o MCD4c, em todos os tempos, apresentou um perfil de migração mais parecido com o Ctle<sup>+</sup>. Possivelmente, a combinação de fatores secretados pelas células da mesoderme gere um estímulo a migração das células HUVEC. Além disso, já foi relatado que o MC de células-tronco pluripotentes consegue estimular a migração de fibroblastos dermais (OH *et al.*, 2017), sugerindo que o meio de células mais indiferenciadas influencia este tipo de comportamento celular.

Ao utilizar o MC obtido no dia 8 do protocolo de diferenciação cardiomiogênica, onde temos a presença de células progenitoras cardíacas, não observamos efeito marcante na migração de células HUVEC. Trabalhos da literatura já relataram o uso de proteínas secretadas por células-tronco ou progenitoras cardíacas como indutores da migração de células endoteliais (SHARMA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2015), porém, nenhum dos estudos já descritos utilizou um progenitor obtido durante o processo de diferenciação. Já o MCD15c, apesar da presença do VEGF que é capaz de estimular a migração de células endoteliais (OLSSON *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2011), não conseguiu estimular a migração na mesma proporção que o Ctle<sup>+</sup>.

Baseado nestes dados, percebemos que os MCs do D1 e D4 estimulam mais a migração celular do que os MCs de D8 e D15 e o MNC. Ainda, com relação ao MCD8c e MCD15c, devemos lembrar que, nestes pontos, já temos células mais comprometidas com a linhagem cardíaca, então, provavelmente os estímulos devem estar mais voltados a diferenciação e maturação do que em estimular a migração das células.

Outro ensaio realizado utilizando as células HUVEC foi a avaliação do possível estímulo angiogênico dos MCs. Visualmente observamos que os MCs conseguem formar estruturas similares a vasos de forma tão nítida como no Ctle<sup>+</sup> e diferente do Ctle<sup>-</sup>, o qual apresenta algumas estruturas menos definidas (figura 5.19A-G). A quantificação do número de vasos e de nodos (junção de no mínimo 3 linhas que formam vasos) não mostrou diferença entre o Ctle<sup>+</sup> e os MCs (figura 5.19H-I). Curiosamente, o MNC também estimulou a formação de vasos. Já foi demonstrado que alguns componentes utilizados no “meio base” da diferenciação cardiomiogênica

presente neste trabalho, também têm relação com o desenvolvimento de vasos. O ácido ascórbico, por exemplo, tem influência sobre células endoteliais (revisado por MAY e HARRISON, 2013), incluindo o estímulo a angiogênese (TELANG *et al.*, 2007), embora não em altas quantidades (MIKIROVA e ICHIM e RIORDAN, 2008). Além disso, o meio base utilizado para a diferenciação cardiomiogênica, o StemPro 34, também é utilizado como o meio base na diferenciação de células-tronco pluripotentes a progenitores endoteliais (LIAN *et al.*, 2014).

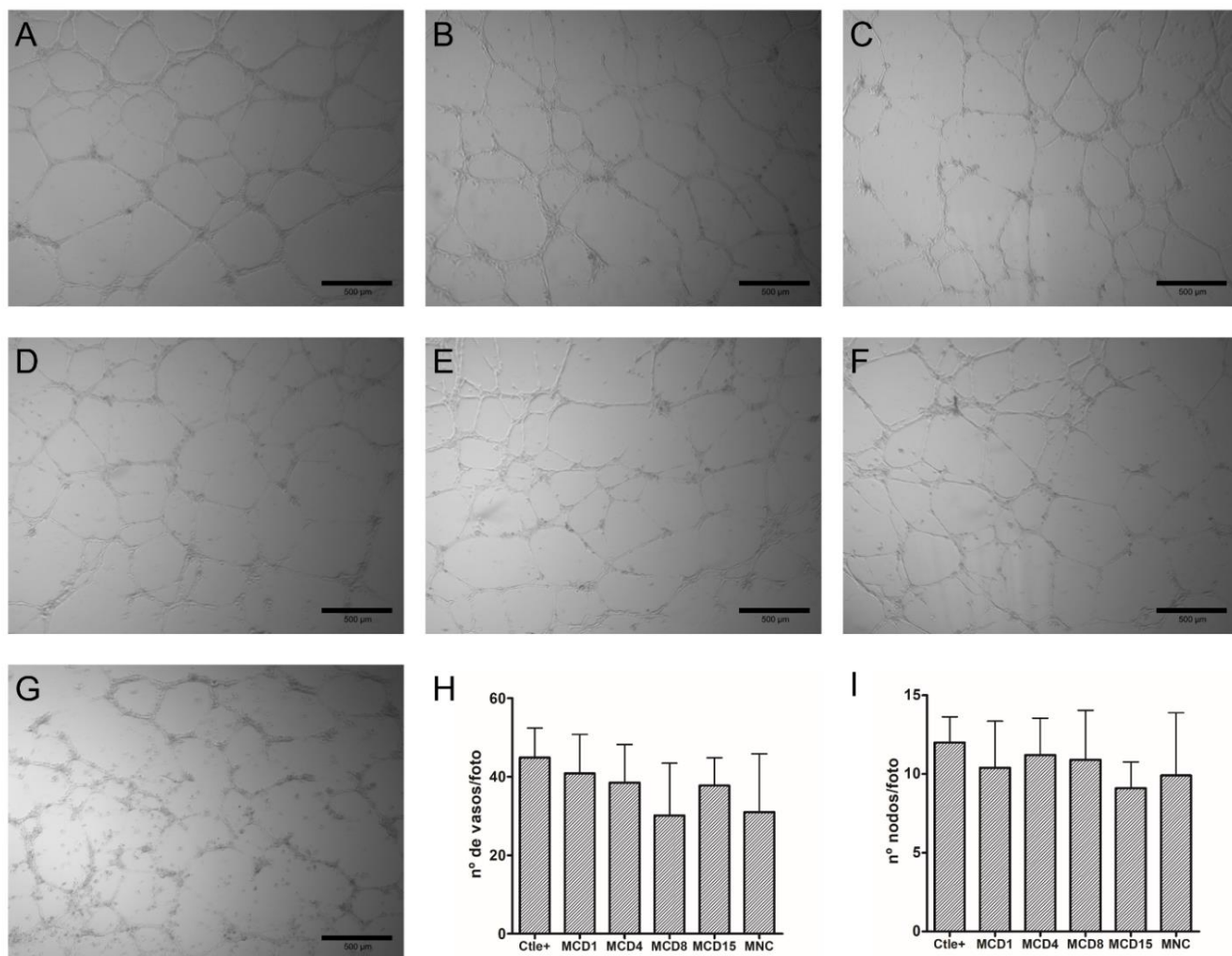


Figura 5.19: Ensaio de formação de estruturas similares a vasos de células HUVECs cultivadas durante 12 horas em uma camada de Matrigel com os MCs. Imagens representativas da formação estruturas similares a vasos para cada condição analisada: A) tratamento com EBM2 completo (Ctle<sup>+</sup>), B) tratamento com MCD1c, C) tratamento com MCD4c, D) tratamento com MCD8c, E) tratamento com MCD15c, F) tratamento com MNC, G) tratamento com EBM2 sem SFB e sem fatores (Ctle<sup>-</sup>), barra de escala = 500 µm. H) Quantificação das estruturas similares a vasos (média do n° vasos/foto; 8 fotos,

aumento de 5x) formados após 12 h. I) Quantificação dos nodos (média do nº nodos/foto; 10 fotos, aumento de 10x) formados após 12 h.

Por outro lado, temos que considerar que o meio adicionado às células foi, de alguma forma, consumido por estas ao longo do processo de diferenciação, então a concentração dos componentes não é a mesma do MNC. Porém, foi possível identificar, por exemplo, no MCD8c e no MCD15c, proteínas como o VEGF, um fator importante na formação de vasos (revisado por SHIBUYA, 2011).

Além disso, é preciso observar que a formação de uma rede vascular durante o desenvolvimento embrionário é um requisito muito importante e obrigatório, uma vez que esta rede permite a troca de gases, nutrientes e resíduos metabólicos. Assim, como já relatado, o sistema cardiovascular é o primeiro a se tornar funcional no embrião (revisado por CHUNG e FERRARA, 2011). Desta forma podemos imaginar que as células durante o desenvolvimento cardíaco também secretem moléculas que estimulam o aparecimento das células endoteliais.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MCS NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS H9C2

Tendo em vista os resultados relativos a proliferação das células H9c2 quando cultivadas com os MCs obtidos durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs, optamos por avaliar o potencial dos meios obtidos no dia 8 (progenitor cardíaco) e no dia 15 (cardiomiócito) em estimular a diferenciação de células H9c2. Para avaliar este efeito, as células foram cultivadas por 7 dias com os MCs, o MNC e os controles negativo (DMEM 10% de SFB) e positivo (DMEM 1% de SFB) da diferenciação, com uma troca de meio durante o período.

Após finalizado o cultivo, as células foram fixadas e marcadas com Tnlc e TnTc. As análises foram realizadas com auxílio do equipamento Operetta *High Content imaging*, permitindo analisar cada poço da placa de cultivo de forma geral (fotos concatenadas), nos fornecendo a intensidade da marcação do fluoróforo e a área total marcada para cada condição. Visualmente é possível observar diferenças entre os tratamentos (figura 5.20A-B) e, quando foi realizada a quantificação a partir da área marcada, percebemos que nenhum dos MCs foi eficiente em promover a diferenciação das células H9c2 da mesma forma que o controle positivo ou melhor que o MNC (figura 5.20C-D).

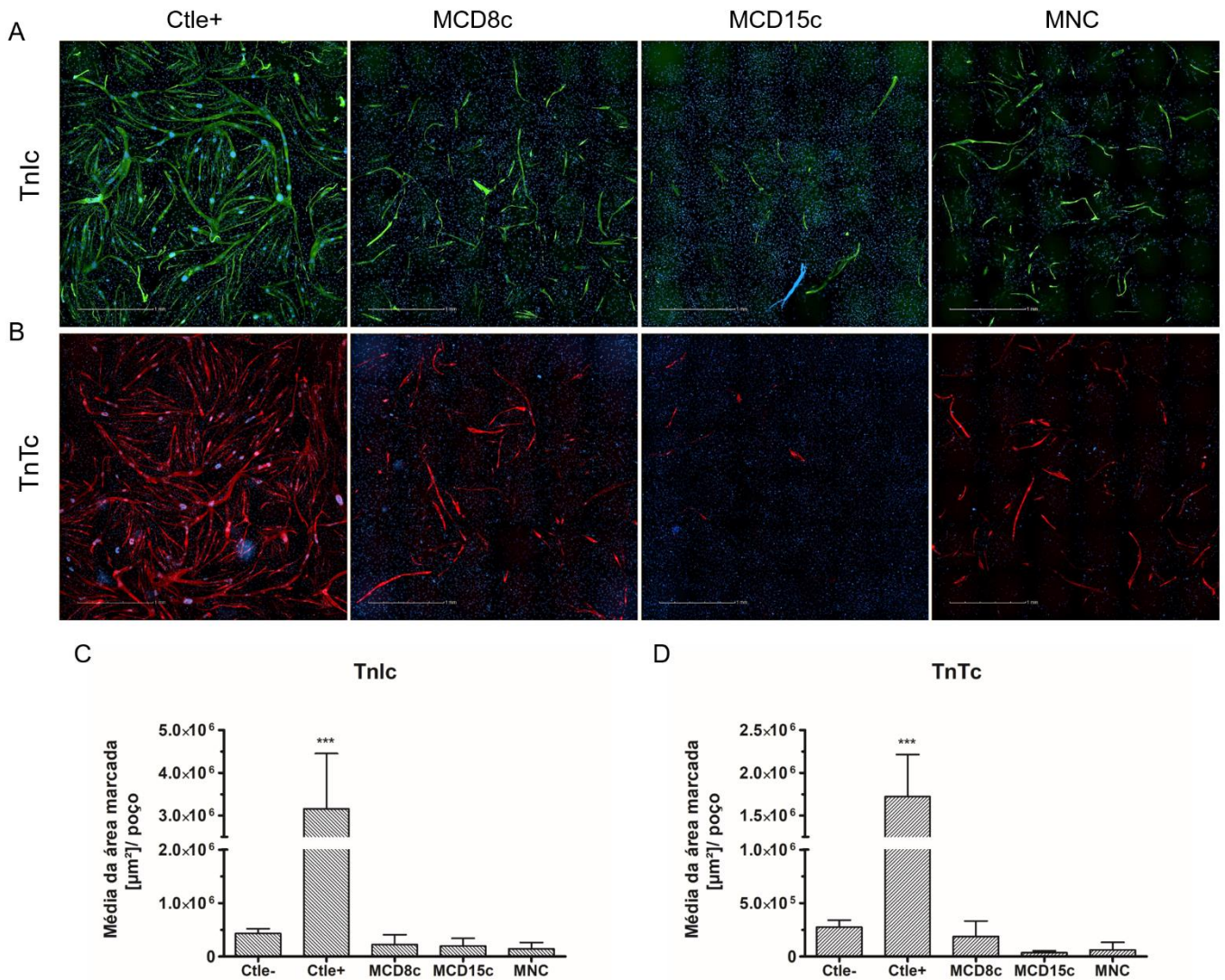


Figura 5.20: Quantificação da diferenciação de células H9c2 cultivadas com os MCs. A) Imagens representativas da marcação de Tnlc nas células sob diferentes tratamentos (colunas). B) Imagens representativas da marcação de TnTc nas células sob diferentes tratamentos (colunas). C) Quantificação da área marcada com Tnlc. D) Quantificação da área marcada com TnTc. Barra de escala:1mm. \*\*\* $p < 0,001$ .

Estes resultados, diferentemente do observado com os MCs obtidos de CRCs (capítulo 1), mostram que MCD8c e MCD15c, embora relacionados a progenitores cardiomiogênicos, não são capazes de estimular a diferenciação de células H9c2, apesar de promoverem a sua proliferação.



## 5.10 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DOS MCS NAS CTES DURANTE SEU PROCESSO DE CARDIOMIOGÊNESE

Considerando que não obtivemos efeito de MCD8c e MCD15c na diferenciação de células H9c2, investigamos se os MCs influenciariam o processo já descrito de diferenciação cardiomiogênica de CTEs. Para isso, os MCs foram adicionados no dia 8 do protocolo de diferenciação, quando ocorre a troca de meio. Estes foram mantidos até o dia 15. O objetivo inicial foi avaliar se os MCs aumentariam a eficiência do protocolo. Portanto, parâmetros como expressão de eGFP e marcação para TnTc foram examinados durante o processo, como esquematizado na figura 5.21A.

Podemos notar que a expressão de eGFP foi muito variável entre os experimentos, principalmente no dia 9 ( $50\pm 20\%$ ) e 11 ( $65\pm 15\%$ ) em todos os tratamentos, porém, ao final do processo, essa variação diminuiu (figura 5.21B). Comparativamente, ao acompanharmos a porcentagem de células diferenciadas ( $TnTc^+$ ) vemos um perfil muito parecido entre os tratamentos nos dias avaliados e, interessante, não vemos um aumento do número de células positivas no dia 15 em comparação com o dia 11 (figura 5.21C).

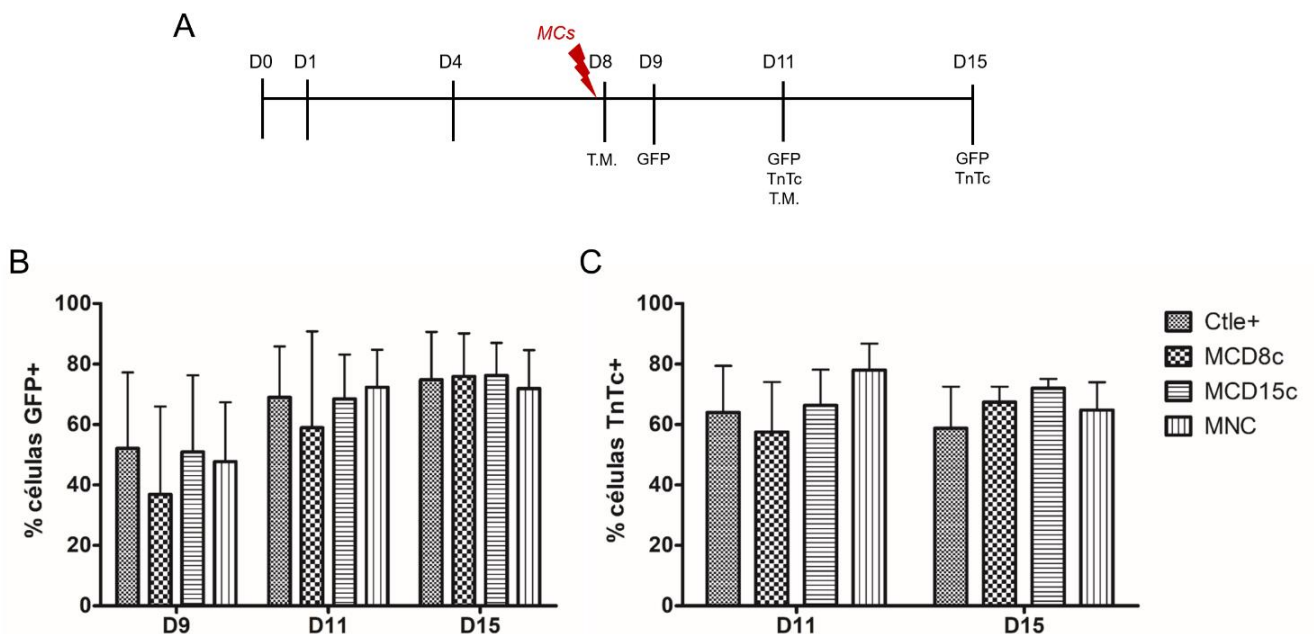


Figura 5.21: Análise do processo de diferenciação cardiomiogênica de CTEs quando cultivadas com os MCs. A) Esquema indicando o momento em que foi iniciado o tratamento com os MCs (em D8) e os momentos e avaliações realizadas (indicadas abaixo do respectivo dia. GFP = expressão de GFP; TnTc = marcação com troponina T

cardíaca; T.M. = troca de meio). B) Gráfico indicando o percentual de células marcadas com eGFP. C) Gráfico indicando o percentual de células marcadas com TnTc.

Assim, podemos concluir que os MCs não aumentaram a eficiência da diferenciação das CTEs, nem com relação a expressão de eGFP nem de TnTc. É importante lembrar que no momento em que adicionamos os MCs neste ensaio, as células já estão comprometidas com a linhagem cardíaca, já estão na fase de progenitores. Então, aparentemente, os meios conseguem apenas “manter” as células no processo da diferenciação, embora o mesmo tenha acontecido com o MNC. Possivelmente, alterações no final do protocolo, após o comprometimento com a diferenciação celular, não produzam grandes mudanças na eficiência final. Entretanto, são necessários mais estudos para aprofundar as informações sobre a influência dos MCs e confirmar se eles não estariam agindo em outras vias ou promovendo outros comportamentos celulares, como, por exemplo, aumentando a maturação dos cardiomiócitos gerados.

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o secretoma de células residentes cardíacas (CRCs) e de células-tronco embrionárias durante a diferenciação cardiomiogênica, avaliando sua composição e funcionalidade em cultivo com células progenitoras.

Na primeira parte do trabalho, aprofundamos as análises de dados prévios do grupo sobre as proteínas secretadas por CRCs derivadas da aurícula e do ventrículo de corações humanos. Identificamos vários processos biológicos e vias de sinalização possivelmente reguladas pelas proteínas presentes nos MCs, dentre os quais destacamos a proliferação celular, a angiogênese e o desenvolvimento cardíaco. Através de ensaios funcionais utilizando o MC das CRCs, conseguimos demonstrar que os fatores secretados são capazes de induzir a proliferação de ADSCs e células H9c2. Além disso, promovem a diferenciação cardíaca e estimulam a angiogênese em células progenitoras. Assim, sugere-se que os MCs de CRCs possam apresentar um potencial uso para a terapia celular. Estes resultados foram agrupados e publicados recentemente no periódico *International Journal of Cardiology* (apêndice 11).

A segunda estratégia utilizada, teve como etapa inicial a padronização da diferenciação cardiomiogênica de CTEs. Com o protocolo descrito neste trabalho, conseguimos realizar a diferenciação eficiente das CTEs (com mais de 60% de células diferenciadas) obtendo cardiomiócitos ao final do protocolo. Finalizada esta primeira etapa, coletamos o MC e descelularizamos os CEs para obtenção da MEC, em 4 diferentes pontos durante o processo de diferenciação. Destacamos que este é o primeiro trabalho que utiliza estas duas metodologias e que caracteriza o secretoma durante a diferenciação cardiomiogênica *in vitro*.

O processo de descelularização dos CEs foi eficiente, uma vez que houve redução de 90% do conteúdo de DNA. As análises de espectrometria de massas identificaram mais de 400 proteínas por condição (dia da diferenciação), porém a maioria destas eram relacionadas ao citoplasma e a membrana plasmática. Ainda assim, identificamos várias proteínas de MEC, ou relacionadas, que foram moduladas ao longo da diferenciação cardiomiogênica. Análises futuras podem ser realizadas tanto para investigar a relação destas proteínas a processos biológicos de interesse quanto para modular a expressão destas e entender sua influência na diferenciação.

Nos MCs descrevemos fatores de crescimento e citocinas modulados ao longo da diferenciação, sendo que vários deles tem relação com o desenvolvimento embrionário ou, mais especificamente, desenvolvimento cardíaco. Interessantemente, conseguimos relacionar estes dados com dados prévios de sequenciamento de mRNAs obtidos durante a diferenciação cardiomiogênica. Para aprofundar ainda mais a caracterização, há perspectiva de identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas.

Os ensaios funcionais inicialmente mostraram que os MCs mantiveram mais de 60% de viabilidade em todos os cultivos celulares, mesmo na ausência de SFB. Considerando os ensaios de proliferação e migração celular, o MCD1c e o MCD4c foram os que apresentaram efeitos mais parecidos com os controles positivos. Já o MCD8c e o MCD15c influenciaram as células de forma mais parecida com o MNC. Aparentemente, as proteínas secretadas por células menos diferenciadas e ainda não comprometidas com uma linhagem específica conseguem estimular mais a proliferação e migração que os fatores secretados por células mais diferenciadas, porém também temos que considerar que os meios podem estar esgotados de outros fatores necessários para o cultivo. Todos os MCs e o MNC conseguiram promover a formação de novos vasos *in vitro*.

Ao testarmos o potencial dos MCs de células progenitoras cardíacas ou cardiomiócitos, diferenciados a partir de CTEs, em estimular a diferenciação cardiomiogênica, observamos que nem o meio do dia 8 nem do dia 15 influenciaram este processo. No caso das células H9c2 não conseguimos observar, praticamente, nenhuma diferenciação. Quando os MCs foram adicionados durante o processo de diferenciação cardíaca das CTEs, não vimos mudança alguma em relação ao protocolo padrão ou ao MNC. Assim, concluímos que os MCs e o MNC são capazes de manter as CTEs durante o processo de diferenciação, mas não aumentam sua eficiência. Para entender mais profundamente que tipo de alterações ou influências os MCs podem estar promovendo, novos ensaios são necessários.

Desse modo, acreditamos que as abordagens utilizadas neste trabalho contribuem para o entendimento do microambiente cardíaco, tanto no tecido adulto quanto no desenvolvimento embrionário do coração. Além disso, as caracterizações realizadas neste trabalho potencialmente contribuem com futuras investigações de proteínas ou vias de sinalização específicas que possam ser moduladas na tentativa de promover a regeneração do coração após lesão.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABE, K. *et al.* Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. **Experimental cell research**, v. 229, n. 1, p. 27–34, 1996.
- ABONNENC, M. *et al.* Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: Role of MicroRNA-29b and MicroRNA-30c. **Circulation Research**, v. 113, n. 10, p. 1138–1147, 2013.
- ABUD, A. P. R. *et al.* The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 992–998, 2015.
- AGUIAR, A. M. 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.
- ALMEIDA, P. G. DE *et al.* Fibronectin assembly during early embryo development: A versatile communication system between cells and tissues. **Developmental Dynamics**, v. 245, n. 4, p. 520–535, 2016.
- AMEELE, J. VAN DEN *et al.* Eomesodermin induces Mesp1 expression and cardiac differentiation from embryonic stem cells in the absence of Activin. **EMBO reports**, v. 13, n. 4, p. 355–62, 2012.
- ANCEY, C. *et al.* Secretion of Il-6, Il-11 and Lif By Human Cardiomyocytes in Primary Culture. **Cytokine**, v. 18, n. 4, p. 199–205, 2002.
- ANDERSEN, D. C. *et al.* Murine “cardiospheres” are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential. **Stem Cells**, v. 27, n. 7, p. 1571–1581, 2009.
- ANDERSON, H. J. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Fate: Applying Biomaterials for Control of Stem Cell Behavior. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. May, p. 1–14, 2016.
- ARSLAN, F. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 10, n. 3, p. 301–312, 2013.
- BAE, Y.-U.; SUNG, H.-K.; KIM, J.-R. Collection of Serum-and Feeder-free Mouse Embryonic Stem Cell-conditioned Medium for a Cell-free Approach Video Link. **J. Vis. Exp**, v. 55035, n. 11910, p. 1–6, 2017.
- BAN, K.; BAE, S.; YOON, Y. Current Strategies and Challenges for Purification of

Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. **Theranostics**, v. 7, n. 7, p. 2067–2077, 2017.

BANERJEE, I. *et al.* Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. **American of Physiology**, v. 293, n. 3, p. 1883–1891, 2007.

BARDOT, E. *et al.* Foxa2 identifies a cardiac progenitor population with ventricular differentiation potential. **Nature Communications**, v. 8, p. 14428, 2017.

BARRON, M.; GAO, M.; LOUGH, J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. **Developmental Dynamics**, v. 218, n. 2, p. 383–393, 2000.

BARROSO, M. C. *et al.* Serum insulin-like growth factor-1 and its binding protein-7: potential novel biomarkers for heart failure with preserved ejection fraction. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 16, n. 1, p. 199, 2016.

BARTUNEK, J. *et al.* Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: The C-CURE (cardiopoietic stem cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 23, p. 2329–2338, 2013.

\_\_\_\_\_. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: Results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. **European Heart Journal**, v. 38, n. 9, p. 648–660, 2017.

BASSAT, E. *et al.* The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. **Nature**, v. 547, n. 7662, p. 179–184, 2017.

BEARZI, C. *et al.* Human cardiac stem cells. **Pnas**, v. 104, n. 35, p. 14068–14073, 2007.

BEHFAR, A. *et al.* Cell therapy for cardiac repair-lessons from clinical trials. **Nature Reviews Cardiology**, v. 11, n. 4, p. 232–246, 2014.

BELTRAMI, A. P. *et al.* Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration we have documented the existence of cycling ventricular myocytes in the normal and pathologic adult mam. **Cell**, v. 114, p. 763–776, 2003.

BEPPU, H. *et al.* BMP Type II Receptor Is Required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos. **Developmental Biology**, v. 221, n. 1, p. 249–258, 2000.

BERGMANN, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5923, p. 98–102, 2009.

\_\_\_\_\_. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. **Cell**, v. 161, n.

7, p. 1566–1575, 2015.

BERLO, J. H. VAN *et al.* c-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 337–341, 7 maio 2014.

BHANG, S. H. *et al.* Efficacious and Clinically Relevant Conditioned Medium of Human Adipose-derived Stem Cells for Therapeutic Angiogenesis. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 4, p. 862–872, 2014.

BITEAU, B.; HOCHMUTH, C. E.; JASPER, H. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. **Cell stem cell**, v. 9, n. 5, p. 402–11, 4 nov. 2011.

BOLLI, R. *et al.* Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9806, p. 1847–1857, nov. 2011.

BOLLINI, S.; SMART, N.; RILEY, P. R. Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 2, p. 296–303, 2011.

BONDUE, A. *et al.* Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 69–84, 2008.

BONDUE, A.; BLANPAIN, C. Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment. **Circulation Research**, v. 107, n. 12, p. 1414–1427, 2010.

BRADE, T. *et al.* Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–18, 2013.

BRAND, T. Heart development molecular insights into cardiac specification.pdf. **Developmental Biology**, v. 258, p. 1–19, 2003.

BRIZZI, M. F.; TARONE, G.; DEFILIPPI, P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 5, p. 645–651, 2012.

BRUNEAU, B. G. *et al.* Signaling and Transcriptional Networks in Heart Development and Regeneration. **Cold Spring Harbor Laboratory Perspectives in Biology**, v. 5, p. a008292, 2013.

BURGER, A. M. *et al.* Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rP1 in breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 11, p. 1515–1527, 2005.

BURRIDGE, P. W. *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p. 855–860, 2014.

CALLE, E. A. *et al.* Targeted proteomics effectively quantifies differences between native lung and detergent-decellularized lung extracellular matrices. **Acta**

**Biomaterialia**, v. 46, p. 91–100, 2016.

CAMBRIA, E. *et al.* Translational cardiac stem cell therapy: advancing from first-generation to next-generation cell types. **npj Regenerative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 17, 2017.

CAMUSSI, G. *et al.* Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. **Kidney International**, v. 78, n. 9, p. 838–848, 2010.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, 1 set. 1991.

CARVALHO, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 102–117, 2015.

CASTRÉN, E. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in two-dimensional and three-dimensional cultures without animal serum. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 167, 2015.

CASTRO BRÁS, L. E. DE *et al.* Texas 3-Step decellularization protocol: Looking at the cardiac extracellular matrix. **Journal of Proteomics**, v. 86, p. 43–52, 2013.

CHAMBERLAIN, G. *et al.* Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHANG, C. W. *et al.* Cardiac extracellular matrix proteomics: Challenges, techniques, and clinical implications. **PROTEOMICS - Clinical Applications**, v. 10, n. 1, p. 39–50, jan. 2016.

CHEN, K. G. *et al.* Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 1, p. 13–26, jan. 2014.

CHENG, P. *et al.* Fibronectin mediates mesendodermal cell fate decisions. **Development**, v. 140, n. 12, p. 2587–2596, 2013.

CHOI, Y.-H.; KURTZ, A.; STAMM, C. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Cell Therapy. **Human Gene Therapy**, v. 22, n. 1, p. 3–17, 2011.

CHRISTALLA, P.; HUDSON, J. E.; ZIMMERMANN, W. H. The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium. **Cells Tissues Organs**, v. 195, n. 1–2, p. 82–93, 2011.

CHRISTIANSEN, M. N. *et al.* Age-Specific Trends in Incidence, Mortality, and Comorbidities of Heart Failure in Denmark, 1995 to 2012. **Circulation**, v. 135, n. 13, p. 1214–1223, 2017.

CHUGH, A. R. *et al.* Administration of Cardiac Stem Cells in Patients With Ischemic



Cardiomyopathy: The SCIPIO Trial: Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance. **Circulation**, v. 126, n. 11\_suppl\_1, p. S54–S64, 11 set. 2012.

CHUGH, S. *et al.* Pilot study identifying myosin heavy chain 7, desmin, insulin-like growth factor 7, and annexin A2 as circulating biomarkers of human heart failure. **Proteomics**, v. 13, n. 15, p. 2324–2334, 2013.

CHUNG, A. S.; FERRARA, N. Developmental and Pathological Angiogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 563–584, 2011.

CICERO, V. LO *et al.* Do mesenchymal stem cells play a role in vocal fold fat graft survival? **Cell Proliferation**, v. 41, n. 3, p. 460–473, 2008.

COLLET, C.; CANDY, J. How many insulin-like growth factor binding proteins? **Molecular and cellular endocrinology**, v. 139, n. 1–2, p. 1–6, 1998.

CONNER, D. A. Mouse Embryo Fibroblast (MEF) Feeder Cell Preparation. **Current Protocols in Molecular Biology**, p. 1–7, 2001.

CONTRERAS-KALLENS, P. *et al.* Mesenchymal stem cells and their immunosuppressive role in transplantation tolerance. p. 1–22, 2017.

COSME, J. *et al.* Hypoxia-Induced Changes in the Fibroblast Secretome, Exosome, and Whole-Cell Proteome Using Cultured, Cardiac-Derived Cells Isolated from Neonatal Mice. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 8, p. 2836–2847, 2017.

CRAFT, A. M. *et al.* Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 638–645, 2015.

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

CRESCITELLI, R. *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.

CUTTS, J.; NIKKHAH, M.; BRAFMAN, D. A. Biomaterial approaches for stem cell-based myocardial tissue engineering. **Biomarker Insights**, v. 10, n. ii, p. 77–90, 2015.

D'AMICO, M. A. *et al.* IL-6 Activates PI3K and PKC $\zeta$  Signaling and Determines Cardiac Differentiation in Rat Embryonic H9c2 Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 3, p. 576–586, 2016.

DAVID, R. *et al.* MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 338–345, 2008.

DAVIS, D. R. *et al.* Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.

DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v. 324, n. 5935, p. 1673–1677, 2009.

DOETSCHMAN, T. C. *et al.* The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 87, p. 27–45, 1985.

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. 315–7, 2006.

DUAN, C.; REN, H.; GAO, S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 167, n. 3, p. 344–351, 2010.

DUBOIS, N. C. *et al.* SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 1011–1018, 2011.

ECKARDT, D. *et al.* Cardiomyocyte-restricted deletion of connexin43 during mouse development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 6, p. 963–971, 2006.

EDFORS, F. *et al.* Gene- specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. **Molecular Systems Biology**, v. 12, n. 10, p. 883, 20 out. 2016.

ELLIOTT, D. A. *et al.* NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. **Nature methods**, v. 8, n. 12, p. 1037–40, 2011.

ENGLER, A. J. *et al.* Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 22, p. 3794–3802, 2008.

EVSEENKO, D. *et al.* Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. **Pnas**, v. 3, n. 31, p. 13742–13747, 2010.

FAIAL, T. *et al.* Brachyury and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. **Development**, v. 142, n. 12, p. 2121–35, 2015.

FAN, F. *et al.* Interleukin-1beta regulates angiopoietin-1 expression in human

endothelial cells. **Cancer research**, v. 64, n. 9, p. 3186–90, 2004.

FAZELI, A. *et al.* Altered patterns of differentiation in karyotypically abnormal human embryonic stem cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 55, n. 2, p. 175–180, 2011.

FERRARO, F.; CELSO, C. LO; SCADDEN, D. Adult Stem Cells and Their Niches. **Advances in Experimental Medicine and Biology book series**, v. 695, p. 155–168, 2010.

FONTES, J. A.; ROSE, N. R.; CIHÁKOVÁ, D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 62–68, 2015.

FOUNTOULAKI, K.; DAGRES, N. Cellular Communications in the Heart. **Cardiac Failure Review**, v. 1, n. 2, p. 64, 2015.

FRANGOIANNIS, N. G. Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 635–688, abr. 2012.

FREIRE, A. G.; RESENDE, T. P.; PINTO-DO-Ó, P. Building and repairing the heart: What can we learn from embryonic development? **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, out. 1970.

GANDHI, P. U. *et al.* Prognostic Usefulness of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 in Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Novel Biomarker of Myocardial Diastolic Function? **The American Journal of Cardiology**, v. 114, n. 10, p. 1543–1549, 2014.

\_\_\_\_\_. Insulin-Like Growth Factor–Binding Protein-7 as a Biomarker of Diastolic Dysfunction and Functional Capacity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Results From the RELAX Trial. **JACC: Heart Failure**, v. 4, n. 11, p. 860–869, 2016.

GARCEZ, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, 2016.

GATTAZZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2506–2519, 2014.

GEORGE, E. L. *et al.* Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. **Development (Cambridge, England)**, v. 119, n. 4, p. 1079–1091, 1993.

GESSERT, S.; KÜHL, M. The multiple phases and faces of Wnt signaling during cardiac differentiation and development. **Circulation Research**, v. 107, n. 2, p. 186–199, 2010.

GIACOMELLI, E. *et al.* Three-dimensional cardiac microtissues composed of cardiomyocytes and endothelial cells co-differentiated from human pluripotent stem cells. **Development**, p. dev.143438, 2017.

GIORDANO, F. J. *et al.* A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5780–5, 2001.

GOH, S. K.; OLSEN, P.; BANERJEE, I. Extracellular Matrix Aggregates from Differentiating Embryoid Bodies as a Scaffold to Support ESC Proliferation and Differentiation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

GOLDMAN, O. *et al.* Endoderm generates endothelial cells during liver development. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 4, p. 556–565, 2014.

GUNHANLAR, N. *et al.* A simplified protocol for differentiation of electrophysiologically mature neuronal networks from human induced pluripotent stem cells. **Molecular Psychiatry**, n. February, p. 1–9, 2017.

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

GUYTON, ARTHUR; HALL, J. **Tratado de fisiología médica**. 11<sup>a</sup> ed. [s.l.] Elsevier, 2006.

HAMADA, H. *et al.* Establishment of Vertebrate Left–Right Asymmetry. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 2, p. 103–113, 2002.

HAN, Z. *et al.* Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 6, p. 988–994, 2001.

HANNAN, N. R. F. *et al.* Production of hepatocyte like cells from human pluripotent stem cells. **Nature protocols**, v. 8, n. 2, p. 430–437, 2013.

HANSEN, N. U. B. *et al.* The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 2, p. 286–294, 2015.

HARMELINK, C.; JIAO, K. Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathways in Heart Development and Disease. *In*: **Congenital Heart Disease - Selected Aspects**. [s.l.]

InTech, 2012. .

HE, A. *et al.* Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5632–5637, 2011.

HE, J. *et al.* Hypoxic adipose mesenchymal stem cells derived conditioned medium protects myocardial infarct in rat. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 22, p. 4397–4406, 2015.

HE, N. *et al.* Embryonic stem cell preconditioned microenvironment suppresses tumorigenic properties in breast cancer. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 95, 2016.

HERRON, T. J. *et al.* Extracellular matrix-mediated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiac monolayer structure and electrophysiological function. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 9, n. 4, 2016.

HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P. D. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adh. Migr.**, v. 7, n. 1, p. 56–63, 2013.

HOLLFELDER, D.; FRASCH, M.; REIM, I. Distinct functions of the laminin  $\beta$  LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in *Drosophila*. **BMC Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 26, 2014.

HONG, K. H.; RYU, J.; HAN, K. H. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1405–7, 15 fev. 2005.

HOOPER, A. T. *et al.* Angiomodulin Is a Specific Marker of Vasculature and Regulates Vascular Endothelial Growth Factor-A-Dependent Neoangiogenesis. **Circulation Research**, v. 105, n. 2, p. 201–208, 2009.

HUANG, S.-M. A *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. **Nature**, v. 461, n. 7264, p. 614–620, 2009.

HUANG, S. X. L. *et al.* Highly efficient generation of airway and lung epithelial cells from human pluripotent stem cells. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 84–91, 2014.

HYNES, R. O. Stretching the boundaries of extracellular matrix research. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 761–763, 2014.

HYNES, R. O.; NABA, A. Overview of the Matrisome--An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 1, p. a004903–a004903, 1 jan. 2012.

ICCVAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol Normal Human Keratinocyte NRU Cytotoxicity Test Method. n. 7, 2006.

IMANAKA-YOSHIDA, K.; AOKI, H. Tenascin-C and mechanotransduction in the development and diseases of cardiovascular system. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUL, n. July, p. 1–12, 2014.

IVANOVA, G. *et al.* Metabolomic and Proteomic Analysis of the Mesenchymal Stem Cells' Secretome. *In: Metabolomics - Fundamentals and Applications.* [s.l.] InTech, 2016. .

JACOBS, K. *et al.* Higher-Density Culture in Human Embryonic Stem Cells Results in DNA Damage and Genome Instability. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 3, p. 330–341, 2016.

JANG, H.-K. *et al.* Therapeutic Angiogenesis Using Tumor Cell-Conditioned Medium. **Biotechnology Progress**, p. n/a-n/a, 2016.

JANG, J. *et al.* 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioprints for cardiac repair. **Biomaterials**, v. 112, p. 264–274, 2017.

JHA, R.; XU, R.; XU, C. Efficient Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells with Growth Factors. **Methods Mol Biol**, v. 1299, p. 115–131, 2015.

JOHNSON, T. D. *et al.* Quantification of decellularized human myocardial matrix: A comparison of six patients. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 1, p. 75–83, 2016.

JOHNSTON, P. V. *et al.* Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 120, n. 12, p. 1075–1083, 2009.

JONES, D. L.; WAGERS, A. J. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 11–21, 2008.

JONES, E. A *et al.* Differences between human and mouse alpha-fetoprotein expression during early development. **Journal of anatomy**, v. 198, p. 555–559, 2001.

KAKKAR, R.; LEE, R. T. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. **Circulation Research**, v. 106, n. 1, p. 47–57, 2010.

KAPITEIJN, K. *et al.* Human embryo-conditioned medium stimulates in vitro endometrial angiogenesis. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. SUPPL. 1, p. 1232–1239, 2006.

KARANTALIS, V.; HARE, J. M. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. **Circulation Research**, v. 116, n. 8, p. 1413–1430, 2016.

KASAI-BRUNSWICK, T. H. *et al.* Cardiosphere-derived cells do not improve cardiac function in rats with cardiac failure. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 36, 2017.

KATTMAN, S. J. *et al.* Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 2, p. 228–240, 2011.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, n. March, p. 25–34, 2015.

KEITH, M. C. L.; BOLLI, R. “String theory” of c-kit pos cardiac cells: A new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. **Circulation Research**, v. 116, n. 7, p. 1216–1230, 2015.

KEMPF, H. *et al.* Controlling expansion and cardiomyogenic differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 6, p. 1132–1146, 2014.

KERN, S. *et al.* Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 1 maio 2006.

KERTESZ, N. *et al.* The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. **Developmental Biology**, v. 276, n. 1, p. 101–110, dez. 2004.

KHAN, M. *et al.* Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. **Circulation Research**, v. 117, n. 1, p. 52–64, 2015.

KIM, Y.-E. *et al.* Chromosomal Modification in Human Embryonic Stem Cells Cultured in a Feeder-Free Condition after Single Cell Dissociation using Accutase. **Development & reproduction**, v. 16, n. 4, p. 353–61, 2012.

KIMÁKOVÁ, P. *et al.* Erythropoietin and its angiogenic activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 19–22, 2017.

KOFRON, C. M.; MENDE, U. In vitro models of the cardiac microenvironment to study myocyte and non-myocyte crosstalk: bioinspired approaches beyond the polystyrene dish. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 12, p. 3891–3905, 2017.

KOLANOWSKI, T. J.; ANTOS, C. L.; GUAN, K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. **International Journal of**

**Cardiology**, v. 241, p. 379–386, 2017.

KRAUSE, D. S.; SCADDEN, D. T. Deconstructing the complexity of a microenvironmental niche. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 16–17, 2012.

KRUEGEL, J.; MIOSGE, N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 17, p. 2879–2895, 2010.

KULCENTY, K. *et al.* Molecular mechanisms of induced pluripotency. **Wspolczesna Onkologia**, v. 1A, n. L, p. A22–A29, 2015.

KUMAR, N. *et al.* Generation of an expandable intermediate mesoderm restricted progenitor cell line from human pluripotent stem cells. **eLife**, v. 4, n. NOVEMBER2015, p. 1–24, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KURODA, M.; MURAMATSU, R.; YAMASHITA, T. Cardiomyocyte-released factors stimulate oligodendrocyte precursor cells proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 4, p. 1160–1164, 2017.

KUROSAKA, S.; KASHINA, A. Cell biology of embryonic migration. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 84, n. 2, p. 102–122, 2008.

KUWAHARA, K. *et al.* Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte-nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro. **Circulation**, v. 100, n. 10, p. 1116–1124, 1999.

LAFLAMME, M. A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1015–1024, 2007.

LAI, R. C. *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 4, n. 3, p. 214–222, 2010.

LANE, S. W.; WILLIAMS, D. A.; WATT, F. M. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 795–803, 2014.

LAVOIE, J. R.; ROSU-MYLES, M. Uncovering the secreted factors of mesenchymal stem cells. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2212–2221, 2013.

LE, T.; CHONG, J. Cardiac progenitor cells for heart repair. **Cell Death Discovery**, v. 2, n. May, p. 16052, 2016.

LEE, S. T. *et al.* Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. **Journal of the**



- American College of Cardiology**, v. 57, n. 4, p. 455–465, 2011.
- LERI, A. *et al.* Cardiac stem cell niches. **Stem Cell Research**, v. 13, n. 3, p. 631–646, 2014.
- LEVIN, M. Left-right asymmetry in embryonic development: A comprehensive review. **Mechanisms of Development**, v. 122, n. 1, p. 3–25, 2005.
- LI, K. *et al.* Differentiation of pluripotent stem cells for regenerative medicine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 471, n. 1, p. 1–4, 2016.
- LI, L.; XIE, T. STEM CELL NICHE: Structure and Function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, n. 1, p. 605–631, 2005.
- LI, Z. *et al.* Imaging Survival and Function of Transplanted Cardiac Resident Stem Cells. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 14, p. 1229–1240, 2009.
- LIAN, R.-L. *et al.* Effects of induced pluripotent stem cells-derived conditioned medium on the proliferation and anti-apoptosis of human adipose-derived stem cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 413, n. 1–2, p. 69–85, 2016.
- LIAN, X. *et al.* Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. **Nature protocols**, v. 8, n. 1, p. 162–75, 2013.
- \_\_\_\_\_. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 5, p. 804–816, 2014.
- LIANG, C.-C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LINDSLEY, R. C. *et al.* Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. **Development (Cambridge, England)**, v. 133, n. 19, p. 3787–96, 1 out. 2006.
- LIU, W.; FOLEY, A. C. Signaling pathways in early cardiac development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 3, n. 2, p. 191–205, 2011.
- LOCKHART, M. *et al.* Extracellular Matrix and Heart Development. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 91, n. 6, p. 535–550, 2011.
- LOUGH, J. *et al.* Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. **Developmental biology**, v.

178, n. 1, p. 198–202, 1996.

LU, T. Y. *et al.* Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–11, 2013.

LUO, L. *et al.* Fabrication of Synthetic Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Myocardial Infarction in Mice. **Circulation Research**, v. 120, n. 11, p. 1768–1775, 2017.

LV, T. *et al.* Proliferation in cardiac fibroblasts induced by  $\beta$ 1-adrenoceptor autoantibody and the underlying mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–15, 2016.

MA, X. *et al.* Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells. **Stem cells translational medicine**, v. 2, n. 6, p. 409–19, 2013.

MAILLET, A. *et al.* Use of Human Pluripotent Stem Cell Derived-Cardiomyocytes to Study Drug-Induced Cardiotoxicity. *In: Current Protocols in Toxicology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 22.5.1-22.5.22.

MAKRIDAKIS, M.; ROUBELAKIS, M. G.; VLAHOU, A. Stem cells: Insights into the secretome. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 11, p. 2380–2384, 2013.

MALLANNA, S. K.; DUNCAN, S. A. Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, v. 1, n. SUPPL.26, p. 1–15, 2013.

MALLIARAS, K. *et al.* Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: Evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-derived aUtologous stem CELls to reverse ventricular dysfunction). **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 2, p. 110–122, 2014.

MAO, A. S.; MOONEY, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, p. 14452–14459, 2015.

MARTIN-RENDON, E. *et al.* 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sanguinis**, v. 95, n. 2, p. 137–148, 2008.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured

in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells (embryonic stem cells/inner cell masses/differentiation in vitro/embryonal carcinoma cells/growth factors).

**Developmental Biology**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MARTIN, H. L. *et al.* High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

MARTIN, M. L.; BLAXALL, B. C. Cardiac intercellular communication: Are myocytes and fibroblasts fair-weather friends? **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 5, n. 6, p. 768–782, 2012.

MAY, J. M.; HARRISON, F. E. Role of Vitamin C in the Function of the Vascular Endothelium. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 17, p. 2068–2083, 2013.

MAZZOTTA, S. *et al.* Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development. **Stem Cell Reports**, v. 7, n. 4, p. 764–776, 2016.

MCGAUGH, E. C.; NOSTRO, M. C. Efficient Differentiation of Pluripotent Stem Cells to NKX6-1+ Pancreatic Progenitors. **Journal of Visualized Experiments**, n. 121, 7 mar. 2017.

MEHTA, A. *et al.* Phasic modulation of Wnt signaling enhances cardiac differentiation in human pluripotent stem cells by recapitulating developmental ontogeny.

**Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2394–2402, 2014.

MENASCHÉ, P. *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: First clinical case report. **European Heart Journal**, v. 36, n. 30, p. 2011–2017, 2015.

MENO, C. *et al.* Lefty-1 Is Required for Left-Right Determination As a Regulator of Lefty-2 and Nodal. **Cell**, v. 94, n. 3, p. 287–297, 1998.

MESSINA, E. *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. **Circulation Research**, v. 95, n. 9, p. 911–921, 2004.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; THOMAS, P. D. PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 377–386, 2013.

MIKIROVA, N. A.; ICHIM, T. E.; RIORDAN, N. H. Anti-angiogenic effect of high doses of ascorbic acid. **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 50, 2008.

MINAMI, I. *et al.* A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. **Cell**

**Reports**, v. 2, n. 5, p. 1448–1460, 2012.

MITTAL, A. *et al.* Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 381, n. 1, p. 73–82, 2013.

MOHR, J. C. *et al.* The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 7, p. 1885–1893, 2010.

MOLLOVA, M. *et al.* Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 4, p. 1446–51, 2013.

MONGIAT, M. *et al.* Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17491–17499, 2003.

MONTRUCCHIO, G. *et al.* Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 377–382, 1994.

MOORE, J. C. *et al.* Distinct cardiogenic preferences of two human embryonic stem cell (hESC) lines are imprinted in their proteomes in the pluripotent state. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, n. 4, p. 553–558, 2008.

MORENO-BUENO, G. *et al.* The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. **Nature Protocols**, v. 4, n. 11, p. 1591–1613, 2009.

MÜLLER-EHMSSEN, J. *et al.* Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 290, n. 1, p. H331-40, 2006.

MUMMERY, C. *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. **Circulation**, v. 107, n. 21, p. 2733–40, 3 jun. 2003.

MUMMERY, C. L. *et al.* Visceral-endoderm-like cell lines induce differentiation of murine P19 embryonal carcinoma cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 46, n. 1, p. 51–60, 1991.

NAIR, R.; NGANGAN, A. V.; MCDEVITT, T. C. Efficacy of solvent extraction methods for acellularization of embryoid bodies. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 6, p. 801–819, 2008.

NAIR, R.; SHUKLA, S.; MCDEVITT, T. C. Acellular matrices derived from

differentiating embryonic stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 87, n. 4, p. 1075–1085, 2008.

NAITO, A. T. *et al.* Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. **Pnas**, v. 103, n. 52, p. 19812–7, 2006.

NAWAZ, M. *et al.* Extracellular Vesicles: Evolving Factors in Stem Cell Biology. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

NELSON, M. R.; ROY, K. Bone-marrow mimicking biomaterial niches for studying hematopoietic stem and progenitor cells. **J. Mater. Chem. B**, v. 4, n. 20, p. 3490–3503, 2016.

NGANGAN, A. V *et al.* Soluble factors secreted by differentiating embryonic stem cells stimulate exogenous cell proliferation and migration. **Stem cell research & therapy**, v. 5, n. 1, p. 26, 2014.

NGUYEN, P. K.; RHEE, J.-W.; WU, J. C. Adult Stem Cell Therapy and Heart Failure, 2000 to 2016: A Systematic Review. **JAMA cardiology**, v. 1, n. 7, p. 831–841, 2016.

NIEBRUEGGE, S. *et al.* Generation of human embryonic stem cell-derived mesoderm and cardiac cells using size-specified aggregates in an oxygen-controlled bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 493–507, 2009.

NIIDA, A. *et al.* DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the  $\beta$ -catenin/TCF pathway. **Oncogene**, v. 23, n. 52, p. 8520–8526, 2004.

NIU, J. *et al.* Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14542–14551, 2008.

NOSEDA, M. *et al.* Cardiopoietic factors extracellular signals for cardiac lineage commitment. **Circulation Research**, v. 108, n. 1, p. 129–152, 2011.

OH, M. *et al.* Promotive effects of human induced pluripotent stem cell-conditioned medium on the proliferation and migration of dermal fibroblasts. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 5, p. 561–568, 2017.

OLSON, E. N. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. **Science**, v. 313, n. 5795, p. 1922–1927, 29 set. 2006.

OLSSON, A. K. *et al.* VEGF receptor signalling - In control of vascular function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 5, p. 359–371, 2006.

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

OVCHINNIKOV, D. A. *et al.* Transgenic human ES and iPS reporter cell lines for

identification and selection of pluripotent stem cells in vitro. **Stem cell research**, v. 13, n. 2, p. 251–261, 2014.

PAGANO, M. *et al.* Differentiation of H9c2 Cardiomyoblasts: The Role of Adenylate Cyclase System. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, n. 3, p. 408–416, 2004.

PAL, R.; KHANNA, A. Role of hepatocyte-like cells in the differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 14, n. 2, p. 153–161, 2005.

PARK, C. Y. *et al.* Cardiac Stem Cell Secretome Protects Cardiomyocytes from Hypoxic Injury Partly via Monocyte Chemotactic Protein-1-Dependent Mechanism. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–17, 2016.

PASSIER, R. *et al.* Increased Cardiomyocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Cultures. **Stem Cells**, v. 23, n. 6, p. 772–780, 2005.

PATEL, A. N. *et al.* Multipotent Menstrual Blood Stromal Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation. **Cell Transplantation**, v. 17, n. 3, p. 303–311, mar. 2008.

PATHAN, M. *et al.* FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. **Proteomics**, v. 15, n. 15, p. 2597–2601, 2015.

PATTERSON, M. *et al.* Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. **Nature Genetics**, v. 49, n. 9, p. 1346–1353, 7 ago. 2017.

PEREIRA, T. *et al.* MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–31, 2014.

PERRY, B. C. *et al.* Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 14, n. 2, p. 149–56, jun. 2008.

PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896–2902, 2007.

PINTO, A. R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. **Circulation Research**, v. 118, n. 3, p. 400–409, 2016.

POSCHL, E. *et al.* Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1619–1628, 1 abr. 2004.

PULINA, M. V. *et al.* Essential roles of fibronectin in the development of the left-right embryonic body plan. **Developmental Biology**, v. 354, n. 2, p. 208–220, 2011.

- QYANG, Y. *et al.* The Renewal and Differentiation of Isl1+ Cardiovascular Progenitors Are Controlled by a Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 2, p. 165–179, 2007.
- RAI, M. *et al.* Continuous Antagonism by Dkk1 Counter Activates Canonical Wnt Signaling and Promotes Cardiomyocyte Differentiation of Embryonic Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 1, p. 54–66, 2012.
- RAMSDELL, A. F. Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: Getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination. **Developmental Biology**, v. 288, n. 1, p. 1–20, 2005.
- RANE, A. A.; CHRISTMAN, K. L. Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: A 5-year update. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 25, p. 2615–2629, 2011.
- RAYNAUD, C. 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.
- REIS, L. A. *et al.* Biomaterials in myocardial tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 1, p. 11–28, jan. 2016.
- REUS, T. L. **Papel das proteínas secretadas por células residentes cardíacas como potenciais indutoras da diferenciação cardiomiogênica de células-tronco**. 132f. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia), Instituto Carlos Chagas, 2015.
- REZZA, A.; SENNETT, R.; RENDL, M. **Adult Stem Cell Niches. Cellular and Molecular Components**. [s.l: s.n.]. v. 107
- RIENKS, M. *et al.* Myocardial extracellular matrix: An ever-changing and diverse entity. **Circulation Research**, v. 114, n. 5, p. 872–888, 2014.
- RIENKS, M.; PAPAGEORGIOU, A. P. Novel regulators of cardiac inflammation: Matricellular proteins expand their repertoire. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 91, p. 172–178, 2016.
- ROBERT, A. W. *et al.* Tissue-Derived Signals for Mesenchymal Stem Cell Stimulation: Role of Cardiac and Umbilical Cord Microenvironments. **Cells Tissues Organs**, 2017.
- ROBERTSON, C.; TRAN, D.; GEORGE, S. Concise Review: Maturation Phases of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Stem Cells**, v. 31, n. 5, p. 1–17, 2013.
- ROGER, V. L. Epidemiology of Heart Failure. **Circulation Research**, v. 113, n. 6, p.

646–659, 30 ago. 2013.

ROMPKOSVKI, A. V. S. **Avaliação de fatores parácrinos derivados de tecido cardíaco humano sobre células-tronco adultas**. 185f. Tese de doutorado (Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia), Instituto Carlos Chagas, 2014.

SA, S.; MCCLOSKEY, K. E. Stage-Specific Cardiomyocyte Differentiation Method for H7 and H9 Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1120–1128, 2012.

SAINSON, R. C. A. *et al.* TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4997–5007, 2008.

SALCEDO, R. *et al.* Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 34–40, 2000.

SALUDAS, L. *et al.* Hydrogel based approaches for cardiac tissue engineering. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 523, n. 2, p. 454–475, 2017.

SANADA, S. *et al.* IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 6, p. 1538–1549, 2007.

SANTINI, M. P. *et al.* Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. **Development**, v. 143, n. 8, p. 1242–1258, 2016.

SART, S.; MA, T.; LI, Y. Extracellular matrices decellularized from embryonic stem cells maintained their structure and signaling specificity. **Tissue engineering. Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 54–66, 2014.

SCHITTINI, A. V. *et al.* Human cardiac explant-conditioned medium: soluble factors and cardiomyogenic effect on mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 8, p. 1015–1024, ago. 2010.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000.

SCHWANHÄUSSER, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337–342, 2011.

SCHWARTZ, P. H. *et al.* Traditional Human Embryonic Stem Cell Culture. **Methods Mol Biol**, v. 767, p. 107–123, 2011.

SCOTT, M. A. *et al.* Current Methods of Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p. 1793–1804, 2011.

SEGERS, V. F. M.; LEE, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 937–942, 2008.



SERCU, S. *et al.* Interaction of extracellular matrix protein 1 with extracellular matrix components: ECM1 is a basement membrane protein of the skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 6, p. 1397–1408, 2008.

SHARMA, M. B.; LIMAYE, L. S.; KALE, V. P. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: Recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. **Haematologica**, v. 97, n. 5, p. 651–660, 2012.

SHARMA, S. *et al.* A Deep Proteome Analysis Identifies the Complete Secretome as the Functional Unit of Human Cardiac Progenitor Cells Novelty and Significance. **Circulation Research**, v. 120, n. 5, p. 816–834, 3 mar. 2017.

SHEN, C. *et al.* Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 20–30, 2015.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097–1105, 2011.

SHOSHANI, O. *et al.* Cell isolation induces fate changes of bone marrow mesenchymal cells leading to loss or alternatively to acquisition of new differentiation potentials. **Stem Cells**, v. 32, n. 8, p. 2008–2020, 2014.

SILLER, R. *et al.* Small-molecule-driven hepatocyte differentiation of human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 5, p. 939–952, 2015.

SIMONS, B. D.; CLEVERS, H. Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues. 2011.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 26, n. 1, p. 397–419, 10 nov. 2010.

SINGH, V. K. *et al.* Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 3, n. February, p. 2, 2015.

SMITS, A. M.; DRONKERS, E.; GOUMANS, M. J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. **Pharmacological Research**, 2017.

SOCHACKI, J. *et al.* Generation of iPS cell lines from schizophrenia patients using a non-integrative method. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 97–101, jul. 2016.

SRIVASTAVA, D. Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to

Morphogenesis. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1037–1048, 2006.

STADTFELD, M. *et al.* Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications. p. 2239–2263, 2010.

STAMATOVIC, S. M. *et al.* CCL2 Regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2651–2661, 15 ago. 2006.

STASTNA, M. *et al.* Identification and functionality of proteomes secreted by rat cardiac stem cells and neonatal cardiomyocytes. **Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 245–253, 2010.

SULTANA, N. *et al.* Resident c-kit + cells in the heart are not cardiac stem cells. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–10, 2015.

SUN, X.; NUNES, S. S. Biowire platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Methods**, v. 101, p. 21–26, 2016.

SUTTON, S. J.; SHARPE, N. Clinical Cardiology : New Frontiers Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Pathophysiology and Therapy. p. 2981–2988, 2000.

TAAPKEN, S. M. *et al.* Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 313–4, 2011.

TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.

\_\_\_\_\_. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 30 nov. 2007.

TAKEDA, N.; MANABE, I. Cellular Interplay between Cardiomyocytes and Nonmyocytes in Cardiac Remodeling. **International Journal of Inflammation**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

TAKEUCHI, H.; NAKATSUJI, N.; SUEMORI, H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. **Scientific reports**, v. 4, p. 4488, 2014.

TAMURA, K. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-7 (IGFBP7) blocks vascular endothelial cell growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in human vascular endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 610, n. 1–3, p. 61–67, 2009.

TANG, J. *et al.* Therapeutic microparticles functionalized with biomimetic cardiac stem cell membranes and secretome. **Nature Communications**, v. 8, n. May 2016,

p. 1–9, 2017.

TELANG, S. *et al.* Depletion of ascorbic acid restricts angiogenesis and retards tumor growth in a mouse model. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 1, p. 47–56, 2007.

TENG, X. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 2415–2424, 2015.

THAKKER, R.; YANG, P. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 7, p. 323, 6 jul. 2014.

THOMSON, J. A. *et al.* Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, 1998.

TIMMERS, L. *et al.* Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. **Stem Cell Research**, v. 1, n. 2, p. 129–137, 2008.

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

TIRZIU, D.; GIORDANO, F. J.; SIMONS, M. Cell communications in the heart. **Circulation**, v. 122, n. 9, p. 928–937, 2010.

TIRZIU, D.; SIMONS, M. Endothelium as master regulator of organ development and growth. **Vascular Pharmacology**, v. 50, n. 1–2, p. 1–7, jan. 2009.

UENO, S. *et al.* Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 23, p. 9685–9690, 2007.

VALAMEHR, B. *et al.* Hydrophobic surfaces for enhanced differentiation of embryonic stem cell-derived embryoid bodies Results. **Pnas**, v. 105, n. 38, p. 14459–14464, 2008.

VILLA-DIAZ, L. G. *et al.* Concise Review: The Evolution of human pluripotent stem cell culture: From feeder cells to synthetic coatings. **STEM CELLS**, v. 31, n. 1, p. 1–7, jan. 2013.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

VORONOV, E.; CARMİ, Y.; APTE, R. N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. **Frontiers in Physiology**, v. 5 MAR, n. March, p. 1–11, 2014.

VUKICEVIC, M. *et al.* Cardiac 3D Printing and its Future Directions. **JACC:**

**Cardiovascular Imaging**, v. 10, n. 2, p. 171–184, fev. 2017.

VUORENPÄÄ, H. *et al.* Maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes is improved in cardiovascular construct. **Cytotechnology**, v. 69, n. 5, p. 785–800, 2017.

WAGNER, M.; SIDDIQUI, M. A Q. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 232, n. 7, p. 852–865, 2007.

WALSH, K.; SHIOJIMA, I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 11, p. 3176–3179, 2007.

WANG, F. *et al.* Regulation of cardiac fibroblast cellular function by leukemia inhibitory factor. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 10, p. 1309–1316, 2002.

WANG, H.-S. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 1 dez. 2004.

WANG, J.-H. *et al.* Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis via the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. **Laboratory Investigation**, v. 96, n. 8, p. 839–852, 2016.

WANG, R. M.; CHRISTMAN, K. L. Decellularized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 96, n. 5, p. 77–82, jan. 2016.

WANG, R. N. *et al.* Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. **Genes & Diseases**, v. 1, n. 1, p. 87–105, 2014.

WANG, Y. *et al.* Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. **American Journal of Physiology**, v. 301, p. C695–C704, 2011.

WANG, Y. *et al.* TNF- $\alpha$ -induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 3, p. e2715-9, 2017.

WEINBERGER, F. *et al.* Localization of islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1303–1310, 2012.

WHO, W. H. O. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 21 jan. 2018.

WIJK, B. VAN; MOORMAN, A. F. M.; HOFF, M. J. B. VAN DEN. Role of bone

morphogenetic proteins in cardiac differentiation. **Cardiovascular Research**, v. 74, n. 2, p. 244–255, 2007.

WINKLE, A. P. VAN; GATES, I. D.; KALLOS, M. S. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. **Cells Tissues Organs**, v. 196, n. 1, p. 34–47, 2012.

WINNIER, G. *et al.* Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. **Genes & Development**, v. 9, n. 17, p. 2105–2116, 1 set. 1995.

WOLCHINSKY, Z. *et al.* Angiomodulin is required for cardiogenesis of embryonic stem cells and is maintained by a feedback loop network of p63 and Activin-A. **Stem Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 49–59, 2014.

XIN, T.; GRECO, V.; MYUNG, P. Hardwiring Stem Cell Communication through Tissue Structure. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1212–1225, 2016.

YACOUB, M. H.; TERROVITIS, J. CADUCEUS, SCIPIO, ALCADIA: Cell therapy trials using cardiac-derived cells for patients with post myocardial infarction LV dysfunction, still evolving. **Global cardiology science & practice**, v. 2013, n. 1, p. 5–8, 2013.

YAMAUCHI-TAKIHARA, K. *et al.* Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6. **Circulation**, v. 91, n. 5, p. 1520–4, 1 mar. 1995.

YANG, X.; PABON, L.; MURRY, C. E. Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. **Circulation Research**, v. 114, n. 3, p. 511–523, 2014.

YAP, M. S. *et al.* Neural differentiation of human pluripotent stem cells for nontherapeutic applications: Toxicology, pharmacology, and in vitro disease modeling. **Stem Cells International**, v. 2015, 2015.

YE, L. *et al.* Effective Cardiac Myocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Requires VEGF. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

YOUSEF, H. *et al.* Mechanisms of action of hESC-secreted proteins that enhance human and mouse myogenesis. **Aging**, v. 6, n. 8, p. 602–620, 2014.

YU, J.; THOMSON, J. Pluripotent stem cell lines. **Genes & development**, p. 1987–1997, 2008.

YUE, B. Biology of the extracellular matrix: An overview. **Journal of Glaucoma**, v. 23, n. 8, p. S20–S23, 2014.

YURCHENCO, P. D. Basement Membranes: Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, p. a004911–

a004911, 1 fev. 2011.

YUTZEY, K. E. Cardiomyocyte Proliferation - Teaching an Old Dogma New Tricks.

**Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 627–629, 17 fev. 2017.

ZAEHRES, H. *et al.* High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells.

**Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 3, p. 299–305, 2005.

ZANELLA, F.; LORENS, J. B.; LINK, W. High content screening: Seeing is believing.

**Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 237–245, 2010.

ZHANG, H.; BRADLEY, A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. **Development (Cambridge, England)**,

v. 122, n. 10, p. 2977–2986, 1996.

ZHANG, J. *et al.* Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method. **Circulation**

**Research**, v. 111, n. 9, p. 1125–1136, 2012.

ZHANG, T. *et al.* Regulating osteogenesis and adipogenesis in adipose-derived stem cells by controlling underlying substrate stiffness. **Journal of Cellular Physiology**, n.

July, 2017.

ZHANG, X. *et al.* Pax6 Is a Human Neuroectoderm Cell Fate Determinant. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 90–100, jul. 2010.

ZHANG, X. *et al.* Cardiomyocyte differentiation induced in cardiac progenitor cells by cardiac fibroblast-conditioned medium. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**,

v. 239, n. 5, p. 628–37, 2014.

ZHANG, Y. *et al.* Cardiac Repair with a Novel Population of Mesenchymal Stem Cells Resident in the Human Heart. **Stem Cells**, v. 33, n. 10, p. 3100–3113, 2015.

ZHOU, B. *et al.* Nkx2.5 and Islet1 expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 375, n. 3, p. 450–453, 2008.

ZHOU, P.; PU, W. T. Recounting cardiac cellular composition. **Circulation Research**, v. 118, n. 3, p. 368–370, 2016.

ZHOU, S. *et al.* Reprogramming malignant cancer cells toward a benign phenotype following exposure to human embryonic stem cell microenvironment. **PLoS ONE**, v.

12, n. 1, p. 1–21, 2017.

ZOELLER, J. J.; WHITELOCK, J. M.; IOZZO, R. V. Perlecan regulates

developmental angiogenesis by modulating the VEGF-VEGFR2 axis. **Matrix**

**Biology**, v. 28, n. 5, p. 284–291, 2009.

ZWI, L. *et al.* Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells.

**Circulation**, v. 120, n. 15, p. 1513–1523, 2009.

## APÊNDICE 1 – RESULTADOS DA CURVA DE EFICIÊNCIA DE PRIMERS

<b>Gene</b>	<b>Slope</b>	<b>Eficiência</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
GAPDH	-3.5134	1.93	1.00
OCT3/4	-3,212	2.05	1.00
Nanog	-3,313	2.00	0.99
REX1	-3.3896	1.97	0.99
EOMES	-3.6016	1.90	0.99
BRACH	-3,575	1.90	0.98
FOXA2	-3.1858	2.06	0.98
PAX6	-3.3890	1.97	0.99
NES	-3.3000	2.01	0.99
AFP	-3,188	2.06	0.99
GATA4	-3.2727	2.02	1.00
Nkx2.5	-3.5067	1.93	1.00
Tnlc	-3.3625	1.98	0.99
TnTc	-3.3740	1.98	0.99

Tabela com as informações sobre curva de eficiência dos primers utilizados na PCR quantitativa. Uma boa reação deve ter eficiência entre 90% e 110%, o que corresponde a um *slope* (inclinação da reta) entre -3,58 e -3,10. R<sup>2</sup> é o coeficiente de correlação obtido para a curva padrão e deve ser >0,99.

## APÊNDICE 2 – LISTA DE REAGENTES

<b>Produto</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Nº Catálogo</b>	<b>Diluição</b>
Anticorpo Anti-conexina43	BD	610062	1:100
Anticorpo anti-GATA4	Santa Cruz	sc-9053	1:100
Anticorpo Anti-Ki67	Abcam	ab15580	1:300
Anticorpo Anti-Nkx2.5	Santa Cruz	sc-365207	1:50
Anticorpo anti-Oct4	Abcam	ab27985-100	1:100
Anticorpo anti-TRA-1-60	Abcam	ab16288	1:100
Anticorpo anti-TRA-1-81	Abcam	ab16289	1:100
Anticorpo Anti-troponina I cardíaca	Santa Cruz	sc-15368	1:100
Anticorpo Anti-troponina T cardíaca	ThermoFischer	MS-295-P	1:100
Colagenase tipo I	Sigma	C-0130	20 mg/mL
Costar® Ultra-Low Attachment plate	Corning	3471	-
DNase I	Invitrogen	18047-019	-
Knockout™ Serum Replacement	Gibco	10828028	-
L-Ácido ascórbico	Sigma	A-4544	10 mg/mL
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning	356230	-
Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning	354277	-
Monotioglicerol	Sigma	M-6145	-
mTeSR™ 1	StemCell Technologies	85850	-
Recombinant Human Activin A Protein, CF	R&D Systems	338-AC/CF	10 µg/mL
Recombinant Human BMP-4 Protein	R&D Systems	314-BP	10 µg/ML
Recombinant Human FGF basic	R&D Systems	233-FB	10 µg/mL
Recombinant Human VEGF	R&D Systems	293-VE	5 µg/mL
StemPro 34 SFM (1x)	Gibco	10639011	-
Transferrina	Roche	10 652 202	30 mg/mL
XAV939	Sigma	X3004	10 µg/mL



### APÊNDICE 3 – PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO MCA E MCV

Nome do gene	Gene id	MCA	MCV
HCG1811539, isoform CRA_b	A0A024QZV0	X	X
cDNA FLJ36740 fis, clone UTERU2013322, highly similar to Biglycan	A6NLG9	X	X
Alpha-actinin-1	ACTN1	X	X
Aminopeptidase N	ANPEP	X	X
Annexin	ANXA1	X	X
cDNA FLJ60062, highly similar to 78 kDa glucose-regulated protein	B4DEF7	X	X
cDNA FLJ54596, highly similar to Proactivator polypeptide	B4DEK5	X	X
cDNA FLJ54023, highly similar to Heat shock protein HSP 90-beta	B4DMA2	X	X
cDNA FLJ51896, highly similar to Glia-derived nexin	B4DMR3	X	X
cDNA FLJ55253, highly similar to Actin, cytoplasmic 1	B4DW52	X	X
cDNA FLJ54318, highly similar to Complement C1r subcomponent	B4E1B0	X	X
cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin	B4E1B2	X	X
cDNA FLJ50715, highly similar to Importin beta-1 subunit	B7Z752	X	X
cDNA, FLJ79193, highly similar to Beta-1,4-galactosyltransferase 1	B7ZAH9	X	X
Complement C1s subcomponent	C1S	X	X
Complement C3	C3	X	X
Girdin	CCDC88A	X	X
C-C motif chemokine 2	CCL2	X	X
C-C motif chemokine 27	CCL27	X	-
T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	X	-
C-type lectin domain family 11 member A	CLEC11A	X	X
Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	X	X
Clathrin heavy chain 1	CLTC	X	X
Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	X	-
Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	X	X
Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	X	X
Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2	X	X
Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	X	X
Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	X	X
Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	X	X
C-X-C motif chemokine 1	CXCL1	X	X
DDB1- and CUL4-associated factor 5	DCAF5	X	X
Decorin	DCN	X	X
Extracellular matrix protein 1	ECM1	X	X
Elongation factor 2	EEF2	X	X
GF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	X	X
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	X	X
Alpha-enolase	ENO1	X	X
Erythropoietin	EPO	-	X
Fibrillin-1	FBN1	X	X
Filamin-A	FLNA	X	X
Fibronectin	FN1	X	X

Follistatin-related protein 1	FSTL1	X	X
Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2	X	X
Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored molecule-like protein	GML	X	X
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	X	X
Glutathione S-transferase P	GSTP1	X	X
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	X	X
Heat shock 70 kDa protein 6	HSP76	X	X
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	X	X
Interferon gamma	IFNG	X	X
Insulin-like growth factor-binding protein 7	IGFBP7	X	X
Pro-interleukin-16	IL16	X	-
Interleukin-17A	IL17A	X	X
Interleukin-1 beta	IL1B	X	X
Interleukin-6	IL6	X	X
Interleukin-8	IL8	X	X
Laminin subunit alpha-4	LAMA4	X	X
Laminin subunit beta-1	LAMB1	X	X
Laminin subunit gamma-1	LAMC1	X	X
L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	X	X
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	X	X
Leukemia inhibitory factor	LIF	X	X
Lumican	LUM	X	-
Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MAN1A1	X	X
Matrix metalloproteinase-1	MMP1	X	X
Matrix metalloproteinase-2	MMP2	X	X
Matrix metalloproteinase-3	MMP3	-	X
Moesin	MSN	X	X
Myosin-13	MYH13	X	X
Nucleobindin-1	NUCB1	X	X
Protein disulfide-isomerase	P4HB	X	X
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1	PACSIN1	X	-
Pappalysin-1	PAPPA	X	X
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOLCE	X	X
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD	X	X
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	X	X
Plastin-3	PLS3	X	X
Phospholipid transfer protein	PLTP	X	X
Pogo transposable element with ZNF domain	POGZ	X	X
Periostin	POSTN	X	X
Peroxiredoxin-1	PRDX1	X	X
Peroxiredoxin-6	PRDX6	X	X
Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	X	X
Peroxidasin homolog	PXDN	X	X
Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant	Q53HF2	X	X
Translation elongation factor 1 alpha 1-like 14	Q96RE1	X	X
Uncharacterized protein	Q9HBP0	X	X

Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	X	X
Importin-5	RANBP5	X	X
Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	X	X
Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	X	X
Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1	X	X
Serpin H1	SERPINH1	X	X
SPARC	SPARC	X	X
Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX	X	X
Stanniocalcin-2	STC2	X	-
Transaldolase	TALDO1	X	X
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	X	X
Thrombospondin-1	THBS1	X	X
Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	X	X
Tenascin	TNC	X	X
Tumor necrosis factor	TNF	X	X
Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	TNFAIP6	X	-
Tumor rejection antigen (Gp96) 1	TRA1	X	X
Tubulin beta chain	TUBB	X	X
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase	UAP1	X	X
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	UCHL1	X	X
Protein disulfide-isomerase	V9HVV3	X	X
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	HEL-S-162eP	X	X
Annexin	HEL-S-270	X	X
Pyruvate kinase	HEL-S-30	X	X
L-lactate dehydrogenase	HEL-S-133P	X	X
Epididymis luminal protein 107	HEL107	X	X
Annexin	HEL-S-7	X	X
Phosphoglycerate kinase	HEL-S-68p	X	X
Purine nucleoside phosphorylase	HEL-S-156an	X	X
Fructose-bisphosphate aldolase	HEL-S-87p	X	X
Vasorin	VASN	X	X
Vimentin	VIM	X	X
Tyrosine-protein kinase Yes	YES1	X	X
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	X	X

## APÊNDICE 4 – RESULTADOS DA ANÁLISE NO IPA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NO MCA E MCV

Tabelas com os resultados da análise do *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA®) com as proteínas identificadas no MCA e no MCV. Estão indicados os resultados para *Diseases and Functions* (os 15 “termos” mais representados, classificados pelo p-value) e as Redes gênicas (*Networks*) para cada grupo de proteínas.

<b>Análise IPA® - Diseases and Functions - MCA</b>				
Categories - MCA	Diseases or Functions Annotation	p-Value	Molecules	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	3,94E-23	ACTB,ACTN1,ANPEP,ANXA1,ANXA2,C3,CCDC88A,CCL2,CLEC11A,COL1A1,COL6A1,COL6A2,COL6A3,CXCL1,CXCL8,DCN,ECM1,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,ENO1,FBN1,FLNA,FN1,GAPDH,GML,GPI,GSTP1,HNRNPK,HSP90AB1,HSPA5,HSPG2,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,INHBA,LAMB1,LAMC1,LDHA,LIF,MMP1,MMP2,PDIA3,PGK1,PKM,PLOD2,PLS3,PNP,POSTN,PSAP,PTX3,PXDN,QSOX1,SERPINE1,SERPINE2,SERPINF1,SERPINH1,SPARC,TF,TGFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,TUBB,UCHL1,YES1,YWHAZ	70
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	advanced malignant tumor	2,19E-19	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA,FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IFNG,IGFBP7,IL16,IL17A,IL6,MMP1,MMP2,PAPPA,PCOLCE,PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SERPING1,SRPX,THBS1,TNF,TUBB,VIM,YES1,YWHAZ	33
Dermatological Diseases and Conditions	psoriasis	4,22E-19	ANXA1,ANXA2,C3,CCL2,CCL27,CXCL1,CXCL8,EEF1A1,FN1,GAPDH,GSTP1,HSPA5,HSPA8,IFNG,IGFBP7,IL16,IL17A,IL1B,IL6,KPNB1,LGALS3BP,MMP1,MMP2,P4HB,PKM,POSTN,PSAP,SERPINE1,TF,TNC,TNF,TNFAIP6,TUBB	33
Cardiovascular System Development and Function, Organismal Development	vasculogenesis	4,83E-19	ANPEP,C3,CCL2,COL1A1,CXCL1,CXCL8,DCN,ECM1,FLNA,FN1,HSPG2,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,MMP2,PKM,PTX3,SERPINE1,SPARC,THBS1,TNC,TNF,VIM,YWHAZ	26
Neurological Disease	progressive motor neuropathy	4,81E-18	ACTB,ANXA1,ANXA2,ANXA5,C3,CCL2,COL1A1,COL3A1,CXCL1,EEF1A1,EIF4A1,GSTP1,HSPA5,IFNG,IL17A,IL1B,IL6,LDHA,LDHB,LUM,PDIA3,PGK1,PSAP,SERPING1,SPARC,TIMP1,TNC,TNF,UCHL1,VIM	30
Cardiovascular System Development and Function, Organismal Development	angiogenesis	8,57E-18	ANPEP,C3,CCL2,COL1A1,CXCL1,CXCL8,DCN,ECM1,FLNA,FN1,HSPG2,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,MMP2,PKM,PTX3,SERPINE1,SERPINF1,SPARC,THBS1,TNC,TNF,VIM,YWHAZ	27
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	metastasis	5,98E-17	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA,FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL6,MMP1,MMP2,PAPPA,PCOLCE,PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SRPX,THBS1,TNF,TUBB,VIM,YWHAZ	28
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	advanced stage solid tumor	1,59E-16	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA,FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL17A,IL6,MMP2,PAPPA,PCOLCE,PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SERPING1,SRPX,THBS1,TUBB,YES1,YWHAZ	28
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	metastatic solid tumor	1,09E-15	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA,FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL6,MMP2,PAPPA,PCOLCE,PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SRPX,THBS1,TUBB,YWHAZ	25

Metabolic Disease	amyloidosis	1,16E-15	ACTB,BGN,C1R,C3,CCL2,CCL27,CXCL8,DCN,EEF2,GAPDH,HSPA5,HSPG2,IL1B,IL6,MMP1,MMP2,PLTP,PRDX1,PSAP,SE RPINE2,SPARC,TF,TGFBI,TIMP1,TNF,TUBB,UCHL1,VIM,YWHAZ	29
Dermatological Diseases and Conditions, Inflammatory Disease, Skeletal and Muscular Disorders	juvenile dermatomyositis	1,48E-15	BGN,COL1A1,COL3A1,COL5A2,COL6A1,COL6A2,COL6A3,PL OD2,PLS3,SERPINH1,SPARC,TGFBI	12
Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Skeletal and Muscular Disorders	autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy	2,88E-15	BGN,COL1A1,COL3A1,COL5A2,COL6A1,COL6A2,COL6A3,PL OD2,PLS3,SERPINH1,SPARC,TGFBI	12
Metabolic Disease, Neurological Disease, Psychological Disorders	Alzheimer's disease	3,29E-15	ACTB,BGN,C1R,C3,CCL2,CCL27,CXCL8,DCN,EEF2,GAPDH,HSPA5,HSPG2,IL1B,IL6,MMP1,MMP2,PLTP,PRDX1,PSAP,SE RPINE2,SPARC,TF,TIMP1,TNF,TUBB,UCHL1,VIM,YWHAZ	28
Organismal Survival	organismal death	7,60E-15	ACTB,COL6A2,CXCL8,EIF4A1,FLNA,GSTP1,HNRNPK,HSP90 AB1,IFNG,IL1B,IL6,MMP2,MSN,PAPPA,PKM,PLS3,POGZ,POSTN,SERPINE1,TIMP1,TNF,VIM	22
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	breast or ovarian cancer	7,79E-15	ALDOA,ANXA1,CCL2,CLIC1,COL12A1,COL1A1,COL3A1,CXC L1,CXCL8,DCN,ECM1,EEF1A1,EIF4A1,ENO1,FBN1,FLNA, FN1,GAPDH,GSTP1,HSP90AB1,HSP90B1,IL17A,IL1B,IL6,INHBA,L AMB1,LIF,MMP1,MMP2,NUCB1,P4HB,PDIA3,PGK1,PKM,POSTN,PXDN,QSOX1,SERPINE1,SERPINF1,SERPING1,SPARC,T GFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,TUBB,VASN,VIM,YES1,YWHAZ	51

### Análise IPA® - Diseases and Functions - MCV

Categories - MCV	Diseases or Functions Annotation	p-Value	Molecules	# Molecules
Cellular Growth and Proliferation	proliferation of cells	6,62E-26	ACTB,ACTN1,ANPEP,ANXA1,ANXA2,C3,CCDC88A,CCL2,CLE C11A,COL1A1,COL6A1,COL6A2,COL6A3,CXCL1,CXCL8,DCN, ECM1,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,ENO1,EPO,FBN1,FLNA, FN1,GAPDH,GML,GPI,GSTP1,HNRNPK,HSP90AB1,HSPA5,HSPG2 ,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,INHBA,LAMB1,LAMC1,LDHA,LIF ,MMP1,MMP2,PDIA3,PGK1,PKM,PLOD2,PLS3,PNP,POSTN,P SAP,PTX3,PXDN,QSOX1,SERPINE1,SERPINE2,SERPINF1,S ERPINH1,SPARC,TF,TGFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,TUBB,U CHL1,YES1,YWHAZ	71
Cardiovascular System Development and Function, Organismal Development	vasculogenesis	8,01E-21	ANPEP,C3,CCL2,COL1A1,CXCL1,CXCL8,DCN,ECM1,EPO,FL NA, FN1,HSPG2,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,MMP2,PKM,PTX 3,SERPINE1,SPARC,THBS1,TNC,TNF,VIM,YWHAZ	27
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	advanced malignant tumor	3,71E-20	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1, FLNA, FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL6,MMP 1,MMP2,MMP3,PAPPA,PCOLCE,PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE 1,SERPING1,SRPX,THBS1,TNF,TUBB,VIM,YES1,YWHAZ	33
Cardiovascular System Development and Function,	angiogenesis	1,65E-19	ANPEP,C3,CCL2,COL1A1,CXCL1,CXCL8,DCN,ECM1,EPO,FL NA, FN1,HSPG2,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,MMP2,PKM,PTX 3,SERPINE1,SERPINF1,SPARC,THBS1,TNC,TNF,VIM,YWHAZ	28

Organismal Development				
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	metastasis	1,26E-18	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA, FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL6,MMP1,MMP2,MM P3,PAPPA,PCOLCE, PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SRPX,TH BS1,TNF,TUBB,VIM,YWHAZ	29
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	advanced stage solid tumor	3,52E-18	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA, FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL17A,IL6,MMP2,MM P3,PAPPA,PCOLCE, PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SERPING 1,SRPX,THBS1,TUBB, YES1,YWHAZ	29
Neurological Disease	progressive motor neuropathy	1,02E-17	ACTB,ANXA1,ANXA2,ANXA5,C3,CCL2,COL1A1,COL3A1,CXC L1,EEF1A1,EIF4A1,GSTP1,HSPA5,IFNG,IL17A,IL1B,IL6,LDHA, LDHB,PDIA3,PGK1,PSAP,SERPING1,SPARC,TIMP1,TNC,TNF ,UCHL1,VIM	29
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	metastatic solid tumor	2,66E-17	ANPEP,C1R,CCL2,COL6A3,CXCL8,EEF1A1,EFEMP1,EIF4A1,FLNA, FN1,HSP90AB1,HSP90B1,IGFBP7,IL6,MMP2,MMP3,PA PPA,PCOLCE, PLOD2,PLS3,PTX3,SERPINE1,SRPX,THBS1,T UBB,YWHAZ	26
Dermatological Diseases and Conditions	psoriasis	6,62E-17	ANXA1,ANXA2,C3,CCL2,CXCL1,CXCL8,EEF1A1, FN1,GAPDH, GSTP1,HSPA5,HSPA8,IFNG,IGFBP7,IL17A,IL1B,IL6,KPNB1,L GALS3BP,MMP1,MMP2,P4HB,PKM,POSTN,PSAP,SERPINE1, TF,TNC,TNF,TUBB	30
Cancer, Organismal Injury and Abnormalities	breast or ovarian cancer	1,08E-16	ALDOA,ANXA1,CCL2,CLIC1,COL1A1,COL3A1,CXCL1,CXCL8, DCN,ECM1,EEF1A1,EIF4A1,ENO1,EPO,FBN1,FLNA, FN1,GAP DH,GSTP1,HSP90AB1,HSP90B1,IL17A,IL1B,IL6,INHBA,LAMB 1,LIF,MMP1,MMP2,MMP3,NUCB1,P4HB,PDIA3,PGK1,PKM,PO STN,PXDN,QSOX1,SERPINE1,SERPINF1,SERPING1,SPARC, TGFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,TUBB,VASN,VIM,YES1,YWHA Z	52
Organismal Survival	organismal death	1,98E-16	ACTB,COL6A2,CXCL8,EIF4A1,EPO,FLNA,GSTP1,HNRNPK,H SP90AB1,IFNG,IL1B,IL6,MMP2,MSN,PAPPA,PKM,PLS3,POGZ ,POSTN,SERPINE1,TIMP1,TNF,VIM	23
Inflammatory Disease	chronic inflammatory disorder	3,40E-16	ALDOA,ANXA1,BGN,C3,CCL2,COL1A1,COL3A1,CXCL1,CXCL 8,EEF2,ENO1,EPO,HSP90B1,HSPA5,HSPA8,IFNG,IL17A,IL1B, IL6,LDHB,MMP1,MMP2,MMP3,P4HB,PDIA3,PGK1,PKM,PRDX 1,SERPINE1,TF,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,UCHL1,VIM	36
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	5,25E-16	ANPEP,ANXA1,ANXA2,CCDC88A,CCL2,COL1A1,CXCL8,DCN, EPO,FLNA, FN1,HNRNPK,IFNG,IL1B,IL6,LGALS3BP,MMP1,M MP2,MMP3,MSN,PKM,POSTN,SERPINE1,SERPINF1,SPARC, TGFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,VIM	31
Dermatological Diseases and Conditions, Inflammatory Disease, Skeletal and Muscular Disorders	juvenile dermatomyositis	7,79E-16	BGN,COL1A1,COL3A1,COL5A2,COL6A1,COL6A2,COL6A3,PL OD2,PLS3,SERPINH1,SPARC,TGFBI	12
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1,11E-15	ANPEP,ANXA1,ANXA2,CCDC88A,CCL2,COL1A1,CXCL8,DCN, EPO,FLNA, FN1,GPI,HNRNPK,IFNG,IL1B,IL6,LGALS3BP,LIF,M MP1,MMP2,MMP3,MSN,PKM,POSTN,SERPINE1,SERPINF1,S PARC,TGFBI,THBS1,TIMP1,TNC,TNF,VIM	33

### Análise IPA® - NETWORKS - MCA

ID	Molecules in Network -MCA	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	ACTN1,ANXA2,BCR (complex),caspase,Cdk,CLTC,COL6A2, COL6A3,Collagen Alpha1,Cyclin A, EEF1A1,FBN1,Focal adhesion kinase,GSTP1, hemoglobin, HNRNPK,Hsp70,Hsp90,HSP90AB1, HSPA8 ,IL6,IL17A,Immunoglobulin,Jnk, LGALS3BP,MHC Class I (complex),N-cor,p85 (pik3r),PDIA3,PNP, PRDX6,SPARC,TIMP1, TUBB,YWHAZ	34	21	Cellular Growth and Proliferation, Liver Cirrhosis, Cancer

2	Actin,Alp,ANXA5,CD3,COL3A1,COL6A1,EEF2,ENO1,ERK1/2,estrogen receptor,FLNA,FN1,GAPDH, GPI,Histone h3,IFN Beta, IFNG,IgG,IL23,IL12 (family),MAN1A1,MAP2K1/2,MSN,P38 MAPK, PGK1,PKM,PLS3,POSTN, RNA polymerase II, SERPINE1,SERPINF1,TCF,TCR,THBS1,VIM	32	20	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Organismal Functions
3	Ap1,C3,CCL2,CCL27,CLEC11A,Cpla2,CXCL1,ECM1,Eotaxin,Fc er1,Fcgr3,Gm-csf,HLA-DQ,HLA-DR, HSPG2,Iga,Ikb,IL1,IL16,IL12 (complex),IL1B, INHBA,LDL,lymphotoxin-alpha1-beta2,MHC Class II (complex),MMP1 ,Nr1h,PLOD2,PTX3,SAA,SCAVENGER receptor CLASS A,Sod,Tlr,TNF,Tnf receptor	20	14	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Movement, Immune Cell Trafficking
4	ACTB,Akt,ANXA1,BGN,C1q,C1R,C1S,Cg,COL12A1,COL1A1,Cre b,CXCL8,DCN,ERK,Fibrinogen,Gsk3,HDL,Hsp27,HSP90B1,HSP A5,Igm,IKK (complex), LIF,Mapk,Mek,MMP2,NFkB (complex), PDGF BB,PI3K (complex),PI3K(family),Pkc(s),Ras,Rock,TNC, Vegf	20	14	Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities
5	AGTR1,Akt,ANPEP,CCDC88A,CLIC1,COL6A3,EIF4A1,ENPP1,F 11,GUSB,HEXA,HEXB,HNF1A,IL1B,ITPA,KPNB1,LANCL2,MMP 25,NAP1L1,PABPC4,PCOLCE,PIK3R2,PLA1A,QSOX1,RPL7A,R PS17,RPS4X,RPTOR,SERPING1,SERPINH1,TGFB1,TGFBI,TK T,TNFAIP6,TPM4	20	14	Carbohydrate Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry
6	ALDOA,AQP3,CCND1,CCT4,CCT5,CCT7,CCT8,CCT6A,CD44,E EF1A1,ELF5,EPCAM,Filamin,FOXA1,FSTL1,GCN1,IPO5,KCNIP 3,LAMB1,LAMC1,MEMO1,miR-122-5p (miRNAs w/seedGGAGU GU), MYOC,NCSTN, NRIP1,P4HB, PCDH11Y,PECAM1, PSEN1, PXDN,SLC7A11,SLPI,STC2,TF,VASN	16	12	Cellular Assembly and Organization, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Reproductive System Development and Function
7	ABCB4,ABLIM,ADCY7,ATP9A,CDKN1A,COL5A2,DUSP3,EFEM P1,FSH,GNRH,H2AFV,HGF,Histone h4,IGFBP7,LAMA4, LDHA, Lh,MAPK1, P2RX4, PACSIN1,PDXK,PLOD1,PPP4R2, PRDX1, PRKX,PSAP,PTPRN,RELA,RNF144B,TLK1,TP53,TP73,UCHL1, VEGFA,YES1	14	11	Cell Death and Survival, Connective Tissue Development and Function, Cancer
8	ACSL5,ACTN4,ADGRG2,AIM1,CPS1,CTNNB1,EPHB2,FGF9,GD F15,HNMT,HNRNPA2B1,ID3,IFITM1,IGFBP4,INHBB,LDHB,LOX, LUM,MMP7,MT1L,NRCAM,NRP2,PAPPA,PCSK9,PDE4B,PPAP2 B,SEMA3B,SERPINE2,SMARCA4,SRPX,SRSF1,TRRAP,TSPAN 8,UBD,VCAN	5	5	Cellular Movement, Cancer, Organismal Injury and Abnormalities
9	NUPR1,UAP1	2	1	Carbohydrate Metabolism, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry
10	B4GALT1,UXT	2	1	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Immunological Disease
11	AP2A1,TALDO1,ZNF143	2	1	Hereditary Disorder, Metabolic Disease, Carbohydrate Metabolism
12	APOA1,APOE,CCNK,HDL-cholesterol,PLTP	1	1	Lipid Metabolism, Molecular Transport, Small Molecule Biochemistry

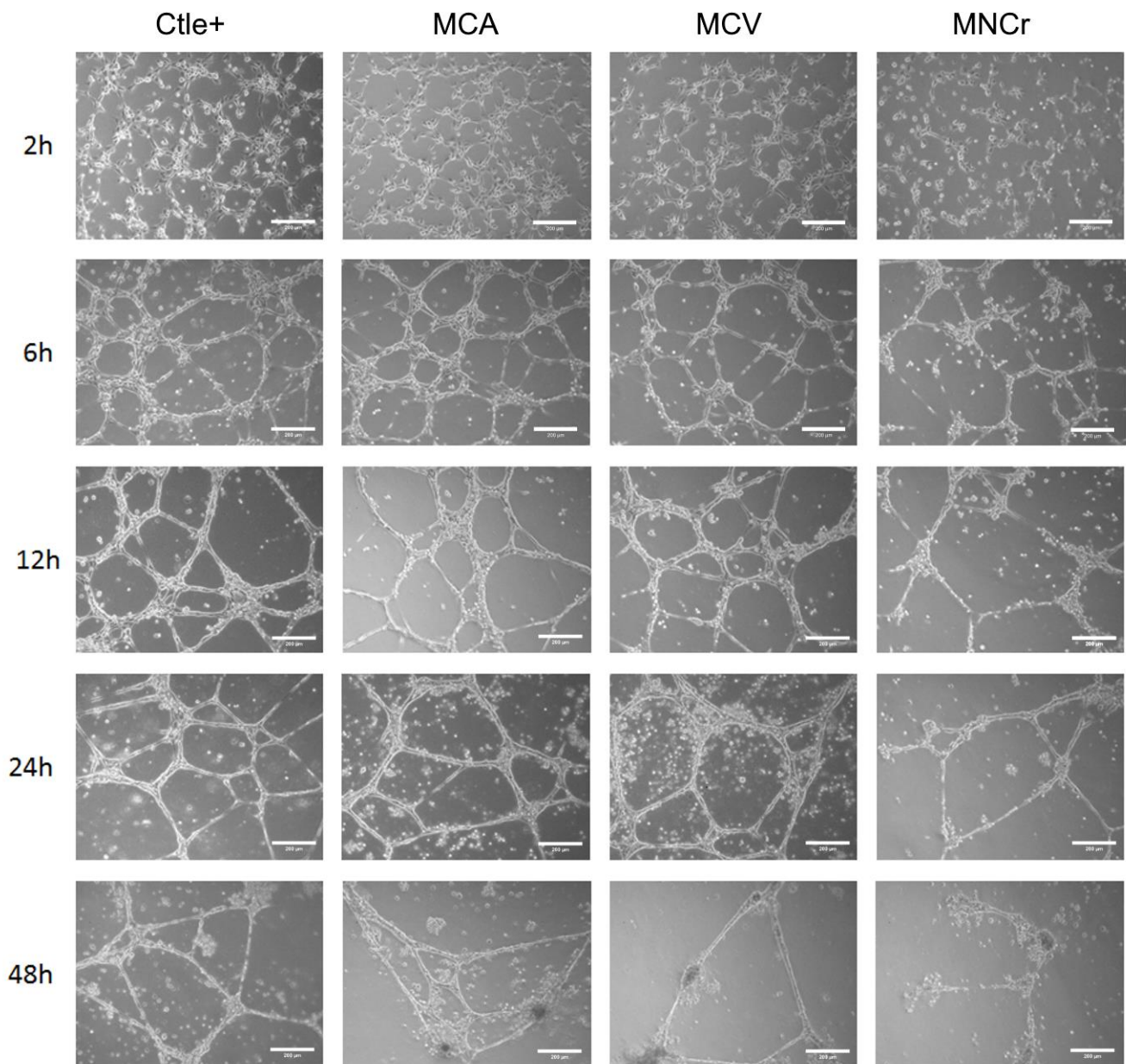
### Análise IPA® - NETWORKS - MCV

ID	Molecules in Network - MCV	Score	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
1	Actin,Akt,Alp,ANXA2,ANXA5,BCR (complex),CD3,COL3A1, COL6A1,COL6A2,COL6A3,Collagen Alpha1,Cyclin A,EEF2,EPO, ERK1/2,estrogen receptor,FBN1,FLNA,FN1,GPI,HSP90AB1,Igm, MAN1A1 ,MAP2K1/2, MMP3,MSN,P38 MAPK,p85 (pik3r), POSTN,Rac,SERPINE1,TF,TIMP1,VIM	35	21	Connective Tissue Disorders, Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance
2	ACTN1,EEF1A1,ENO1,FSH,GAPDH,GSTP1,Histone h3,Histone h4, HNRNPK,Hsp70,Hsp90,HSPA8,IFN Beta,IFNG,IgG,IL12 (family), Immunoglobulin,Jnk,LDHA,Lh,MHC Class I (complex),N- cor,PDIA3, PGK1, PKM,PLS3,PNP,PRDX6,RNA polymerase II,STAT5a/b, TCF,TCR, THBS1,TUBB,YWHAZ	28	18	Cellular Movement, Hematological Disease, Immunological Disease

3	AGTR1,Akt,ALDOA,ANPEP,CCDC88A,CCND1,CLIC1,CTNNB1, EIF4A1,F11,Fascin,HIF1A,HNF1A,HSD17B2,IPO5,KPNB1,LANC L2,LDHB,NAA10,NEUROG1,PAPPA,PLA1A,PXDN,RPRD1B,RP TOR,SERPINF1,SERPING1,SPARC,TGFB1,TGFBI,TKT,TOB2,T SPAN7,VENTX,ZMIZ2	22	15	Cancer, Cell Cycle, Organismal Injury and Abnormalities
4	ACTB,ANXA1,BGN,C1q,C1R,C1S,Cdk,Cg,COL1A1,Creb,CXCL8, DCN,ERK,Fibrinogen,Focal adhesion kinase,Gsk3,HDL, Hsp27, HSP90B1,HSPA5,IKK (complex),IL6,LIF,Mapk,Mek, MMP2,NFkB (complex),PDGF BB,PI3K (complex),PI3K (family),Pkc(s),Ras, Rock,TNC,Vegf	20	14	Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities
5	Ap1,C3,CCL2,CLEC11A,Cpla2,CXCL1,ECM1,Eotaxin,Fcer1,Fcgr 3,Gm-csf,HLA-DQ,HLA-DR,HSPG2, Iga,Ikb,IL1,IL23,IL12 (complex),IL17A, IL1B, INHBA,LDL,lymphotoxin-alpha1-beta2, MHC Class II (complex), MMP1, Nr1h, PLOD2, PTX3, SAA, SCAVENGER receptor CLASS A,Sod,Tlr,TNF,Tnf receptor	18	13	Cardiovascular System Development and Function, Cellular Development, Organismal Development
6	ABCB4,ADIPOR1,APH1B,APOA1,BLZF1,caspase,CD44,CLTC,D SE,FAM3C,GAK,hemoglobin,HGF,IGFBP7,IL6,LAMA4,LAMB1,L AMC1,MAPK1,miR-17-3p (and other miRNAs w/seedCUGCA GU),P4HB, PLOD1,PLTP,PRDX1, PSEN1, RELA, SLC52A1, TAGLN2,TMEM97,TMEM9B,TP53,UCHL1,VASN,YES1,YWHAG	18	13	Cell Morphology, Cell Death and Survival, Tissue Development
7	ARID1A,BRD7,CDKN1A,COL5A2,CTSH,EFEMP1,ENPP2,FBP1, FSTL1,HSF1,IGFBP7,LGALS3,LGALS3BP,LUM,MAPK13,MCRS 1,MECOM,MMP25,P-TEFb,PBRM1,PCOLCE,PDLIM2, PRAME, PSAP,QSOX1, SERPINE2, SERPINH1,SLC40A1,SLC43A3, SMARCA4,SPHK2,SPOCD1,SRPX,SWI-SNF,TAGLN	14	11	Embryonic Development, Organismal Development, Cell Morphology
8	NUPR1,UAP1	2	1	Carbohydrate Metabolism, Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry
9	B4GALT1,UXT	2	1	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Immunological Disease
10	AP2A1,TALDO1,ZNF143	2	1	Hereditary Disorder, Metabolic Disease, Carbohydrate Metabolism



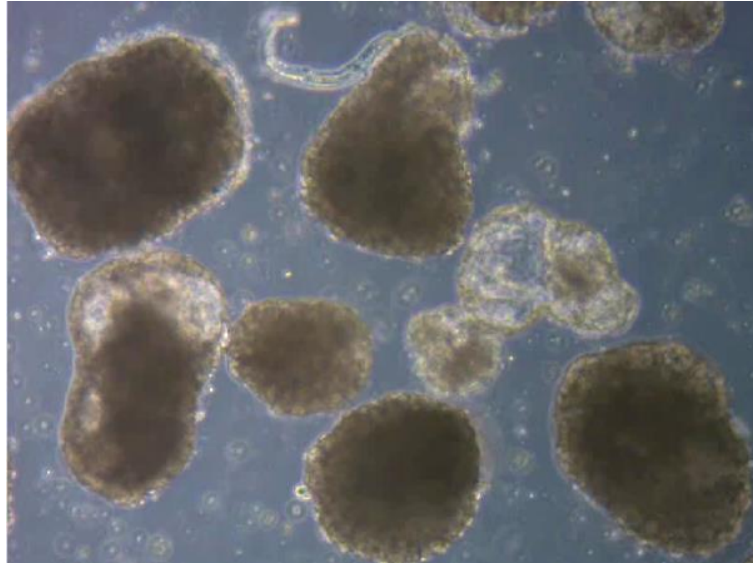
## APÊNDICE 5 – IMAGENS DO ENSAIO DE FORMAÇÃO DE VASOS *IN VITRO* COM MCA E MCV



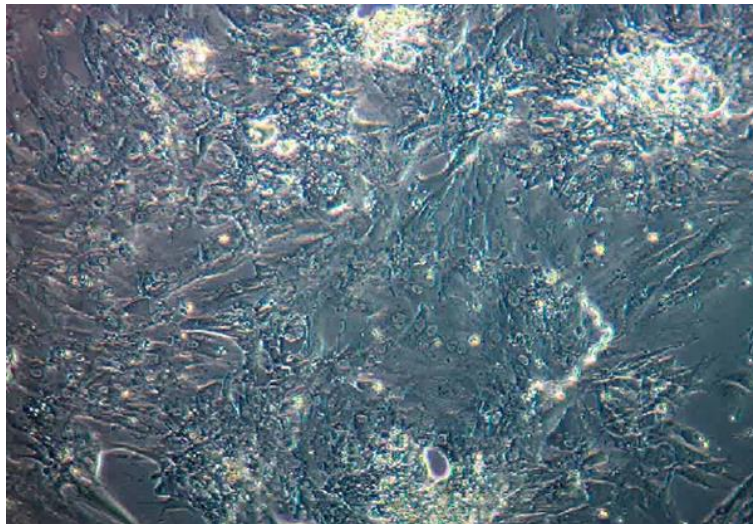
Ensaio de formação vasos *in vitro*. As HUVECs foram cultivadas durante 2, 6, 12, 24 e 48 horas com os MCs ou MNC, em uma camada de Matrigel, para determinar sua capacidade de formar estruturas de similares a vasos. Nas linhas estão indicados os tempos e nas colunas estão indicados os tratamentos. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

## APÊNDICE 6 – VÍDEOS OBTIDOS AO FINAL DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CTEs

Vídeo 1: Corpos embrióides contraindo no dia 15 da diferenciação.



Vídeo 2: Cardiomiócitos contraindo em monocamada após o processo de dissociação dos CEs com 15 dias de diferenciação cardiomiogênica.



**APÊNDICE 7 – TABELA COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES  
TESTADOS NA qPCR**

<b>Nome do gene</b>	<b>Dia 0</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 9</b>	<b>Dia 15</b>
Nanog	752	443	26	3	0
Oct4	11.248	12.245	5.194	134	26
REX1	5.484	5.320	2.794	659	463
FOXA2	101	252	1.300	177	110
AFP	52	373	654	12.631	73.804
Brach (T)	11	26	1.521	7	0
EOMES	160	697	2.759	11	10
PAX6	71	41	43	35	162
GATA4	182	496	2.892	5.521	9.621
NKX2.5	2	3	75	3.835	8.855
Tnlc	34	58	148	32.546	54.645
TnTc	289	150	91	49.776	108.213

Tabela com dados de sequenciamento dos genes analisados por qPCR. Os valores representam a média do número de *reads* de cada gene, em cada um dos tempos analisados.

**APÊNDICE 8 – TABELA COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO DAS PROTEÍNAS  
ESCOLHIDAS PARA O ARRANJO DE ANTICORPOS**

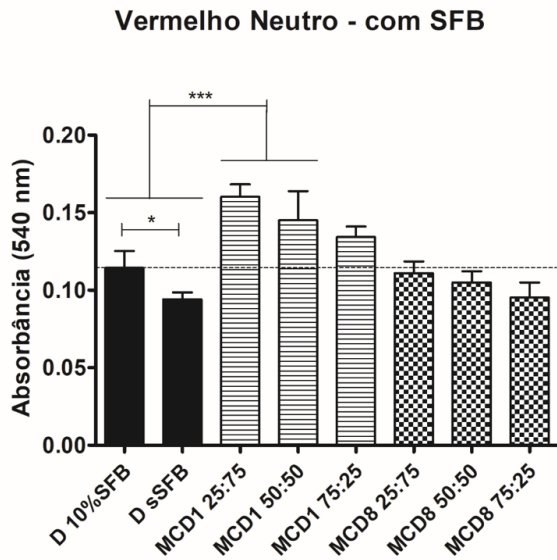
Gene/proteína	Dia 1		Dia 4		Dia 9		Dia 15	
	nº reads	log2 RPKM	nº reads	log2 RPKM	nº reads	log2 RPKM	nº reads	log2 RPKM
AFP	373	-0,73	654	-0,01	12631	4,70	73804	6,71
ANGPT1	55	-6,79	80	-6,29	1248	-1,93	3244	-1,02
TNFSF13 ou APRIL	63	-0,37	41	-1,01	36	-0,77	25	-1,82
BGN	226	-0,68	1209	1,75	385	0,44	956	1,13
BMP4	320	0,54	3737	4,03	760	2,20	2235	3,02
BMP5	69	-5,45	691	-2,17	3696	0,67	11700	1,65
BMP7	622	-1,96	725	-1,76	3640	1,00	7091	1,49
GDF2 ou BMP9	0	-	1	-7,27	413	2,51	506	2,29
CTF1	48	-1,85	96	-0,83	153	0,20	284	0,61
TNFSF8 ou CD30ligand	0	-	1	-9,57	135	-2,36	20	-5,59
CXCL14	74	-1,53	119	-0,93	257	0,71	1156	2,14
CXCL16	163	0,05	26	-2,58	44	-1,49	255	0,62
DCN	26	-5,32	29	-5,14	89	-3,23	8309	2,47
DKK1	293	1,66	1985	4,43	574	3,03	694	2,55
EGF	273	-3,17	153	-4,03	305	-2,61	602	-2,13
CXCL5 ou ENA78	1900	4,62	307	1,99	28	-1,00	3	-4,65
EPO	30	-1,27	41	-0,82	78	0,51	45	-0,75
FGF10	78	-4,75	159	-3,80	979	-0,68	618	-1,74
FGF12	232	-6,06	626	-4,61	118	-6,60	34	-8,94
FGF17	42	-1,92	593	1,95	6	-4,25	6	-4,73
FGF18	18	-5,68	57	-4,04	209	-1,78	670	-0,46
FGF19	52	-1,60	149	-0,12	10	-3,51	6	-4,95
FGF23	14	-4,35	21	-3,75	50	-2,12	644	0,85
FGF4	120	0,16	516	2,21	4	-4,30	2	-5,67
FGF7	4	-8,65	4	-8,81	49	-4,65	317	-2,58
FGF9	0	-11,29	3	-8,29	14	-5,40	212	-2,18
FN1	13231	2,84	29997	3,99	15817	3,49	24503	3,68
FZD1	58	-1,56	467	1,43	606	2,24	989	2,38
GDF15	364	0,02	301	-0,26	200	-0,46	1598	2,21
GDF3	482	1,70	192	0,30	46	-1,26	6	-4,65
CXCL1 ou GRO	59	0,36	6	-2,91	1	-4,80	1	-6,66
HBEGF	113	-1,60	39	-3,14	121	-1,10	437	0,33
HGF	14	-6,94	50	-5,17	15	-6,39	142	-4,13
IGFBP1	1	-6,55	0	-	6	-3,92	136	-0,01
IGFBP3	796	1,75	331	0,43	3232	4,17	7963	4,81
IGFBP5	98	-2,56	471	-0,29	2208	2,33	10216	3,91
IGFBP6	1127	3,21	744	2,62	144	0,61	386	1,38
IGFBP7	301	-2,71	67	-4,88	1805	0,26	4446	1,14
IGF2	109	-2,21	2938	2,46	5544	3,81	37062	5,89
IL6	31	-2,27	56	-1,48	6	-4,26	2	-6,09

LUM	4	-5,93	5	-5,43	279	0,65	4252	3,80
MMP19	177	-0,07	41	-2,23	46	-1,65	5	-5,48
MMP2	1003	-1,52	9774	1,74	2225	0,01	5648	0,81
MMP24	2718	1,14	438	-1,55	85	-3,50	71	-4,14
MMP25	522	0,59	270	-0,35	20	-3,68	10	-5,15
PDGFB	364	-0,53	123	-2,11	372	-0,13	1261	1,19
CXCL12 ou SDF1	4145	3,37	2486	2,59	1076	1,83	1759	1,83
TGFA	157	-4,07	381	-2,79	34	-5,84	68	-5,30
TGFB1	1021	-0,34	1161	-0,15	1530	0,60	5516	2,11
TGFB2	13	-7,56	22	-6,79	1852	0,02	3335	0,32
TIMP4	359	1,21	47	-1,80	22	-2,46	2	-6,47
TNF	0	-	0	-	0	-	0	-
TNFSF10 ou TRAIL	38	-3,55	12	-5,28	26	-3,61	90	-2,47
VASN	134	-1,11	759	1,41	238	0,10	672	1,15
VEGFA	1494	1,90	3562	3,17	4356	3,83	13499	5,06
TNFSF15 ou VEGI	19	-4,82	9	-5,94	14	-4,84	97	-2,58
VEGF	1872	4,61	85	0,11	86	0,54	19	-1,95
VWF	45	-6,57	459	-3,19	136	-4,52	36	-7,07

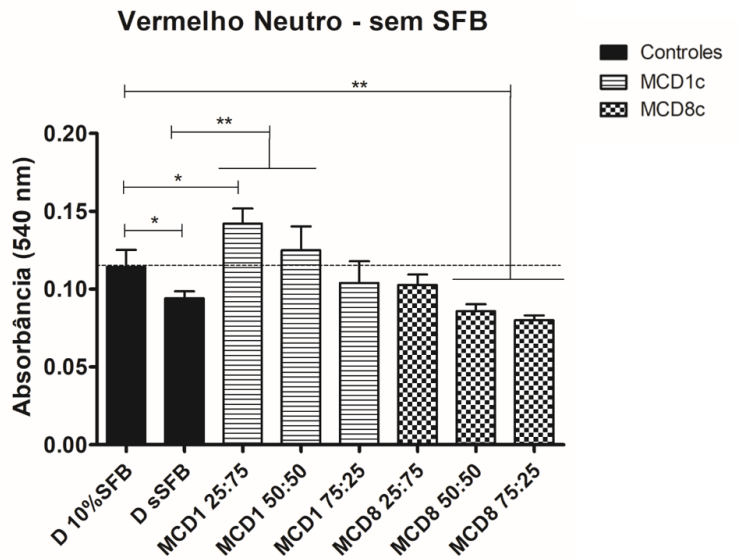
Informações referentes aos resultados de sequenciamento de proteínas secretadas escolhidas para o arranjo de anticorpos. Nº de reads = média da quantidade de leituras (reads) de cada gene. Log2RPKM = log2 de RPKM (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*).

## APÊNDICE 9 – PADRONIZAÇÃO DA DILUIÇÃO DOS MCS

A

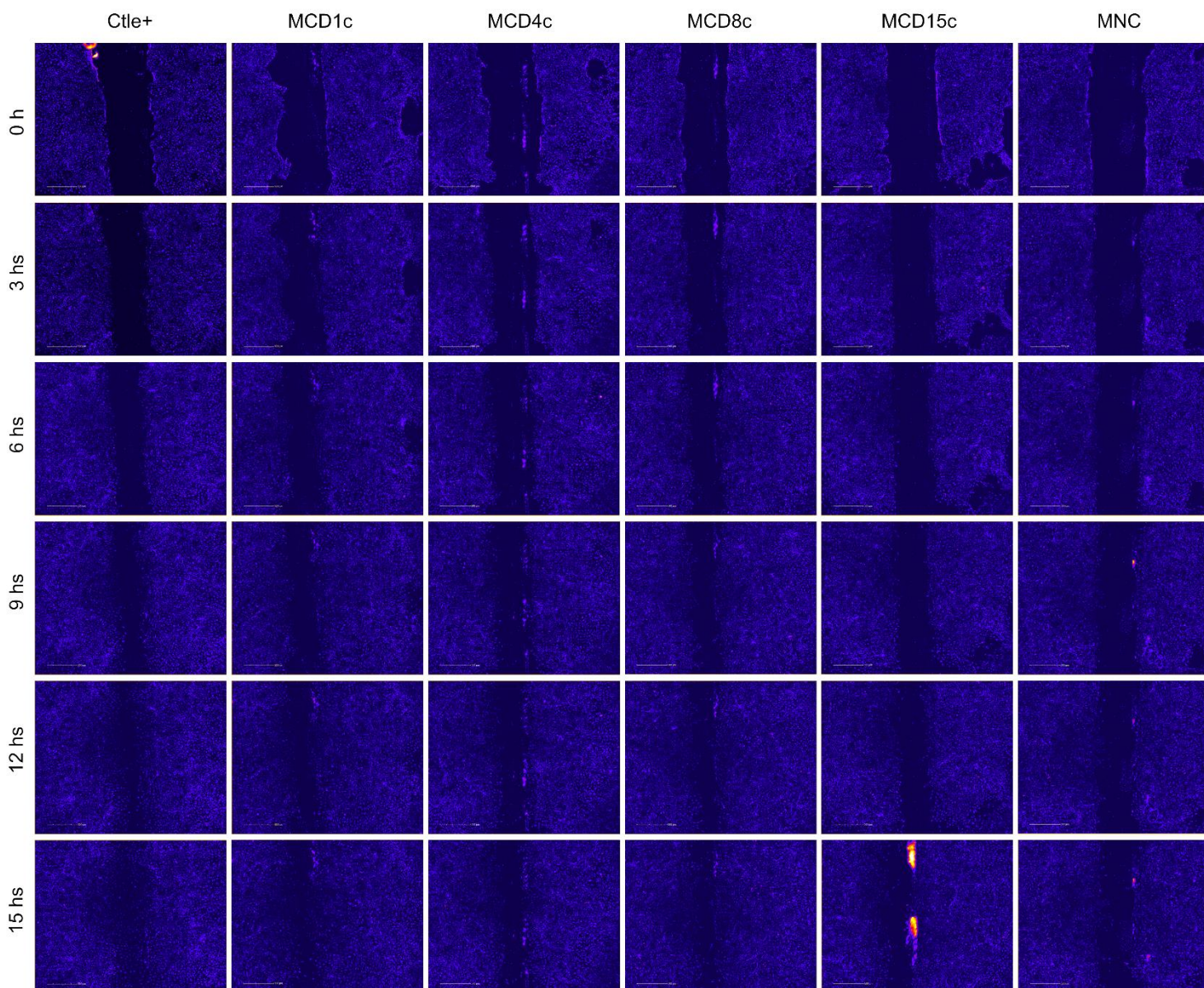


B



Padronização da proporção de meio condicionado a ser utilizado nos ensaios funcionais. Os gráficos mostram os níveis de absorbância do vermelho neutro, indicando a viabilidade celular relativa dos cultivos. As proporções testadas estão dispostas nos gráficos de forma que a proporção do DMEM é indicada antes da do MC (%DMEM: %MC). A) Média da absorbância dos cultivos com proporções de MC e DMEM com 5% de SFB. B) Média da absorbância dos cultivos com proporções de MC e DMEM sem SFB.

## APÊNDICE 10 – IMAGENS DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO (*WOUND HEALING*)



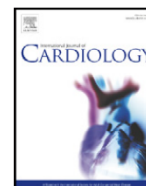
Imagens representativas das células HUVEC durante o ensaio de migração. As linhas indicam os tempos de cultivo e as colunas os tratamentos. Barra de escala: 500  $\mu\text{m}$ .



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijcard](http://www.elsevier.com/locate/ijcard)



## Secretome from resident cardiac stromal cells stimulates proliferation, cardiomyogenesis and angiogenesis of progenitor cells



Thamile Luciane Reus <sup>a,1</sup>, Anny Waloski Robert <sup>a,1</sup>, Marise Brenner Affonso Da Costa <sup>b</sup>,  
Alessandra Melo de Aguiar <sup>a,\*</sup>, Marco Augusto Stimamiglio <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Parana, Curitiba, 81350-010, Brazil

<sup>b</sup> Bank of Valve Homografts, Santa Casa Hospital, Curitiba, 80215-901, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 March 2016

Received in revised form 9 June 2016

Accepted 25 June 2016

Available online 30 June 2016

#### Keywords:

Secretome

Cardiac resident stromal cells

Stem cells

Angiogenesis

Conditioned medium

Extracellular matrix

### ABSTRACT

In the heart, tissue-derived signals play a central role on recruiting/activating stem cell sources to induce cardiac lineage specification for maintenance of tissue homeostasis and repair. Cardiac resident stromal cells (CRSCs) may play a pivotal role in cardiac repair throughout their secretome. Here, we performed the characterization of CRSCs and their secretome by analyzing the composition of their culture-derived extracellular matrix (ECM) and conditioned medium (CM) and by investigating their potential effect on adipose-derived stem cell (ADSC) and progenitor cell behavior. We confirmed that CRSCs are a heterogeneous cell population whose secretome is composed by proteins related to cellular growth, immune response and cardiovascular development and function. We also observed that CRSC secretome was unable to change the behavior of ADSCs, except for proliferation. Additionally, CM from CRSCs demonstrated the potential to drive proliferation and cardiac differentiation of H9c2 cells and also the ability to induce angiogenesis *in vitro*. Our data suggest that the CRSCs can be a source of important modulating signals for cardiac progenitor cell recruitment/activation.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

It is well known that cells in a tissue have their behavior controlled by a highly specialized signaling milieu. Considering stem cells, the different tissue-specific niches provide critical paracrine signals, cell–cell and cell–ECM contacts that regulate their fate decisions [1]. Thus, developing culture-based assays trying to mimic many of the microenvironmental signals may be a good strategy to study stem cell behavior and provide new insights to develop stem cell-based approaches for tissue regeneration.

In the heart, tissue renewal mechanisms remain inconclusive. Some experimental evidences suggest the participation of cardiomyocyte dedifferentiation/proliferation and stem/progenitor cell differentiation [2, 3]. Anyhow, in all cases, tissue-derived signals play a pivotal role in the recruitment/activation of these cell sources to induce cardiac repair mechanisms for the maintenance of tissue homeostasis. However, the inherent capacity of the human heart to restore major damages and cells lost during a heart infarction is insufficient [4]. Thus, the

identification of ways to activate these cell sources is vital to improve heart regeneration after damage.

To shed light on this complex cell signaling network, we have isolated human CRSCs from ventricle and auricle tissues, and cultured them in order to study their secreted ECM and paracrine signals. In a previous study, we isolated and characterized the CRSCs and found out that plastic adherent cell population that migrates from tissue explants is heterogeneous and owns characteristics and differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSCs) [5]. We have now confirmed that this cell population is actually a heterogeneous population composed at least by MSCs and cardiac fibroblasts. Considering the CRSCs as potential cardiac niche supporting cells, we obtained the secreted ECM and the culture CM from them to mimic tissue-derived signals. Here, we report the characterization of CRSC secretome and demonstrate its potential to drive proliferation, cardiomyogenesis and angiogenesis on progenitor cells.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Isolation and cell culture from human heart explant

Human cardiac tissue fragments were obtained from the right auricle and ventricle of cadaveric donors. This study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation ethics committee (approval number 419/07). The protocol for isolation and culture of CRSCs from auricle and ventricle was previously described by our group [5]. The isolated cells were immunophenotypically characterized by flow cytometry. Data acquisition and analysis

\* Corresponding authors at: Carlos Chagas Institute, R Prof Algacyr Munhoz Mader, 3775, FIOCRUZ, Curitiba, PR, 81350-010, Brazil.

E-mail addresses: [thamilelreus@gmail.com](mailto:thamilelreus@gmail.com) (T.L. Reus), [nany.robert@gmail.com](mailto:nany.robert@gmail.com) (A.W. Robert), [mcosta13@icloud.com](mailto:mcosta13@icloud.com) (M.B.A. Da Costa), [alessandra\\_aguiar@fiocruz.br](mailto:alessandra_aguiar@fiocruz.br) (A.M. de Aguiar), [mstimamiglio@fiocruz.br](mailto:mstimamiglio@fiocruz.br) (M.A. Stimamiglio).

<sup>1</sup> T.L.R. and A.W.R. contributed equally to this work.



were performed as previously described [5]. Briefly,  $2 \times 10^5$  CRSCs from passages 4 to 8 were labeled with antibodies against the following human proteins: CD90, CD105, CD73, CD11b, CD45, CD19, HLA-DR, CD31, CD117 (eBioscience, San Diego CA, USA), CD140b, CD146, CD56 (BD Biosciences, San Jose CA, USA), CD34, SCA-1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), ALPL (R&D Systems, Minneapolis MN, USA) and DDR-2 (Abcam, Cambridge, UK). Mouse isotype IgG1 antibodies for each fluorochrome were used as controls (BD Biosciences). About 10,000 labeled cells were acquired with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software version 10.0.8r1 (<http://www.flowjo.com/>).

## 2.2. Preparation of conditioned media

To obtain the CM of cells derived from human cardiac auricle (aCM) and ventricle (vCM), the cells were plated in culture flasks coated with type 1A collagen film (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) as previously described [5] and maintained for 5 days. When monolayers reached 70–80% confluence, the medium and cells were washed twice with PBS. Then 14 ml of culture medium (Dulbecco's MegaCell® supplemented with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% non-essential amino acid solution, 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin) was added to each bottle. After approximately 16 h (overnight), this medium was collected and centrifuged twice (first centrifugation: 1620 g for 5 min; second one: 4000 g for 20 min) to remove cell/debris and apoptotic bodies [6]. The collected medium was then stored at 4 °C until the end of process. This procedure was performed for 3 consecutive days and the final volume of CM was then stored in  $-80$  °C for further experiments. As a control for the experiments, fresh culture medium (non conditioned medium, nCM) was also aliquoted and kept at  $-80$  °C. All CMs were quantified by a Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA).

## 2.3. Cytometric Bead Array of CMs

The CMs (aCM and vCM), as well as nCM were analyzed by Cytometric Bead Array (CBA), using the Human Inflammatory Cytokine Kit (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions. Briefly, the samples were incubated with the beads at room temperature for 3 h. Then, they were washed and recovered in the kit buffer before acquisition in a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). Data analysis was carried out on the FCAP Array v3.0 (Soft Flow Inc., St. Louis Park MN, USA).

## 2.4. Antibody array analysis of CMs

For identification of extra signaling factors released from cardiac cells, we used a custom label-based growth factor and cytokine antibody array (Raybiotech, Norcross GA, USA) according to the manufacturer's protocol. For the detection of fluorescent spots, arrays were exposed to x-ray film. The scanned film was analyzed using the NIH ImageJ software v. 1.45s (<http://imagej.nih.gov/ij/>) to obtain raw intensity values for each spot. The normalized intensity of each spot was determined using the Raybio Analysis Tool (Raybiotech).

## 2.5. Mass spectrometry analysis of CMs

Twenty micrograms of protein from each sample (including nCM) was separated using 10% SDS-PAGE followed by in-gel tryptic digestion. Five micrograms of peptides was analyzed in triplicate by LC-MS/MS in a Thermo Scientific Easy-nLC 1000 system coupled to a LTQ Orbitrap XL ETD (Mass Spectrometry Facility RPT02H/Carlos Chagas Institute – Fiocruz Paraná). Peaklist picking, protein identification, quantification and validation were performed on the MaxQuant platform (version 1.5.0.25) which includes the Andromeda algorithm [7] for database searching. For MS analysis, a minimum of 2 unique peptides per protein were required and the proteins identified in nCM were excluded from aCM and vCM data. Bioinformatic analysis was performed by using the functional enrichment analysis tool FunRich [8] and Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software, data version 26127183 (Qiagen, Valencia CA, USA).

## 2.6. Monolayer decellularization

To isolate the ECM secreted by CRSCs derived from cardiac auricle (aECM) and ventricle (vECM), the cells were cultured in monolayer for 7 days until reached 90–100% of confluence. Then, CRSC cultures were submitted to decellularization protocol adapted from previous studies [9–11]. Briefly, monolayers were washed with PBS (5 times), followed by incubation with 0.5% Triton X-100 and 20 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  in PBS for 10 min under constant stirring. After new PBS washes, the plates were treated with DNase I type IV (Sigma-Aldrich) for 1 h (30 min under stirring at RT and 30 min at 37 °C) followed by PBS washes. Confirmation of decellularization followed the criteria described previously [12]. Decellularized ECMs (dECM) were stained with 4',6'-diamidino-2'-phenylindole (DAPI) to confirm the absence of nuclei. Moreover, DNA extraction was made using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Finally, in order to characterize the ECM proteins present in decellularized or non-decellularized (control) samples, immunofluorescence assays were performed.

## 2.7. Cell cultures

Human ADSCs (Lonza®, Walkersville MD, USA; catalog number PT-5006) and also the myoblast cell line H9c2 (ATCC®, Manassas VA, USA; CRL-1446™) were maintained in

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine (Gibco™, Thermo Fisher Scientific), 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). The umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured following the manufacturer's instructions (Lonza®; catalog number C2519A) in EBM-2 complete medium supplemented with 2% FBS, human fibroblast growth factor-b (hFGF-b), human epidermal growth factor (hEGF), human vascular endothelial cell growth factor (hVEGF), long R insulin-like growth factor-1 (R3-IGF-1), ascorbic acid, hydrocortisone and heparin. Cell cultures were maintained in a humidified atmosphere, at 37 °C with 5%  $\text{CO}_2$ .

## 2.8. Neutral red uptake and cell death assays

To evaluate whether culturing ADSCs with CM would be toxic to cells, we performed two different assays. We conducted a neutral red uptake assay adapted from a previously described protocol [13] after 3 days of culture. We also evaluated cell death (after 7 days of culture) with Annexin V and 7-aminoactinomycin (7-AAD) flow cytometry assay (BD Biosciences), following the manufacturer's instructions.

## 2.9. Adhesion and proliferation assays

In order to assess whether aECM or vECM could lead to changes in adhesion capacity of ADSCs, cells were plated on 24-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and kept for 10, 20 and 30 min at 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . Control conditions were evaluated by coating wells with type 1A collagen (Sigma-Aldrich). Then, the cells were subjected to agitation (100 rpm) and nonadherent cells were removed. Finally, the remaining cells were fixed with paraformaldehyde 4% followed by DAPI staining. In order to quantify the number of adhered cells, 5 pictures of each well were recorded using the microscope LEICA D Fluorescence and the number of nuclei was analyzed by NIH ImageJ software v. 1.45s.

The proliferation of ADSCs or H9c2 cells was evaluated by Ki67 staining (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) after 3 and 7 days of culture. Quantitative analysis was performed by an Operetta HTS imaging system (PerkinElmer, Waltham MA, USA) at  $10 \times$  magnification with 9 fields of view. Images were then analyzed with Harmony 3.5.2 software (PerkinElmer). A Click-iT® Edu Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) was performed to confirm proliferation data related to ADSCs. Briefly, ADSCs were cultured in 6 well-plates ( $5 \times 10^5$  cells/well) and  $10 \mu\text{M}$  EdU was added on each condition for 24 h and detected according to manufacturer protocol.

## 2.10. Scratch-wound assay

The ability of CMs in inducing the migration of ADSCs was measured by a scratch and wound assay [14]. In brief, after ADSC cultures reached 100% confluence in 6-well plates, we performed a "scratch" on the monolayer. The progress of the migration was photographed immediately after the scratch (time 0) and after 12 h. For each condition, 5 photos were taken with microscope Nikon Eclipse E600. The efficient migration was then assessed by manual cell count between scratched area of time 0 and after 12 h of culture.

## 2.11. Differentiation potential of ADSCs, H9c2 and HUVECs cultured with dECMs and CMs

To evaluate the potential of dECMs and CMs to induce ADSCs to a cardiomyogenic phenotype, cells were seeded into 24-well plates ( $0.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and cultured for 7 days with the addition of aCM, vCM or nCM at 50% of total amount of medium, with/without dECMs. Cardiac differentiation was then evaluated by immunostaining with cardiac troponin I (cTnI) and GATA-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

We also carried out the assay described above with H9c2 cells, treating the cultures with CMs at 100% of total amount of medium and without dECMs. Cells were seeded into 24-well plates ( $1 \times 10^4$  cells/well) and maintained for 3 and 7 days with CMs or nCM, using DMEM 1% as a positive control for cellular differentiation. Cardiac differentiation was evaluated on cultures induced for 7 days by measuring the mean area ( $\mu\text{m}^2$ ) stained with cTnI (Santa Cruz Biotechnology) and cTnT (Thermo Scientific).

To evaluate the potential of CMs to generate tubule-like structures in vitro, we used HUVECs (Lonza). 24-well plates coated with Matrigel® Matrix Basement Membrane (Corning, NY, USA) were cultured with  $7 \times 10^4$  HUVECs/cm<sup>2</sup> for 48 h with/without CMs, based on the manufacturer's recommendations. Each well was photographed at 2, 6, 12, 24 and 48 h, in three randomly selected regions, and the number of meshes and nodes was quantified manually.

## 2.12. Immunocytochemistry

Cultured ADSCs or H9c2 were permeabilized by a 30-min incubation in 0.5% Triton X-100 in PBS and then blocked by a 60-min incubation with 1% PBS-BSA. After an overnight incubation with primary antibodies, the samples were incubated for 1 h at room temperature with an Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG antibody or Alexa 594-conjugated anti mouse IgG antibody (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) diluted to 1:800 in PBS-BSA. Nuclei were labeled with DAPI (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) for 10 min at room temperature. ADSC assays were analyzed on a Molecular Devices Micro High Content Imaging system, with 25 fields imaged per treatment. Data analysis was performed with the MetaXpress program (Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA). For H9c2 differentiation assay, plates were scanned with an Operetta HTS imaging system (PerkinElmer) at  $10 \times$  magnification with 9 fields of view. Images were then analyzed with Harmony 3.5.2 software (PerkinElmer).

### 2.13. Statistical analysis

The data were plotted and analyzed with Graphpad Prism statistical program version 5, using one-way ANOVA followed by Tukey's test or, in grouped analysis, two-way ANOVA followed by Bonferroni posttests. Differences with  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. Data were expressed in terms of mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

## 3. Results

### 3.1. The resident cardiac stromal cells consist in a heterogeneous cell population

The immunophenotypic characterization of CRSCs isolated from auricle and ventricle was performed for a set of surface markers associated with MSCs (CD90, CD105, CD73), hematopoietic cell lineages (CD34, CD11b, CD45, CD19, HLA-DR), endothelial cells (CD31), smooth muscle cells or pericytes (CD146, CD140b, ALPL), cardiac progenitor cells (CD117, CD56, SCA-1) and cardiac fibroblasts (DDR-2). CRSCs were positive for MSC markers and negative for hematopoietic markers in accordance with the criteria posted by Dominici and colleagues [15], except for CD90, which was expressed in lower rates (almost 60% for auricular cells and almost 30% for ventricular cells) (Fig. 1). Both populations revealed fewer CD146 and CD140b positive cells and were also negative for endothelial and cardiac progenitor cell markers. Immunostaining also showed DDR-2 positive cells, identifying 20% of cardiac fibroblasts on auricle derived CRSCs and 44.2% on ventricle derived CRSCs (Fig. 1).

### 3.2. Conditioned medium and extracellular matrix proteins obtained from resident cardiac stromal cells influence the behavior of adipose-derived stem cells

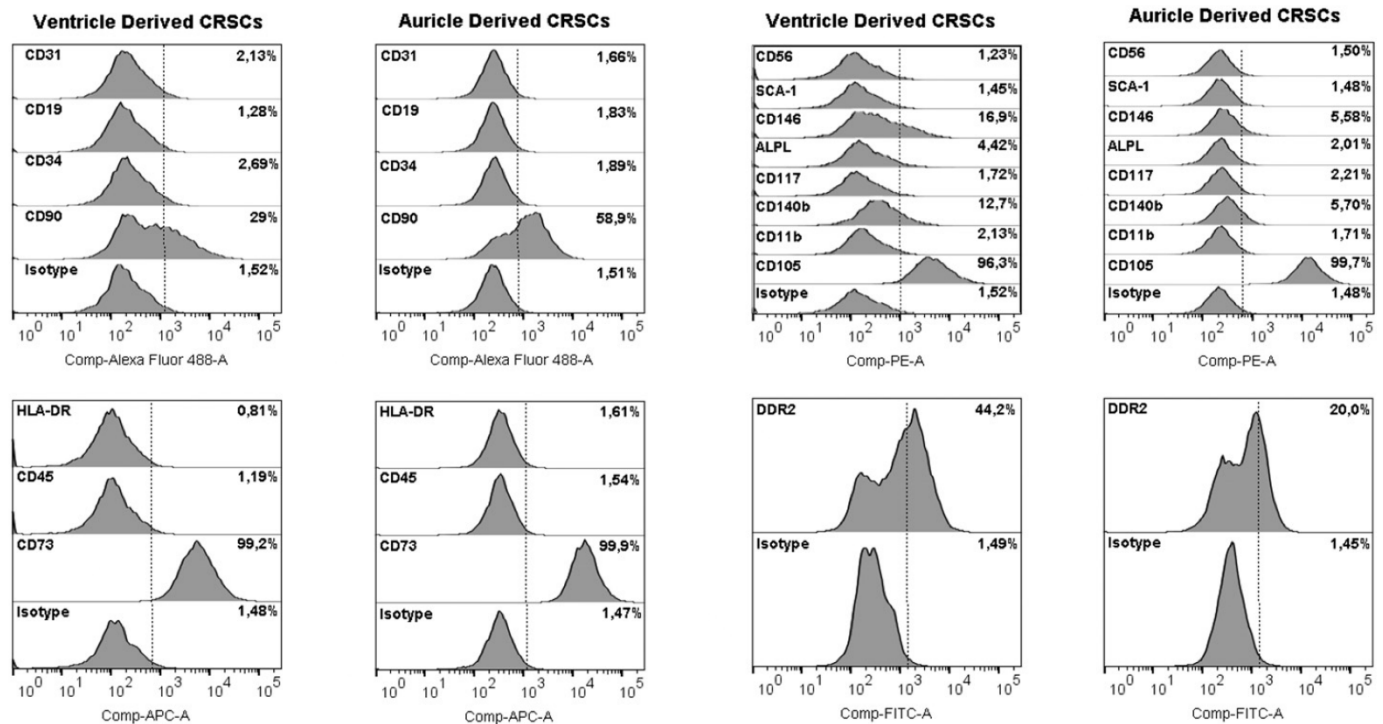
To investigate the possible influence of CRSC-derived ECM and CM on ADSC cultures, a monolayer decellularization protocol was employed and the CM of CRSC cultures was collected. Under these stimuli, we evaluated ADSC viability, migration, adhesion, growth and differentiation.

For CM stimuli conditions, a mixture of 50% CMs (and nCM) plus 50% of the normal medium (DMEM 10% FBS) was used. To assess whether ECMs and/or CMs could alter relative cell viability, we performed neutral red uptake assay to measure cell population viability in comparison with non-treated ADSCs, thus representing a good indicator of cytotoxicity. Cultured ADSCs did not have any alteration in cell viability after 72 h under ECMs or CM stimuli (Fig. 2A and Supplementary Fig. 1A). We also performed Annexin V/7-AAD assay after 7 days of culture, thus confirming no induction of necrosis and/or apoptosis on ADSCs (Fig. 2B and Supplementary Fig. 1B). Both results confirmed that neither ECMs nor CMs were cytotoxic to ADSCs.

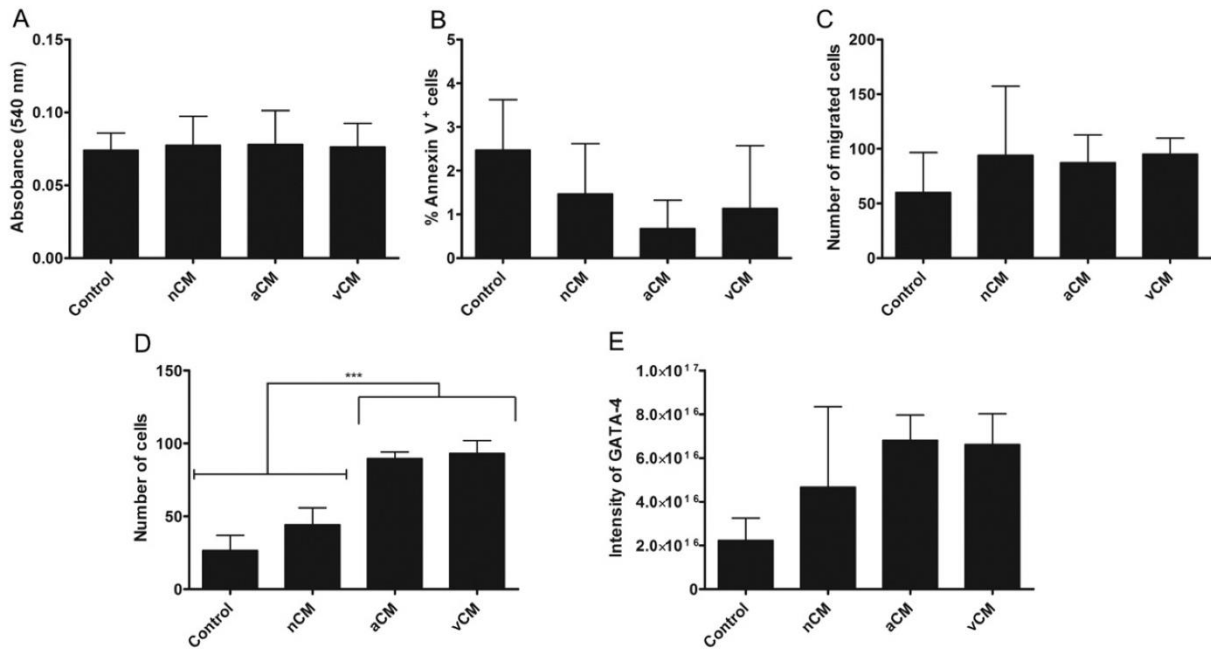
We also evaluated if ECMs and CMs could influence the migratory behavior of ADSCs on scratch and wound assays. We did not observe any statistically significant differences in the number of migrated cells within the groups after 12 h of culture (Fig. 2C and Supplementary Fig. 1C).

To measure the influence of ECMs on ADSC adhesion dynamics, we evaluated the number of adhered cells after 10, 20 and 30 min of culture. No adhesion advantages were observed on ADSCs cultured in the ECMs when compared to our control group (type I collagen) (Supplementary Fig. 1D).

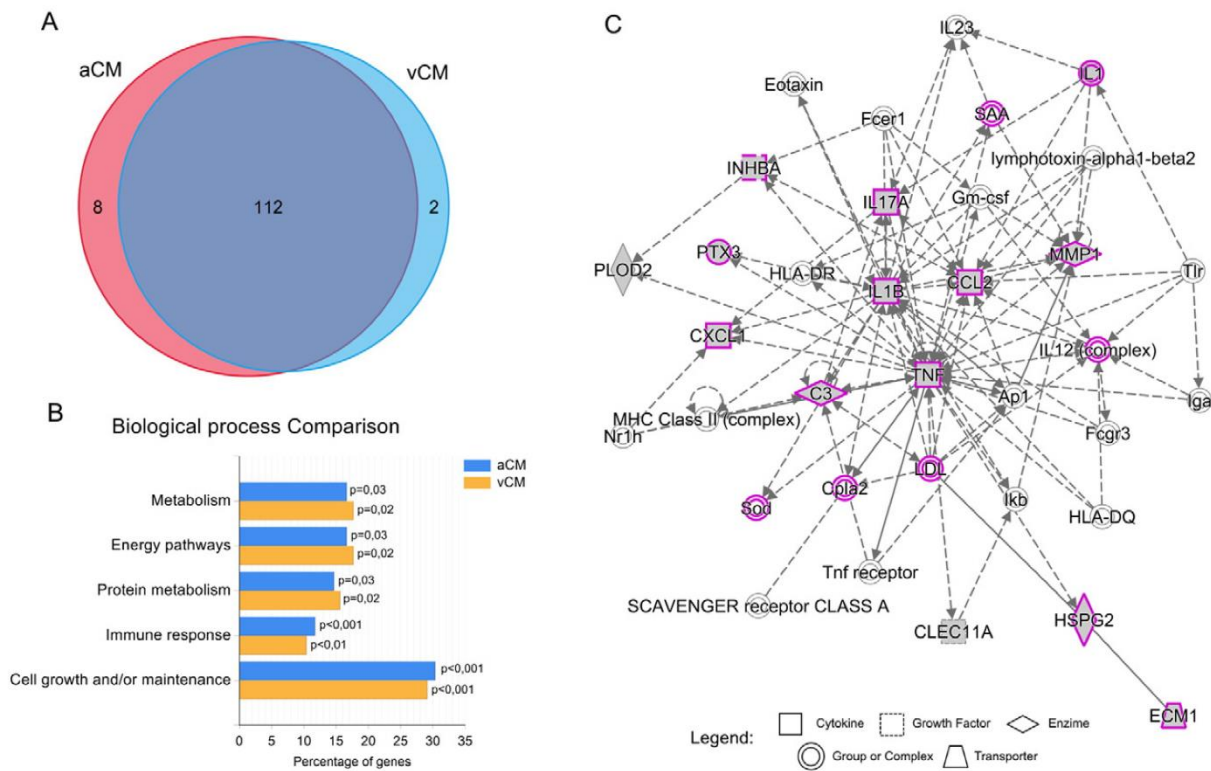
During experiment analysis we observed that the number of cells was higher in groups treated with CMs. So, in order to confirm this observation, we quantified the number of cells in all groups after 7 days of culture using a High-Content imaging system. Indeed, the results showed that the number of cells in the groups cultivated with CMs was significantly higher than in the other groups, suggesting that CMs promoted a higher proliferation rate of ADSCs (Fig. 2D and Supplementary Fig. 1E). We finally investigated if cardiac ECMs and/or CMs by themselves could induce ADSCs to a cardiac phenotype after 7 days of treatment, evaluating the presence of GATA-4 – an important cardiac marker. There was no statistically significant difference in GATA-4 stain intensity within control and experimental groups (Fig. 2E and Supplementary Fig. 1F), demonstrating that ECMs and CMs did not induce cardiac differentiation.



**Fig. 1.** Immunophenotypic characterization of CRSCs. Half offset histograms are shown for auricle derived CRSCs and ventricle derived CRSCs, as indicated. Both cell populations are positive for MSC markers, with lower expression of CD90, negative for hematopoietic, cardiac and endothelial markers. Immunostaining also showed a fraction of cardiac fibroblasts positive for DDR-2. Dotted line represents the gate for positive cell population based on isotype control histogram for each fluorochrome.



**Fig. 2.** Influence of CMs on ADSC behavior. (A) Cytotoxicity assay. Bar chart showing absorbance measuring of neutral red uptake by ADSCs cultured with cardiac CMs. (B) Apoptosis/necrosis assay. Bar chart showing the percentage of Annexin V positive ADSCs on the different culture conditions. (C) Scratch and wound healing assay. Bar chart showing the number of migrated ADSCs cultured with CM stimuli. (D) Analysis of cell proliferation. Bar chart showing the number of cell nuclei after 7 days of culture. The graph shows increased cell number during CM treatment. (E) Cardiac differentiation analysis. Bar chart showing the immunostaining intensity for GATA-4 on ADSCs cultured with cardiac CMs. All experimental data were acquired by three consecutive assays performed with three biological samples (\*\*\*) denotes  $p < 0.001$ ). nCM = non-conditioned medium; aCM = auricle derived conditioned medium; vCM = ventricle derived conditioned medium.



**Fig. 3.** A summary of the proteomic characterization of CRSC conditioned medium. (A) Venn diagram showing the number of proteins that are common between aCM and vCM. (B) Biological process comparison in aCM and vCM ( $p$ -value  $< 0.05$ ). (C) Top rated IPA network on vCM showing proteins related to cardiovascular system development, wherein almost all proteins are linked to angiogenesis process (stressed line boxes). aCM = auricle derived conditioned medium; vCM = ventricle derived conditioned medium.

3.3. Secretome profile of resident cardiac stromal cells

We evaluated CRSC secretome by analyzing secreted ECM proteins on monolayer cultures, before and after decellularization, and secreted proteins in the conditioned medium. The ECM composition was resolved by immunofluorescence, showing positive staining for types I, III and IV collagen, laminin, fibronectin, decorin, lumican and fibulin-2 (Supplementary Fig. 2).

For CM characterization, three different methods were used: CBA, antibody array and MS. CBA data identified 6 proteins related to inflammatory response in both CMs (IL-6, IL-8, IL1b, IL-17a, TNF e IFN- $\gamma$ ). The antibody array validated CBA results for IL-6 and IL-8, and settled a different composition between aCM and vCM. Common proteins identified were CXCL3, IL-6, IL-8, CCL2, MMP1 and DCN. EPO was exclusively found in vCM while CCL27 and IL-16 were found only in aCM. The MS analysis identified 110 proteins in aCM and 105 proteins in vCM (Supplementary Table 1).

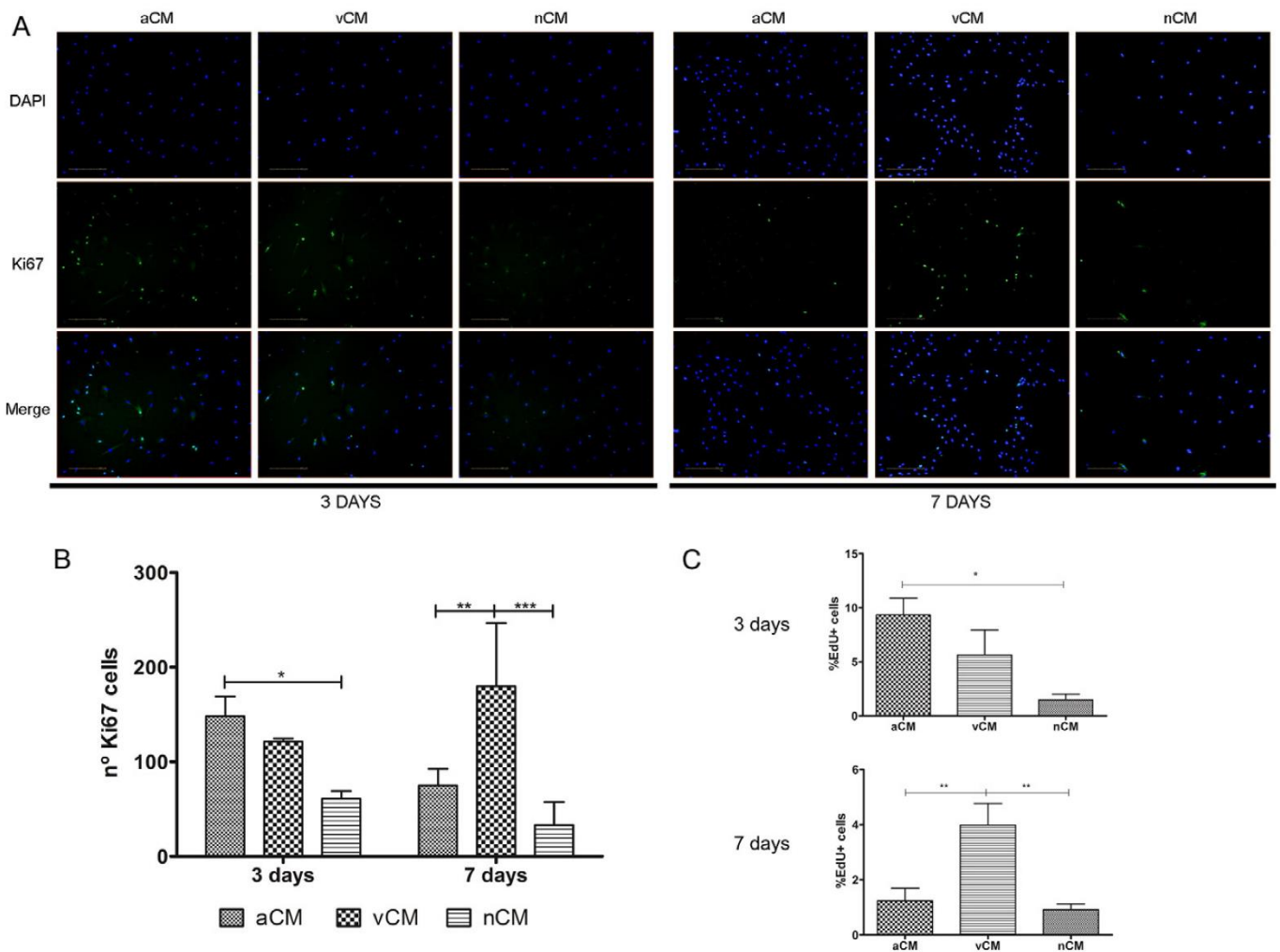
To proceed with analysis, we chose to combine the results obtained by the three complementary methods in a single table. We observed that both CMs had almost the same secretome profile, sharing 112 common proteins (Fig. 3A). However, some unique proteins were found, 8 in aCM (PACSIN1, CCT6A, COL12A1, STC2, TNFAIP6, LUM, CCL27 and IL16) and 2 in vCM (MMP3 and EPO). The biological processes assigned to CMs after GO analysis revealed cell growth and maintenance (around

30%) as the most rated functions, and also processes associated with metabolism and immune response (Fig. 3B).

The investigation of new related functions was done with Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Again, cellular growth and proliferation appeared as the highest score of representation in both CMs. A total of 70 proteins (p-value of  $3.94E - 23$ ) was assigned with this cellular function in aCM and 71 proteins (p-value of  $6.62E - 26$ ) in vCM. Within functions linked to physiological system development and activity, cardiovascular system development and function appeared as the most represented processes, in which vasculogenesis and angiogenesis were the most rated properties (Fig. 3C and Supplementary Table 2).

3.4. Conditioned medium derived from resident cardiac stromal cells promotes adipose derived stem cell proliferation

Based on our previous results (Figs. 2D and 3B), we decided to explore cell proliferation activity using Ki67 and EdU assays to confirm the influence of CMs. We repeated the previous experiments using ADSCs, yet without adding any serum. As shown in Fig. 4, CMs were able to induce cells to proliferate in a significant manner when compared to nCM. Analysis of Ki67- and EdU-positive cells showed that aCM had a higher proliferation rate than the nCM after 3 days of culture. Despite that, after 7 days, vCM showed the highest proliferation rates when compared to aCM or nCM. These results indicate that both aCM



**Fig. 4.** Influence of CMs (without serum addition) on proliferation of ADSCs when compared to nCM. ADSCs were cultured with aCM, vCM and nCM and the Ki67 positive cells or EdU positive cells were evaluated after 3 and 7 days. (A) Representative images of Ki67/DAPI staining after 3 and 7 days. (B) Ki67 positive cell number after treatments. (C) Percentage of EdU+ cells after 3 (top) and 7 (bottom) days of culture assessed by flow cytometry. n = 3. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001. aCM = auricle derived conditioned medium; vCM = ventricle derived conditioned medium; nCM = non-conditioned medium.

and vCM have critical molecules that promote maintenance and induction of cell proliferation of ADSCs.

### 3.5. Conditioned medium derived from resident cardiac stromal cells stimulates cardiomyogenic differentiation of H9c2 cells

IPA results linked cardiovascular development to CRSC secretome. Thus, we decided to test the potential of CMs to induce cardiomyogenic differentiation in the H9c2 myoblast cell lineage after 7 days. Based on cTnI and cTnT staining, both aCM and vCM were able to induce differentiation of H9c2 cells, while nCM led to negligible differentiation rate (Fig. 5A–C). We also assayed the proliferation potential of these cells since CRSC secretome was even linked to this process. As observed in Fig. 5D, staining with Ki67 showed that nCM led to the lowest levels of proliferation, for both 3 and 7 days. After 7 days of culture, nCM had approximately six times less proliferating cells than the other conditions tested. An interesting fact was that, while the control and CM conditions nearly doubled the number of nuclei from 3 to 7 days, the nCM decreased the total number of nuclei.

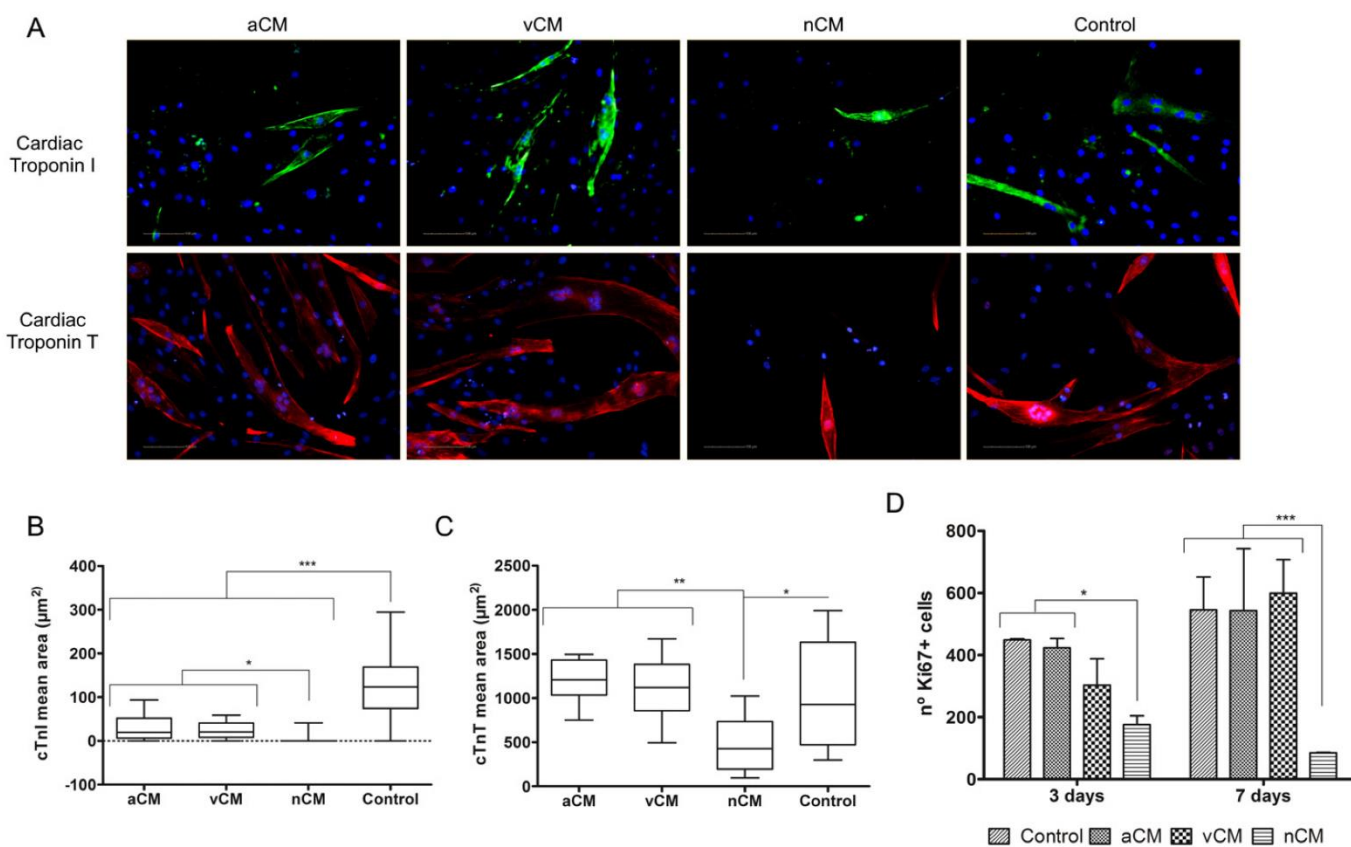
### 3.6. Conditioned medium derived from resident cardiac stromal cells stimulates angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells

After IPA identification of the potential vessel formation associated with CRSC secretome, we performed an in vitro assay with HUVEC to investigate this possibility. Endothelial capillary-like tubule formation assay showed that both CMs had the potential to stimulate the formation of capillary-like tubes in vitro (Fig. 6A). After 12 h of HUVEC culture on the Matrigel layer, the number of meshes and nodes on the branched

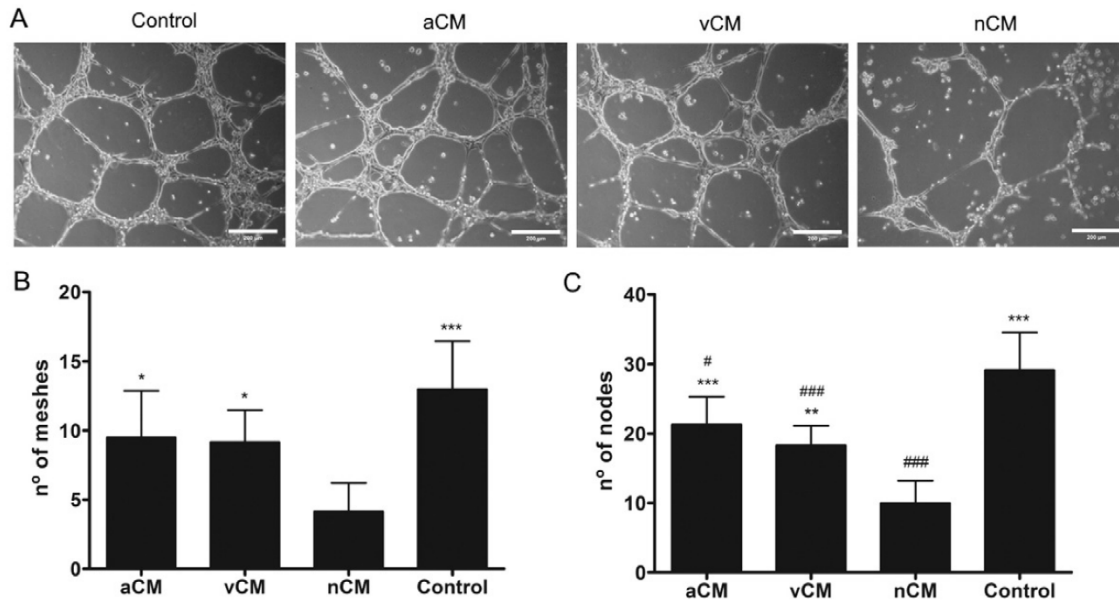
network of tubule-like structures for both aCM and vCM conditions showed to be higher than for nCM treatment (Fig. 6C and D). When visually comparing conditions after 24 h, all of them decreased the number of tubule-like structures, however, nCM was the condition which had more cellular debris and fewer tubule-like structures than CMs, a fact that is even more accentuated after 48 h, when it is no longer possible to define any tubule-like structure in the samples cultured with nCM (Supplementary Fig. 2). These data point out that the aCM or vCM can induce capillary-like tubule formation with similar quality than the positive control – thus confirming that both CMs have important molecules related to angiogenesis process.

## 4. Discussion

In this paper we characterized and evaluated the potential of CRSC secretome to drive culture maintenance, proliferation, migration, adhesion, cardiomyogenesis and angiogenesis of ADSCs and progenitor cells. The CRSC population we used here has been previously isolated and characterized [5]. These cells consist in a heterogeneous population that migrated from cardiac tissue explants (human heart auricle and ventricle) and owns characteristics and differentiation potential of MSCs. In this study, we confirmed MSC immunophenotype of CRSCs and also demonstrated that this population is also composed by DDR-2 positive cardiac fibroblasts. Considering that stromal cells are important coordinators of tissue microenvironment since they are responsible for secreting signaling molecules and ECM [16], we decided to use CRSC population (without purifying different cell types) in order to obtain and characterize its secretome (soluble factors and ECM). Our hypothesis is that CRSC secretome may mimic tissue-derived signals and enable



**Fig. 5.** H9c2 proliferation and differentiation with aCM and vCM. (A) Immunofluorescence for cTnI (top) and cTnT (bottom) on H9c2 cells after 7 days in differentiation conditions; scale bar on representative images = 100 µm. Analysis of cTnI (B) and cTnT (C) immunostaining. Bar chart showing the mean area (µm<sup>2</sup>) stained after 7 days of differentiation induction. Standard condition to induce H9c2 differentiation was also evaluated (Control = DMEM 1% FBS). (D) Quantification of the proliferative cell number (Ki67+ cells) in CMs or nCM. Standard H9c2 culture condition was also evaluated (Control = DMEM 1% FBS). \**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001. *n* = 3. aCM = auricle derived conditioned medium; vCM = ventricle derived conditioned medium; nCM = non-conditioned medium.



**Fig. 6.** Capillary-like tubule formation assay of HUVECs cultured for 12 h on a Matrigel layer. (A) Representative images of tubule-like formation for each analyzed condition; scale bar = 200 µm. Analysis of the number of meshes (B) and nodes (C) formed after 12 h. \* $p < 0.05$  vs nCM; \*\* $p < 0.01$  vs nCM; \*\*\* $p < 0.001$  vs nCM; # $p < 0.05$  vs Control; ### $p < 0.001$  vs Control. aCM = auricle derived conditioned medium; vCM = ventricle derived conditioned medium; nCM = non-conditioned medium.

the study of cardiac tissue microenvironment on modulating the behavior of progenitor cells. Unraveling the proteins secreted in cardiac microenvironment and their role on progenitor cell behavior may trigger new insights towards a possible way to activate resident cardiac stem cells and/or recruit/transdifferentiate progenitor cells derived from organs other than the heart.

An interesting finding of the study that encouraged us to further test the hypothesis of CRSC secretome as tissue signal mimicking, was the detection of protein networks related to cardiovascular system development as well as cell growth and maintenance. The methodologies used here allowed us to have a more extensive and complete characterization of soluble factors secreted by CRSCs. Some of the identified proteins have been found previously in MSC [17,18], human cardiac resident stem [19] and murine cardiac fibroblast [20] secretomes.

Given that CRSC secreted signals may influence stem cell maintenance in the culture, we tested if the secreted molecules would be cytotoxic to ADSCs. We observed that the use of CRSC secretome was safe to ADSC cultures and, although we did not observe any influence regarding cell adhesion and migration, it was clearly possible to see an increase in the number of cells (Fig. 2 and Supplementary Fig. 1). This effect was mainly related to the signals derived from CMs other than ECMs. The main drivers of cell proliferation induction that were present in CMs were proteins like CC and CXC chemokines and fibronectin [21–23]. Furthermore, aCM appeared to be more effective on stimulating ADSC proliferation in the first days of culture, while vCM was more robust after 7 days of culture (Fig. 3). The reason for such culture dynamics is unclear, since both CMs were very similar in terms of cell proliferation inducers.

We have also found in CRSC secretome, some effector proteins associated with cardiovascular system development such as IL-6, which plays an important role during cardiac development and postnatally for cardiomyocyte growth and survival [24]. Similar to the findings of the literature [25], we could not detect cardiomyogenic differentiation of ADSC treated with CRSC secretome alone (i.e. without any known cardiogenic inducer such as the genome-wide demethylating agent 5-azacytidine [26]). Nevertheless, the CRSC secretome was able to induce cardiomyoblasts to proliferate and differentiate. The induction of cardiomyocyte proliferation was also reported by Zhang and colleagues using the conditioned medium derived from W8B2 + cardiac resident stem cells [19].

The protein network of CRSC secretome that was associated with the cardiovascular system was mainly linked to a pro-angiogenic stimulus. Some of the proteins that affect endothelial and cardiac progenitor cells were erythropoietin [27,28], extracellular matrix protein 1 [29], IL6 [24] and IL1 $\beta$  [30]. The influence of conditioned media from different cell sources in promoting angiogenesis continues to be proved elsewhere [19,31,32]. Here we also checked that aCM and vCM had signaling molecules that are capable to promote capillary-like tubule formation in HUVEC cultures without the addition of any other growth factor.

Even though we used two different cell populations to isolate CRSCs, we observed that they both shared most of the proteins and thus, they generated very similar effects on progenitor cells. This information may be very useful in order to establish future cell therapies. For example, heart tissue that is discharged during certain cardiac surgical procedures could be used as a cell source, besides autologous cell therapy could also be considered, as previously discussed [5].

To our knowledge, it was the first time that a heterogeneous cell population derived from human heart was used as a source of stimulating signals and its positive effects over progenitor cells were confirmed. These findings are extremely relevant because cytokine and secretome therapy has been considered for cardiovascular diseases (reviewed by [33,34]). In addition, mechanisms for those results are still unclear, meanwhile they may be correlated to the protein content of secretome. Thus, further studies must be conducted in order to confirm that protein content of secretome is the key regulator for those effects. Moreover, we did not observe any toxic effect in vitro, therefore, preclinical studies must be done aiming to evaluate in vivo safety and the effects of CRSC secretome treatment for cardiac failure.

## 5. Conclusion

In conclusion, we performed the characterization of auricle and ventricle-derived CRSC secretome, which contains a set of proteins related to cellular proliferation and cardiovascular development. These factors are able to induce ADSC proliferation, and also promote cardiac differentiation and angiogenesis stimulation on progenitor cells. Together, these results suggest that CRSCs may represent an interesting source of an acellular bioactive compound with a great potential use for tissue therapy.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.199>.

### Conflict of interest

The authors report no potential conflicts of interest or financial interests.

### Acknowledgments

We would like to thank all the staff of Carlos Chagas Institute (Fiocruz-PR) for the laboratory and administrative support and the staff of Homograft Bank (Santa Casa de Misericórdia/PUCPR) for tissue collection. We thank PerkinElmer for allowing the use of their Operetta® high content imaging system. We also thank Grupo Boticário for allowing the use of their Molecular Devices Micro High Content Imaging system. We thank Wagner Nagibe de Souza Birbeire for the visual design of the graphical abstract. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities, in special Flow cytometry core facility, mass spectrometry facility and confocal and deconvolution microscopy. We thank Guilherme Silveira for CBA data analysis and Paulo Moro for the flow cytometry half off set histogram design. This study was supported by Fundação Araucária (Grant numbers 334/2012 and 14/2009) and CNPq (Grant number 475710/2010-0).

### References

- [1] A.J. Wagers, The stem cell niche in regenerative medicine, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 362–369.
- [2] G.M. Ellison, C. Vicinanza, A.J. Smith, I. Aquila, A. Leone, C.D. Waring, et al., Adult c-kit(+) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair, *Cell* 154 (2013) 827–842.
- [3] S.E. Senyo, M.L. Steinhauser, C.L. Pizzimenti, V.K. Yang, L. Cai, M. Wang, et al., Mammalian heart renewal by preexisting cardiomyocytes, *Nature* 493 (2013) 433–436.
- [4] B. Nadal-Ginard, G.M. Ellison, D. Torella, The cardiac stem cell compartment is indispensable for myocardial cell homeostasis, repair and regeneration in the adult, *Stem Cell Res.* 13 (2014) 615–630.
- [5] A.M. De Aguiar, C. Kuligovski, M.T.B.A. da Costa, M.A. Stimamiglio, C.L.K. Rebelatto, A.C. Senegaglia, et al., Alkaline phosphatase-positive cells isolated from human hearts have mesenchymal stem cell characteristics, *Stem Cell Discov.* 01 (2011) 71–80.
- [6] R. Crescitelli, C. Lässer, T.G. Szabo, A. Kittel, M. Eldh, I. Dianzani, et al., Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes, *J. Extracell. Vesicles* 2 (2013) 1–10.
- [7] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R.A. Scheltema, J.V. Olsen, M. Mann, Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1794–1805.
- [8] M. Pathan, S. Keerthikumar, C.S. Ang, L. Gangoda, C.Y.J. Quek, N.A. Williamson, et al., FunRich: an open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool, *Proteomics* 15 (2015) 2597–2601.
- [9] Y. Eitan, U. Sarig, N. Dahan, M. Machluf, Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: in vitro cell support, remodeling, and biocompatibility, *Tissue Eng. C Methods* 16 (2010) 671–683.
- [10] Y. Lai, Y. Sun, C.M. Skinner, E.L. Son, Z. Lu, R.S. Tuan, 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 Dev.* 19 (2010) 1095–1107.
- [11] T. Jensen, B. Roszell, F. Zang, E. Girard, A. Matson, R. Thrall, et al., A rapid lung decellularization protocol supports embryonic stem cell differentiation in vitro and following implantation, *Tissue Eng. C Methods* 18 (2012) 632–646.
- [12] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (2011) 3233–3243.
- [13] A.P.R. Abud, J. Zych, T.L. Reus, C. Kuligovski, E. de Moraes, B. Dallagiovanna, et al., The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 73 (2015) 992–998.
- [14] C.-C.C. Liang, A.Y. Park, J.-L.L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333.
- [15] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315–317.
- [16] P. Christalla, J.E. Hudson, W.H. Zimmermann, The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium, *Cells Tissues Organs* 195 (2011) 82–93.
- [17] T. Pereira, G. Ivanova, A.R. Caseiro, P. Barbosa, P.J. Bartolo, J.D. Santos, et al., MSCs conditioned media and umbilical cord blood plasma metabolomics and composition, *PLoS One* 9 (2014) 1–31.
- [18] J.R. Lavoie, M. Rosu-Myles, Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells, *Biochimie* 95 (2013) 2212–2221.
- [19] Y. Zhang, P. Sivakumaran, A.E. Newcomb, D. Hernandez, N. Harris, R. Khanabadi, et al., Cardiac repair with a novel population of mesenchymal stem cells resident in the human heart, *Stem Cells* 33 (2015) 3100–3113.
- [20] M. Abonnenc, A.A. Nabeebaccus, U. Mayr, J. Barallobre-Barreiro, X. Dong, F. Cuello, et al., Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of MicroRNA-29b and MicroRNA-30c, *Circ. Res.* 113 (2013) 1138–1147.
- [21] R. Halwani, J. Al-Abri, M. Beland, H. Al-Jahdali, A.J. Halayko, T.H. Lee, et al., CC and CXCL chemokines induce airway smooth muscle proliferation and survival, *J. Immunol.* 186 (2011) 4156–4163.
- [22] K.P. Schofield, M.J. Humphries, E. de Wynter, N. Testa, J.T. Gallagher, The effect of alpha4 beta1-integrin binding sequences of fibronectin on growth of cells from human hematopoietic progenitors, *Blood* 91 (1998) 3230–3238.
- [23] S.K. Kuwada, X. Li, Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation, *Mol. Biol. Cell* 11 (2000) 2485–2496.
- [24] I. Banerjee, J.W. Fuseler, A.R. Intwala, T.A. Baudino, IL-6 loss causes ventricular dysfunction, fibrosis, reduced capillary density, and dramatically alters the cell populations of the developing and adult heart, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296 (2009) H1694–H1704.
- [25] X. Zhang, M.-R. Shen, Z.-D. Xu, Z. Hu, C. Chen, Y.-L. Chi, et al., Cardiomyocyte differentiation induced in cardiac progenitor cells by cardiac fibroblast-conditioned medium, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 239 (2014) 628–637.
- [26] S. Makino, K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, et al., Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 697–705.
- [27] P. Van Der Meer, A.A. Voors, E. Lipsic, W.H. Van Gilst, D.J. Van Veldhuisen, Erythropoietin in cardiovascular diseases, *Eur. Heart J.* 25 (2004) 285–291.
- [28] D. Ribatti, M. Presta, A. Vacca, R. Ria, R. Giuliani, P. Dell’Era, et al., Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo, *Blood* 93 (1999) 2627–2636.
- [29] Z. Han, J. Ni, P. Smits, C.B. Underhill, B. Xie, Y. Chen, et al., Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells, *FASEB J.* 15 (2001) 988–994.
- [30] Q. Zhang, I. Kandic, J.T. Barfield, M.J. Kutryk, Coculture with late, but not early, human endothelial progenitor cells up regulates IL-1 $\beta$  expression in THP-1 monocytic cells in a paracrine manner, *Stem Cells Int.* 2013 (2013).
- [31] C. Shen, P. Lie, T. Miao, M. Yu, Q. Lu, T. Feng, et al., Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 20–30.
- [32] H.-K. Jang, J. Han, J.-K. Yoon, J.-R. Lee, G.-J. Jeong, J.-Y. Shin, et al., Therapeutic angiogenesis using tumor cell-conditioned medium, *Biotechnol. Prog.* (2016) (n/a–n/a).
- [33] S.H. Ranganath, O. Levy, M.S. Inamdar, J.M. Karp, Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease, *Cell Stem Cell* 10 (2012) 244–258.
- [34] N. Boehar, J. Rapp, S. Pandya, D.W. Losordo, Rebuilding the damaged heart: the potential of cytokines and growth factors in the treatment of ischemic heart disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (2010) 1287–1297.

# ANEXO 1 – TERMO DE TRANSFERÊNCIA DAS CTES



## Material transfer agreement

### Parties

Murdoch Childrens Research Institute (ABN 21 006 566 972) of Royal Children's Hospital, Flemington Road Parkville Victoria 3052 Australia (**MCRI**)

and

Carlos Chagas Institute of Oswaldo Cruz Foundation – Rua Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC 81350-010, Curitiba, Brasil (**Recipient**)

### Background

MCRI proposes to provide, or as at the date of this agreement has provided, the Recipient with the Materials (as defined below) and any related Confidential Information for the purpose of the Research Project "Cellular and molecular characterization of the differentiation potential of stem cells". (**Purpose**).

The Recipient has agreed to use the Material and to keep confidential all Confidential Information of the MCRI subject to the following terms and conditions of this agreement.

### Description of the Materials

The Materials being provided by MCRI to the Recipient include the following human cell line: NKX2-5<sup>GFP</sup> Embryonic Stem Cell.

## 1 Defined terms

In this document:

**Confidential Information** of the MCRI includes the following, whether or not in material form:

- (a) all information that is confidential to the MCRI and that is disclosed (whether before or after the execution of this agreement) by the MCRI to the Recipient including but not limited to all information relating to the Material and any confidential know-how, data, results, models, samples, intellectual property, technology, trade secrets, drawings, processes, formulae, product development plans,

but excludes the following information, being information that:

- (b) is public knowledge or is lawfully known to or in the possession or control of the Recipient, other than as a result of a breach of confidentiality or this agreement;
- (c) is independently developed by the Recipient without the use of the MCRI confidential information and/or Materials; or
- (d) is required by law to be disclosed.

**Intellectual Property Rights** means all intellectual property rights subsisting anywhere in the world, including the following rights:

- (a) patents, copyright (including future copyright and software), rights in circuit layouts, designs, trade and service marks (including goodwill in those marks), domain names and trade names,

confidential information and any right to have confidential information kept confidential whether or not such rights are registered or capable of being registered; and

- (b) to the extent available any application or right to apply for registration of any of the rights referred to in paragraph (a).

## 2 Conditions for provision of Material

### 2.1 Use generally

The Recipient:

- (a) may only use the Material for the Purpose;
- (b) must not use the Material or any products containing any part of the Material or resulting from the use of the Material, for any commercial purpose without the prior written consent of the MCRI;
- (c) must comply with any applicable laws in relation to the importation, transportation, use, maintenance or disposal of the Material;
- (d) must not distribute or release the Material (nor any unmodified derivatives or genetically engineered modifications which are based on the Material) to any person other than the employees of the Recipient, and must make sure that no one is allowed to take or send the Material to any location other than a location under the control of the Recipient without prior written permission from the MCRI.

### 2.2 Results



The Recipient must inform the MCRI in writing of any and all research results produced by or on behalf of the Recipient related to the use of the Material. The Recipient must maintain the confidentiality of any information in relation to the Material and will not disclose any such information without the MCRI's prior written approval.

### 2.3 Intellectual Property Rights in Results

In consideration of MCRI supplying the Materials to the Recipient, the Recipient will, as soon as practicable, inform MCRI of any Intellectual Property developed from use of the Materials. The Recipient and MCRI will enter into negotiations to discuss their respective ownership rights in relation to the Intellectual Property.

### 2.4 Recipient acknowledgements

The Recipient acknowledges and agrees that:

- (a) the Material is made available for investigational use only;
- (b) the MCRI retains all ownership and Intellectual Property Rights in the Material and derivatives of the Material;
- (c) it will not obtain or attempt to obtain any patent protection in relation to:
  - i. any part of the Material (or any modification or use of any part of the Material); or
  - ii. any materials that could not have been made but for having access to the Materials,  
without the written consent of the Head of Commercialisation and Legal within the MCRI;
- (d) this transfer does not constitute a public disclosure;
- (e) the Material is experimental in nature and may have hazardous properties and is provided to the Recipient 'as is', without any warranty of merchantability, fitness for any particular purpose, ownership, or any other warranty, express, implied, statutory or otherwise. To the extent permitted by any applicable laws, the MCRI excludes any and all warranties in relation to the Material; and
- (f) the MCRI makes no representation or warranty that the Material or the use of any of the Material will not infringe any third party's intellectual property rights.

### 2.5 Publication

- (a) The Recipient shall have the right to publish its findings and results from the research with the Materials, provided that:
  - (i) all publications resulting from research using the Materials acknowledge the MCRI and Monash University;

- (ii) a copy of the proposed publication is provided to the MCRI thirty (30) days prior to the proposed publication, for the purpose of determining whether it contains Confidential Information. The MCRI may require amendment of the proposed publication (including as to authorship) or seek a delay in publication if the MCRI has a patent application which would be prejudiced by publication. The parties will negotiate in good faith the extent of any amendment or period of delay. In no case should the delay exceed ninety (90) days following the day on which a copy of the proposed publication is provided to the MCRI.

### 3 Use and disclosure of Confidential Information

The Recipient agrees to use all Confidential Information solely for the Purpose and to keep it confidential. The Recipient may only disclose Confidential Information to those of its employees and officers who have a need to know and are aware that the Confidential Information must be kept confidential.

The Recipient must establish and maintain effective security measures to safeguard the Confidential Information from access or use not authorised by this agreement and must keep the Confidential Information under its control.

### 4 Agreement end and return or destruction of Material and any Confidential Information after agreement ends

Unless otherwise agreed, this agreement ends on the date the associated research project (for which the Materials have been obtained) ends.

Immediately upon the request of the MCRI (including after termination of this agreement in accordance with clause 6) or at agreement end, the Recipient must follow the MCRI's instructions in relation to destroying or returning the Material and/or Confidential Information of the MCRI.

### 5 Recipient liability

Except to the extent prohibited by law, the Recipient assumes all liability for damages which may arise from its use, storage or disposal of the Material. MCRI will not be liable to the Recipient for any loss, claim or demand made by the Recipient, or made against the Recipient by any other party, due to or arising from the use of the Material by the Recipient, except to the extent permitted by law when caused by the gross negligence or wilful misconduct of MCRI.

### 6 Termination

- (a) The MCRI may terminate this agreement at any time with immediate effect by giving written notice to the Recipient.

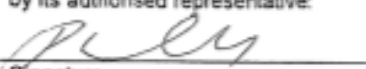
- (b) Any obligations of confidentiality under this agreement continue to apply to the parties to this agreement after termination.
- (c) Termination of this agreement does not affect any accrued rights or remedies the MCRI may have.


**7 Miscellaneous**

- (a) This agreement may be executed in any number of counterparts. All counterparts will constitute one instrument. The parties agree that facsimile or email signatures will be accepted as originals.


- (b) A party must not assign or otherwise transfer any or all of its rights arising out of this agreement without the written consent of the other party.
- (c) This agreement constitutes the entire agreement between the parties with respect to the transfer of Material to the Recipient. This agreement may be amended only by written agreement of both parties.


**Executed as an agreement**

Date: *21 November 2016*  
 Signed for **Murdoch Childrens Research Institute**  
 by its authorised representative:  
  
 Signature  
*Phoebe Maxwell - Legal Counsel*  
 Print Name

Read, understood and accepted by:  
  
 Signature (MCRI Investigator)  
**David Elliott**  
 Print Name

Date: 21/11/201516

Date:  
 Signed for **Oswaldo Cruz Foundation**  
 by its authorised representative:  
  
 Signature  
**Bruno Dallegri**  
 Pesquisador  
 INE: 1553795  
 Print Name

  
 Signature (Recipient Investigator)  
**Marco Augusto Stinomiglio**  
 Pesquisador  
 Mat: 1985722  
 Flocruz PR - ICC  
 Print Name

Date: *November 11, 2016*