

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

João Pedro B. Prestes

**Obtenção de *patches* cardíacos por bioimpressão 3D, contendo nanotubos de carbono,
matriz de coração descelularizada e células-tronco mesenquimais**

Porto Alegre

2023

João Pedro B. Prestes

Obtenção de *patches* cardíacos por bioimpressão 3D, contendo nanotubos de carbono, matriz de coração descelularizada e células-tronco mesenquimais

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Patricia Pranke

Porto Alegre

2023

João Pedro B. Prestes

Obtenção de *patches* cardíacos por bioimpressão 3D, contendo nanotubos de carbono, matriz de coração descelularizada e células-tronco mesenquimais

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: **Vinte e três de março de 2023.**

BANCA EXAMINADORA

TADEU MELLO E SOUZA - UFRGS

NATASHA MAURMANN - UFRGS

PATRICIA PRANKE - UFRGS

RESUMO

As doenças cardiovasculares figuram como a principal causa de morte atualmente no mundo. O infarto agudo do miocárdio induz a morte de cardiomiócitos e alterações na matriz extracelular que cronicamente levam a degeneração funcional do órgão. A medicina regenerativa, utilizando a engenharia de tecidos, vem desenvolvendo tratamentos que promovam a recuperação funcional do coração. O presente estudo objetivou desenvolver um hidrogel baseado em alginato de sódio e gelatina funcionalizado com nanotubos de carbono e matriz extracelular descelularizada, a fim de promover a condutividade elétrica e a presença de biomoléculas nativas do tecido cardíaco no material. Em seguida, com a técnica de bioimpressão 3D, foi produzido um implante com células-tronco mesenquimais dispersas no hidrogel. A dispersão de nanotubos de carbono em alginato de sódio e gelatina foi realizada gerando agregados. Os protocolos de descelularização de corações de rato testados nesse trabalho reduziram os núcleos presentes nas amostras. O material apresentou aspecto preto opaco característico dos nanotubos concentrado na região central bioimpressa. O construto 3D bioimpresso formado pelo hidrogel de 5% alginato, 5% gelatina com 1% de matriz extracelular cardíaca descelularizada e 1,5 mg/ml de nanotubos de carbono manteve sua forma do mesmo modo do gel controle de alginato de sódio e gelatina por duas semanas em uma incubadora a 37°C 5% de CO₂.

Palavras-chave: nanotubos de carbono; bioimpressão 3D; engenharia tecidual cardíaca; descelularização; células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the number one cause of death worldwide. Acute myocardial infarction (AMI) induces the death of cardiomyocytes and alterations in the extracellular matrix chronically, leading to heart functional degeneration. Regenerative medicine and tissue engineering have been developing treatments to promote functional recovering after AMI. The aims of this study was to develop a hydrogel based on sodium alginate and gelatin functionalized with carbon nanotubes and decellularized extracellular matrix, in order to provide the material with electrical conductivity and biomolecules native to the cardiac tissue. Using the 3D bioprinting technique, an implant with mesenchymal stem cells dispersed in the hydrogel was then produced. The dispersion of carbon nanotubes in sodium alginate and gelatin was established. Rat heart decellularization protocols tested in this work did not produce adequate removal of nuclei and DNA from the samples.

Keywords: carbon nanotubes; 3D bioprinting; cardio; decellularization; mesenchymal stem cells

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	8
1.1 JUSTIFICATIVA	10
1.2 OBJETIVOS	11
1.2.1 Objetivo geral	11
1.2.2 Objetivos específicos	11
2 ARTIGO CIENTÍFICO	13
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA IOP BIOFABRICATION	21

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é caracterizado pela morte repentina de cardiomiócitos decorrente de isquemia (FRANGOIANNIS et al., 2015). O processo de morte celular observado tem padrões necróticos e apoptóticos, a exata proporção de influência desses dois mecanismos ainda é discutida na literatura (KONSTANTINIDIS et al., 2012) (NICOTERA et al., 2004). A isquemia gera um ambiente de hipóxia sobre o qual os cardiomiócitos se voltam para vias metabólicas anaeróbicas que rapidamente, em função da enorme demanda energética do tecido cardíaco, produzem uma série de metabólitos tóxicos e alterações do ambiente intracelular. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas altamente reativas propensas a causar danos ao tecido quando seus níveis se elevam além da capacidade de defesa antioxidante da célula. Seus níveis são rapidamente elevados durante o processo de IAM, vide o desvio das reações metabólicas para vias anaeróbicas e por consequentes alterações de pH (BUGGER et al., 2020). Concomitante, temos o estabelecimento de processos inflamatórios ocorrendo na região infartada em decorrência da morte celular e do consequente ambiente tecidual gerado (FRANGOIANNIS et al., 2015). Posterior a um restabelecimento da circulação, por intervenção médica, dá-se início aos fisiológicos processos de reparo do tecido. Primeiro, a resposta inflamatória mediada por neutrófilos e macrófagos realizam a remoção de fragmentos celulares e corpos apoptóticos. Em seguida, a região é repopulada por fibroblastos que iniciam a cicatrização; ao final desse processo forma-se um tecido não contrátil com consequências crônicas para o coração e sistema cardiovascular (TALMAN et al., 2016).

Insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é definida pela redução da capacidade funcional do tecido cardíaco. Seu diagnóstico não possui teste definitivo; dependendo, portanto, da análise clínica apoiada por avaliações eletrofisiológicas e de imagem (S FIGUEROA et al., 2012). Em decorrência da expansão da matriz extracelular (ME) e redução do componente celular funcional (cardiomiócitos) o IAM está entre as principais causas ICC ao comprometer a elasticidade do tecido variando (de maneira geral reduzindo) a competência da sístole e/ou da diástole. A proporção entre o volume da câmara cardíaca contraída e relaxada dita a capacidade de extrusão do coração juntamente ao ritmo cardíaco (S FIGUEROA et al., 2012). O desenvolvimento da ICC provoca o abastecimento inadequado de oxigênio aos tecidos. Como consequência desse estresse ocorre o estabelecimento de processos de inflamação sistêmica. Ademais, o coração estabelece mecanismos fisiológicos de compensação como a hipertrofia

do músculo e o aumento do batimento cardíaco, provocando, também, processos inflamatórios e a produção de ERO no tecido (ZHOU et al., 2018).

Portanto, o IAM provocando a ICC leva a ineficiente função do órgão culminando em processos compensatórios crônicos e auto-agravantes. O conjunto entre ERO, inflamação e, parcial substituição do tecido funcional pelo cicatricial não contrátil são as principais características patofisiológicas do IAM onde intervenções da medicina regenerativa, com fim na recuperação funcional do órgão, parcial ou integralmente, podem atuar.

A engenharia de tecidos tem como sua tríade a utilização de células, “scaffolds” e biomoléculas nas suas estratégias (DE ISLA et al., 2010). Um biomaterial formado a partir da união desses três pilares tem como objetivo, dentro da medicina regenerativa, realizar uma recuperação funcional do tecido, apresentando características fisiológicas e mecânicas pertinentes a esse fim; logo, não necessariamente se idealiza uma perfeita réplica dos componentes celulares, matriciais e biomoleculares, mas sim uma composição que atue compensando a patofisiológica de interesse.

A bioimpressão 3D surgiu com a promessa de encerrar as filas de transplantes ao possibilitar a confecção de órgãos funcionais utilizando componentes biológicos. Embora não se tenha ainda alcançado esse nível de bioengenharia, a técnica se mostrou muito promissora em desenvolver biomateriais com estruturas e composições de alta precisão (ZHOU et al., 2014). Tem como componente principal o *scaffold* biocompatível com composição baseada nas competências mecânicas e indutoras necessárias para a implantação e suporte do tratamento proposto. A produção de *patches* por bioimpressão 3D vem recebendo muita visibilidade como uma alternativa a um transplante completo do órgão, pois possibilita a recuperação funcional direta do tecido parcialmente danificado reduzindo consequências crônicas do seu funcionamento deficitário (STAPENHORST et al., 2021); assim, permitindo a confecção de tratamentos com composição e geometrias específicas para o tipo de tecido e lesão do paciente a ser tratado.

Em estudos que utilizam a bioimpressão 3D existe um recorrentemente foco central na arquitetura dos biomateriais e sua compatibilidade, relevando a vasta composição de biomoléculas presentes na matriz extracelular (ME). Porém, em um contexto *in vivo* a presença dessas moléculas exerce funções muito além das estruturais, sendo fundamentais na sinalização de múltiplos processos fisiológicos. Em geral, o biomaterial apenas, dentro de seus limites físicos, não é suficiente para a recuperação funcional do tecido (referenciar). Para isso deve-se coordenar o tratamento com os processos fisiológicos próprios do órgão; assim, alinhando a arquitetura e composição de biomoléculas do biomaterial com a do tecido promove-se um processo regenerativo complementar. Nesse contexto, a

descelularização surge como uma estratégia de obter a ME em toda sua complexidade de composição de maneira simples (HUSSEIN et al., 2016). Com uma estrutura 3D preservada, a ME descelularizada (MED) pode servir de *scaffold* sendo recelularizada, idealmente, com células-tronco do paciente que receberá o órgão (OTT et al., 2008). No entanto, com a bioimpressão 3D surge a possibilidade de utilizar a MED como um aditivo de uma biotinta; dessa forma, concedendo a ela uma composição biomolecular próxima a encontrada no tecido nativo.

Células-tronco são, talvez, o mais famoso componente dentro dos campos de engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Elas apresentam a capacidade de se dividir enquanto troncos e mediante estímulos se diferenciar em linhagens específicas exibindo parcial ou integralmente suas capacidades fisiológicas. Essas capacidades são de extrema relevância quando objetivamos repopular um tecido danificado, pois, de maneira geral, a medicina regenerativa trabalha com tecidos que quando danificados reduzem sua competência funcional ao substituir células e ME nativa por tecido cicatricial. Portanto, células-tronco promovem a possibilidade de serem expandidas em um biomaterial e, posteriormente, diferenciá-las em células funcionais do tecido alvo (OTT et al., 2008).

Os nanotubos de carbono (NTC) são estruturas tubulares com a espessura de um único átomo de carbono. Sendo subdivididos em NTC de parede única ou de parede múltipla, a diferença é que os de parede múltipla são essencialmente dois ou mais nanotubos concêntricos ligados por interações de van-der-waals (NEGRI et al., 2020). Nos últimos anos, os NTC têm despertado o interesse da área biológica com suas propriedades condutivas e estruturais. Associando NTC a um biomaterial pode-se alterar parâmetros reológicos, reduzir níveis de moléculas oxidantes e promover a condutividade elétrica (ZHOU et al., 2014). Esse conjunto de propriedades é especialmente pertinente a biomateriais cardiológicos; pois, esses precisam resistir ao estresse mecânico do batimento cardíaco, lidar com um ambiente de estresse metabólico provocado pela ICC, além de, pela condutibilidade, promover o sincício dos cardiomiócitos. Dessa forma, NTC como aditivos a construtos cardíacos apresentam uma promissora sinergia.

1.1 JUSTIFICATIVA

Doenças cardiovasculares ocupam a primeira posição como maior causa de óbitos no mundo. O infarto agudo do miocárdio causa, devido à perda de cardiomiócitos e remodelação da matriz extracelular, a crônica degeneração funcional do órgão resultando no quadro de insuficiência cardíaca. Estratégias com a utilização de hidrogéis bioimpressos criam implantes capazes de promover a recuperação funcional do tecido. Assim, esse trabalho prevê estabelecer um implante bioimpresso contendo células-tronco mesenquimais; alginato de sódio e gelatina; nanotubos de carbono e matriz extracelular descelularizada. A funcionalização com nanotubos de carbono promoveria melhores características mecânicas e eletro condutibilidade ao material. A matriz extracelular cardíaca descelularizada, por outro lado, introduziria toda a complexidade biomolecular presente no tecido nativo.

1.2 OBJETIVOS

Objetiva-se produzir um *patch* cardíaco através da técnica de bioimpressão 3D por extrusão confeccionado a partir de um biomaterial a base de alginato e gelatina com adição de MED oriunda de corações de rato de descarte, NTC funcionalizados com um grupamento oxidado e CTM derivadas de polpa de dente decíduo.

1.2.1 Objetivo geral

Objetiva-se o desenvolvimento de um biomaterial contendo NTC, tecido cardíaco descelularizado (TCD) e CTM em gelatina/alginato.

1.2.2 Objetivos específicos

1.2.2.1. Avaliar a dispersão de nanotubos de carbono (NTC)

- 1.2.2.2. Testar protocolos de descelularização de coração de ratos para obter tecido cardíaco descelularizado (TCD)
- 1.2.2.3. Produção de uma biotinta contendo NTC, TCD e CTM.
- 1.2.2.4. Bioimpressão da biotinta em um *patch* cardíaco.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Fabricação e bioimpressão de biogel a base de gelatina, nanotubos de carbono e matriz extracelular cardíaca descelularizada com células-tronco mesenquimais

João Pedro Prestes^{1,2}, Marcelo Garrido^{1,2,3}, Julia Barros^{1,2}, Fernanda Muckler^{1,2}, Thaís Montanheiro^{4,5}, Fernanda França^{1,2}, Patricia Pranke^{1,2}

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Instituto de Pesquisas com Células-tronco (IPCT)

³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

⁴ Instituto Tecnológico de Aeronáutica

⁵ Laboratório de Nanotecnologia

E-mail: jpedro20091@gmail.com

E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

Resumo

Doenças cardiovasculares figuram como a principal causa de morte atualmente no mundo. O infarto agudo do miocárdio induz a morte de cardiomiócitos e alterações na matriz extracelular que cronicamente levam a degeneração funcional do órgão. A medicina regenerativa utilizando a engenharia de tecidos vem desenvolvendo tratamentos que promovam a recuperação funcional do coração. Esse estudo objetivou desenvolver um hidrogel baseado em alginato de sódio e gelatina funcionalizado com nanotubos de carbono e matriz extracelular descelularizada, a fim de promover a condutividade elétrica e a presença de biomoléculas nativas do tecido cardíaco no material. Em seguida, com a técnica de bioimpressão 3D, foi produzido um implante com células-tronco mesenquimais dispersas no hidrogel. A dispersão de nanotubos de carbono em alginato de sódio e gelatina foi estabelecida.

Palavras - chave: nanotubos de carbono; bioimpressão 3D; cardio; descelularização; células-tronco mesenquimais.

1. Introdução

Doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte no mundo atualmente ^[1]. Entre elas, o infarto agudo do miocárdio (IAM) figura como mais recorrente, com estimativas de 300 a 400 mil casos por ano no Brasil sendo a maior razão de óbitos no país também ^[2]. Além desses aspectos, mesmo os casos em que intervenções médicas conseguem reverter a isquemia pode-se, ainda, desenvolver o quadro de insuficiência cardíaca (IC) com piora da qualidade de vida, evoluindo, até mesmo, ao óbito.

O coração tem como sua principal célula funcional os cardiomiócitos (CM), responsáveis por realizar em sincronia a contração do músculo efetivando o bombeamento de sangue pelo sistema vascular. A matriz extracelular

representa um papel igualmente central na capacidade funcional do órgão, provendo uma estrutura de sustentação com competências mecânicas necessárias para o batimento cardíaco (BC) juntamente a múltiplos processos sinalizatórios aos CM e demais tipos celulares presentes na região. No entanto, no pós-IAM temos os fibroblastos cardíacos (CFB) assumindo a posição de protagonismo juntamente das células do sistema imune durante a fase de cicatrização do tecido. Esses três componentes e suas alterações no IAM são o objeto de estudo central para compreender a patofisiológica crônica do dano efetuado.

O IAM se caracteriza pela morte celular, tanto necrótica quanto apoptótica, no tecido cardíaco devido a uma isquemia ^[3]. Ao ser restabelecido o aporte de sangue para o músculo cardíaco, o órgão não é capaz de regenerar os CM perdidos;

resultando, portanto, da diminuição da capacidade funcional do órgão. As complicações ainda se agravam, pois durante o processo de cicatrização do tecido os CFB substituem a matriz nativa com uma matriz menos complacente com o BC [4]. Esse conjunto de processos resulta no órgão estabelecendo processos compensatórios, podendo culminar no desenvolvimento do quadro de IC.

O não adequado bombeamento do sangue por parte do coração define a IC; provocada pela mudança do ambiente tecidual, acarreta na hipertrofia das células cardíacas e deformação das câmaras cardíacas afetadas resultando na sua dilatação. Cronicamente, esse processo é auto agravante, degenerando sua competência sistólica e diastólica ao passo que promove a inflamação e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no tecido [5]. A progressão da patologia pode levar ao comprometimento do coração resultando na necessidade de transplante ou, em último caso, o óbito.

A produção de biomateriais usando a tecnologia de bioimpressão 3D está em evidência atualmente. A técnica apresenta a possibilidade de confeccionar construtos com arquiteturas complexas e precisas; oferecendo, ainda, a fácil replicação. No entanto, para a efetuação da técnica é necessário a produção de um biogel adequado, podendo oferecer a sustentação necessária às demandas do tecido, enquanto, ainda, apresentar a capacidade de ser impressa (CSI) corretamente. Nesse contexto, biomateriais desenvolvidos para o tecido cardíaco devem possuir a rigidez estrutural complacente com os processos de estiramento e compressão experimentados durante o BC, juntamente com a característica de eletrocondutividade que permita o sincício.

A combinação de alginato de sódio e gelatina (A/G) é uma excelente base para biogéis em função de sua conhecida biocompatibilidade em somatória com a propriedade de realizar reticulação térmica reversível e reticulação química frente ao cloreto de cálcio [6]. Attingir uma viscosidade tanto adequada para o processo de extrusão quanto para a sustentação da forma do construto durante a impressão requer o ajuste entre as concentrações de A/G junto a dos aditivos utilizados para a funcionalização. Ganhando notoriedade para área biomédica atualmente, os nanotubos de carbono (NTC) podem melhorar a resistência do biogel e capacitá-lo a eletro condutividade [7]. Trabalhos como Zhou et al., 2013 demonstram que a funcionalização de um biomaterial com NTC promoveu uma melhor integração do construto com o tecido nativo, produzindo um implante com módulos de resistência a compressão e cisalhamento mais adequados, além de demonstrar um maior número de contrações por minuto quando comparado a CM em cultura sem o tratamento.

Embora a confecção de um biomaterial utilizando A/G e NTC apresentaria boa CSI, a matriz extracelular (ME) cardíaca apresenta uma complexidade de biomoléculas que atuam também na sinalização com os CM e demais tipos

presentes no tecido. Lindsey et al., 2018 revela que 90% da ME cardíaca se compõe por 10 diferentes proteínas entre colágenos, glicosaminoglicanos, fibronectinas, elastinas e outras. Uma estratégia para aproximar o biogel da composição de biomoléculas encontradas no tecido nativo é o emprego de ME descclularizada (MED) como aditivo. Múltiplos estudos já focam no emprego de MED cardíaca (MEDC) como *scaffold* utilizando biorreatores para descclularizar o tecido e recelularizar-lo em seguida [8], mas com a técnica de bioimpressão 3D podemos produzir a base de sustentação (*scaffold*) modulada aos nossos interesses enquanto a MED é misturada fornecendo todo o conjunto proteico sem ditar exclusivamente as características físicas do implante.

Por fim, um biomaterial cardíaco necessita da utilização de células no implante a fim de restabelecer as unidades contrateis do tecido. Para esse fim, a utilização de células-tronco (CT) possibilita a pretensão de um tratamento altamente biocompatível quando diferenciamos CT do próprio paciente a receber o implante. As CT mesenquimais (CTM) podem se diferenciar em CM [9] e seu isolamento pode ser feito a partir de tecidos de simples acesso como polpa de dente decíduo. Popular um biomaterial com CTM replicantes e induzi-las a diferenciação em CM por funcionalização do implante seria central em uma estratégia de tratamento.

Um implante bioimpresso composto de A/G, NTC, MEDC e CTM apresentaria, portanto, adequadas características reológicas, resistindo adequadamente aos estresses mecânicos do BC; eletro condutividade; promovendo o sincício dos CM do implante com os nativos; perfil biomolecular, incitando um microambiente mais biocompatível e biomimético as CTM do implante e CM nativos. Protocolar o processo de confecção desse biogel e sua bioimpressão foi o objetivo desse trabalho.

2. Metodologia

2.1 Nanotubos de carbono

NTC de parede múltipla oxidados (NTC-ox) com ácido nítrico 6M por 5 horas a 120°C foram fornecidos por parceria com a Dra. Thais Montanheiro do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA).

2.2 Corações de rato

Amostras de coração de rato inteiro de descarte foram fornecidos pela Dra. Fernanda Mello através do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) localizado no campus do vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.3 Células-tronco mesenquimais

CTM foram isoladas de polpa de decíduo doados de pacientes e posteriormente caracterizados em artigo em produção pelo nosso grupo de pesquisa.

2.4 Protocolo “A” de dispersão dos nanotubos de carbono

A quantidade de 10 mg de NTC-ox foi adicionada a 50 ml de água destilada (AD) em um tubo de plástico e colocados em banho de ultrassom por diferentes períodos: entre 30 min até 1h e 10 min. A sonicação, também, foi realizada por 1h com intervalos de 1 min a cada 8 min.

2.5 Protocolo “B” de dispersão dos nanotubos de carbono

Foi realizado o mesmo processo do protocolo “A” com a adição de Triton X-100 em concentração menor que 0,05%.

2.6 Protocolo “C” de dispersão dos nanotubos de carbono

Uma concentração de 1,5 mg/ml de NTC foi adicionada a PBS e posta em banho de ultrassom por 40 min, ocasionalmente utilizando vórtex na solução. Em seguida, adicionou-se A/G na concentração final de 5% cada. Os pós de NTC, de alginato e de gelatina foram submetidos à luz UV por 15 min para fins de esterilização. Do mesmo modo, foi utilizado PBS estéril e o processo feito dentro de uma capela de fluxo laminar.

2.7 Protocolo “E” de descelularização de corações de rato

Utilizando o biorreator para perfundir através de um átrio, injetaram-se soluções de PBS 1x por 30 min, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% em AD por 12h, AD por 15min, Triton X-100 1% em AD por 30 min e PBS 1x por 30 min. As amostras foram armazenadas em freezer.

2.8 Protocolo “F” de descelularização de corações de rato

Utilizando béquer e agitador magnético múltiplos corações de rato foram submetidos a sucessivos banhos de soluções de SDS 0,5% em AD por 48h, SDS 1% em AD por 24h, Triton X-100 1% em AD por 1h e PBS por 30 minutos. O protocolo foi adaptado de SESLÍ et al., 2018 ^[10] e as amostras foram armazenadas em PBS em geladeira.

2.9 Protocolo “G” de descelularização de corações de rato

Foi realizado o mesmo processo do protocolo “F”, porém as soluções utilizadas foram SDS 1% em AD por 72h, AD por 3h, Triton X-100 1% em AD por 24h e AD por 30 min. O protocolo foi adaptado de Al-Hejailan et al., 2022 ^[11] e as amostras foram armazenadas em PBS em geladeira.

2.10 Digestão da matriz extracelular descelularizada

MED obtida através do protocolo “G” foi submetida à digestão enzimática com pepsina nas concentrações de 1:10, 1:50 e 1:100 contra o peso da amostra em solução de ácido clorídrico (HCL) 0,1 M. A solução permaneceu em *shaker*

por 24h em 100 rotações por minuto a 37 °C. As amostras foram centrifugadas, o sobrenadante retirado e, em seguida, adicionado PBS 1x para o armazenamento em geladeira.

2.11 Cultura de células-tronco mesenquimais

CTM foram descongeladas e cultivadas em meio Dulbecco's modificado por Eagle (DMEM) de baixa glicose (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina com estreptomicina. As garrafas de cultura permaneceram em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Periodicamente, ocorreram trocas do meio de cultura e repiques com tripsina para fins de expansão da cultura.

2.12 Liofilização

As amostras de MED submetidas à digestão e o gel composto de 5% alginato de sódio e 5% gelatina com NTC 1,5 mg/ml (A/G/NTC 1,5) foram liofilizados pela central analítica da universidade federal de ciências da saúde de porto alegre (CA-UFCSPA) até o aspecto visual do material indicar níveis baixos de umidade.

2.13 Preparo do hidrogel

Os materiais A/G/NTC 1,5 liofilizado (Gel-NTC-L) e MEDC digerida e liofilizada (MEDDL) foram submetidos à luz UV por 30 minutos e reidratados com PBS em volume baseado na proporção entre o peso do Gel-NTC-L contra o volume do A/G/NTC 1,5 presente no tubo liofilizado. O hidrogel permaneceu em *shaker* a 100 RPM e 37°C *overnight*. Um hidrogel controle apenas com A/G 5% também foi produzido. A manipulação dos materiais foi realizada em capela de fluxo laminar e utilizou-se PBS estéril.

2.14 Bioimpressão 3D

CTM em cultura foram repicadas e pipetadas na seringa de bioimpressão contendo hidrogel ou gel controle A/G 5%, ambos a 37°C, na concentração de 1,5 milhão de células por ml. Foram bioimpresso construtos de aproximadamente 1,5 centímetros em uma placa de 12 poços rapidamente submetidos à reticulação química por cloreto de cálcio.

2.15 Histologia

Os corações nativo e descelularizados foram fixados em blocos de parafina, laminados e corados com hematoxilina e eosina.

3. Resultados

3.1 Dispersão dos nanotubos de carbono

O protocolo “A” se demonstrou ineficiente em realizar a dispersão dos NTC. Como demonstrado na figura 1a, o

material permaneceu em grumos que tendiam a se sedimentar logo que retirados do banho de ultrassom mesmo em concentrações 7,5 vezes menor que a pretendida (1,5 mg/ml). Assim, embora em concentrações maiores o aspecto da solução parece homogênea devido à característica opacidade dos NTC, ocorreu a formação de sedimento variando a concentração efetiva do material na solução. Qual o protocolo usado com maiores concentrações? Não encontrei na metodologia o que descreveu maior concentração (só o A com baixa e B e C descritos abaixo). Nas **soluções** de NTC com concentração de 1,5 mg/ml a formação de sedimento se tornou ainda mais evidente. Utilizando o protocolo “B” baseado na adição de Triton X-100 em concentrações inferiores a 0,05% não foi identificada uma melhora da dispersão (Figura 1b); demonstrando, portanto, a necessidade de um protocolo mais arrojado para a dispersão.

Devido a intenção de formar um hidrogel e baseado nos métodos utilizados no artigo de Zhou et al., 2014 optou-se por dispersar os NTC em AD e rapidamente adicionar A/G 5% a solução. Assim, após incubar o A/G/NTC 1,5 *overnight* em *shaker* 100 RPM a 37°C o resultado é um gel de aspecto homogêneo que foi liofilizado (Figura 1c). O Gel-NTC-L reidratado não apresentou a formação de sedimento.

3.2 Descelularização de corações de rato

Inicialmente, através do protocolo “E”, se fez uso do biorreator para perfundir as soluções de descelularização em um único coração por vez (devido à própria natureza do equipamento) (Figura 2a). O resultado mostrou ser inconsistente quando múltiplas aplicações do protocolo não levavam ao aspecto esbranquiçado/translúcido, mas a persistência da coloração avermelhada indicando a presença de células. Ademais, a baixa escalabilidade do processo ao produzir um coração descelularizado a cada 14h com alta manutenção durante o protocolo inviabilizaria a confecção do hidrogel frente que, após os processos de digestão e liofilização, apenas 1/100 do peso inicial resulta em MED.

A necessidade de realizar a descelularização em múltiplos corações ao mesmo tempo resultou na utilização de um béquer com agitador magnético em que o material seria agitado junto as soluções (Figura 2b). O protocolo “F”, adaptado de SESLÍ et al., 2018, foi capaz de produzir mais de 30 corações com aspecto esbranquiçado/translúcido em três dias. No entanto, a análise das lâminas histológicas demonstrou que, mesmo que a conservação da ME tenha sido satisfatória, existe a presença de núcleos e DNA fragmentado no material (Figura 3a e 3b); descartando, portanto, sua viabilidade vide a potencial rejeição do organismo ao hidrogel quando implantado.

O protocolo “G” estendeu os tempos e concentrações das soluções de descelularização (Figura 2b); adaptado de Al-Hejailan et al., 2022, no entanto, apresentou, também, núcleos na MED resultante. O protocolo foi utilizado para

confecção do hidrogel em função da natureza de prazo dos trabalhos de conclusão de curso e o resultado da histologia apenas se deu após os testes subsequentes de digestão, liofilização e bioimpressão do hidrogel.

3.3 Digestão e liofilização da matriz extracelular descelularizada

Para atingir com confiança a concentração de 1% MED no hidrogel, optou-se pela liofilização do material. Como passo necessário para formar o aditivo em pó, a digestão dos corações com HCL 0,1M por 24h foi empregada. Esse passo, no entanto, revelou um baixíssimo rendimento final; somado ao protocolo “G”, portanto, necessita-se de **1g equivalente a 4-6 corações para cada 1 ml de hidrogel**. Amostras de A/G/NTC 1,5, também, foram liofilizadas junto a MEDD (Figura 1c). Após a liofilização a MEDD formou um material compacto e quebradiço, facilmente esfarelado; enquanto o Gel-NTC-L apresentou o aspecto de isopor, menos rígido e compacto.

3.4 Hidrogel e Bioimpressão

A concentração pretendida de 1% MED forneceu um hidrogel com consistência a 37°C adequada para a bioimpressão. O construto formado pelo hidrogel apresentou a competência de reter sua forma do mesmo modo do gel controle; o aspecto preto opaco característico dos NTC, no entanto, não se distribuiu de maneira uniforme no hidrogel, pode-se perceber a tendência de acúmulo dos NTC na região central do construto em contrapartida de sua relativa ausência nos limites externos após 24h (Figura 4a). O construto reteve sua forma e tamanho por duas semanas em uma incubadora a 37°C 5% de CO₂ (Figura 4b).

4. Discussão

Para o estabelecimento do protocolo de produção do hidrogel, o primeiro grande desafio foi a dispersão de NTC. Os protocolos “A” e “B” apontaram que o ultrassom, mesmo aliado à ação de detergentes como Triton X-100, não superou a força das interações dipolo – dipolo induzido entre os NTC. O processo da bioimpressão expande o entendimento sobre o protocolo “C” ao demonstrar que os NTC são capazes de se deslocar pelo hidrogel criando zonas de maior e menor concentração. Assim, surge uma nova preocupação a ser analisada, pois a literatura aponta que concentrações altas de NTC como sendo consideravelmente citotóxicos ^[11]. Citar as concentrações citotóxicas para justificar a escolha de 1,5. Correlacionar a disseminação das CTM pelo construto com a concentração de NTC de modo 3D deve ser objeto de estudo em hidrogéis dessa natureza.

O segundo grande problema está no estabelecimento de um protocolo de descelularização escalável. A utilização de béquer com agitador magnético mostrou ser capaz de realizar

adequadamente a perfusão das soluções em vários corações simultaneamente. Embora o protocolo “F” e “G” não tenham sido suficientes para completamente descelularizar o tecido, com ajustes aumentando as concentrações e tempos provavelmente atingir-se-ia a redução dos níveis de DNA suficientes para utilização em implantes *in vivo*. A não alteração das soluções e tempos dos protocolos “F” e “G” frente às utilizadas pelos artigos de referência SESLÍ et al., 2018 e Al-HEJAILAN et al., 2022, respectivamente, se deu pelo cronograma do trabalho de conclusão de curso não permitir a realização de testes que confirmassem a preservação parcial ou integral das biomoléculas presentes na ME. Dessa forma, caso fosse atingida adequada descelularização, estas biomoléculas estariam, muito provavelmente, tão ou mais conservadas quanto estavam as MED’s testadas nos artigos de referência.

O baixo rendimento após o protocolo de digestão levanta a hipótese do uso de corações de animais maiores e em maior quantidade. Nesse contexto, corações de galinha podem ser uma alternativa promissora, baseado no seu peso, cerca de 50 vezes maior por corações comparado aos de rato; volume, adequado para não impossibilitar a difusão das soluções sem a pressão emitida em um biorreator e, por fim, facilidade de obtenção, vide ser barato e facilmente obtido comercialmente.

O hidrogel estabelecido apresentou viscosidade adequada para a CSI principalmente após a adição de MEDDL. A 37°C o material não ofereceu resistência desnecessária a extrusão ao passo que reteve sua estrutura tanto quanto o gel controle. Ao analisarmos nas lâminas histológicas uma baixa presença de núcleos e uma alta conservação das estruturas matriciais, podemos extrapolar que o protocolo posteriormente desenvolvido para a efetiva descelularização não será tão mais extenso e/ou com soluções tão mais concentradas ao ponto de significativamente variar a viscosidade do hidrogel ao final. Essa lógica pode-se aplicar, também, ao padrão de degradação do hidrogel demonstrando considerável conservação de estrutura por no mínimo duas semanas.

5. Conclusão

O trabalho aqui descrito não foi capaz de produzir o hidrogel baseado em A/G, NTC e MEDC em função do protocolo de dispersão dos nanotubos de carbono gerar agregados. No entanto, o estudo apresenta uma extensa lista

de tentativas e acertos que evidenciam as complexidades envolvidas na área. Para os NTC se estabeleceu o protocolo “C” capaz de formar um gel com relativa homogeneidade, mas se demonstrou, também, a atividade dos NTC de se deslocarem através do hidrogel de forma a se aglutinar. Como já citado no texto, pode-se ainda extrapolar que um protocolo efetivo de descelularização baseado em banhos mais longos e/ou concentrados comparados aos do protocolo “G” não levaria a significativas mudanças na CSI e degradabilidade do hidrogel.

Referências

- [1] www.paho.org. (n.d.). *Doenças cardiovasculares – OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde*. [online] Available at: <https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares#:~:text=As%20doen%C3%A7as%20cardiovasculares%20s%C3%A3o%20a>.
- [2] Ministério da Saúde. (n.d.). *Infarto*. [online] Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/i/infarto#:~:text=O%20Infarto%20Agudo%20do%20Mioc%C3%A1rdio>.
- [3] Frangogiannis, N. G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1841–1875). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>
- [4] Ceccato, T.L., Starbuck, R.B., Hall, J.K., Walker, C.J., Brown, T.E., Killgore, J.P., Anseth, K.S. and Leinwand, L.A. (2020). Defining the Cardiac Fibroblast Secretome in a Fibrotic Microenvironment. *Journal of the American Heart Association*, 9(19). Doi:<https://doi.org/10.1161/jaha.120.017025>.
- [5] Zhou, B. and Tian, R. (2018). Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 128(9), pp.3716–3726. Doi:<https://doi.org/10.1172/jci120849>.
- [6] Rastogi, P. and Kandasubramanian, B. (2019). Review on alginate-based hydrogel bio-printing for application in tissue engineering. *Biofabrication*. Doi:<https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab331e>.
- [7] Zhou, J., Chen, J., Sun, H., Qiu, X., Mou, Y., Liu, Z., Zhao, Y., Li, X., Han, Y., Duan, C., Tang, R., Wang, C., Zhong, W., Liu, J., Luo, Y., Mengqiu Xing, M. and Wang, C. (2014). Engineering the heart: Evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. *Scientific Reports*, [online] 4(1), p.3733. doi:<https://doi.org/10.1038/srep03733>.
- [8] Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.-K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I. and Taylor, D.A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, [online] 14(2), pp.213–221. Doi:<https://doi.org/10.1038/nm1684>.
- [9] Sun, Y., Liu, J., Xu, Z., Lin, X., Zhang, X., Li, L. and Li, Y. (2020). Matrix stiffness regulates myocardial differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Aging*, 13(2), pp.2231–2250. Doi:<https://doi.org/10.18632/aging.202244>.
- [10] SESLÍ, M., AKBAY, E. and ONUR, M.A. (2018). Decellularization of rat adipose tissue, diaphragm, and heart: a comparison of two decellularization methods. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY*, 42(6), pp.537–547. Doi:<https://doi.org/10.3906/biy-1807-109>.
- [11] Al-Hejailan, R., Weigel, T., Schürlein, S., Berger, C., Al-Mohanna, F. and Hansmann, J. (2022). Decellularization of Full Heart—Optimizing the Classical Sodium-Dodecyl-Sulfate-Based Decellularization Protocol. *Bioengineering*, 9(4), p.147. doi:<https://doi.org/10.3390/bioengineering9040147>.
- [12] Witkowska, M., Florek, E. and Mrówczyński, R. (2022). Assessment of Pristine Carbon Nanotubes Toxicity in Rodent Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), p.15343. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms232315343>.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O trabalho não foi capaz de produzir o hidrogel baseado em A/G, NTC e MEDC em função do protocolo de dispersão dos nanotubos de carbono ter mostrado agregados e o protocolo de descelularização empregado precisar de confirmação da remoção de maneira adequada dos núcleos e DNA do tecido. No entanto, o estudo apresenta uma extensa lista de tentativas e acertos que evidenciam a complexidade envolvida no estabelecimento do biogel. Para os NTC estabeleceu-se o protocolo “C” capaz de formar um gel com relativa homogeneidade e, também, evidenciou-se que os NTC são capazes de se deslocarem através do hidrogel de forma a se aglutinar. Pode-se, ainda, extrapolar que um protocolo efetivo de descelularização baseado em banhos mais longos e/ou concentrados comparados aos do protocolo “G” não levaria a significativas mudanças nos padrões físicos apresentados pelo hidrogel produzido. Dessa forma, a perspectiva é realizar testes de melhor dispersão dos nanotubos de carbono e avaliar se o protocolo de descelularização foi efetivo e, assim, realizar a análise de padrões inflamatórios, oxidativos e de contratilidade, planejados inicialmente no projeto.

REFERÊNCIAS

BUGGER, H.; PFEIL, K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 7, p. 165768, 12 mar. 2020.

FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 20 set. 2015.

HUSSEIN, K. H. et al. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 766–778, 1 out. 2016.

DE ISLA, N. et al. Introduction to tissue engineering and application for cartilage engineering. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 20, n. 3, p. 127–133, 2010.

KONSTANTINIDIS, K.; WHELAN, R. S.; KITSIS, R. N. Mechanisms of Cell Death in Heart Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 7, p. 1552–1562, jul. 2012.

NEGRI, V. et al. Carbon Nanotubes in Biomedicine. **Topics in Current Chemistry**, v. 378, n. 1, p. 15, 14 jan. 2020.

NICOTERA, P.; MELINO, G. Regulation of the apoptosis–necrosis switch. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2757–2765, abr. 2004.

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, 13 jan. 2008.

STAPENHORST, F. et al. Bioprinting: A promising approach for tissue regeneration. **Bioprinting**, v. 22, p. e00130, jun. 2021.

TALMAN, V.; RUSKOAHO, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 3, p. 563–581, 21 jun. 2016.

ZHOU, B.; TIAN, R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 9, p. 3716–3726, 20 ago. 2018.

ZHOU, J. et al. Engineering the heart: Evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 3733, 16 jan. 2014.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA IOP BIOFABRICATION

Article structure

Your article should follow the Introduction, Methods, Results and Discussion system, and usually consist of the following sections:

Title

The title should be concise, informative and meaningful to the whole readership of the journal. It should include key terms, to help make it more discoverable when people search online. Please avoid the use of long systemic names and non-standard or obscure abbreviations, acronyms or symbols.

Authors

Check the **peer review model** for the journal you are submitting to when preparing the PDF version of your manuscript. If **double-anonymous** then you will need to **anonymise your manuscript**. If **single-anonymous** then you need to list all authors' full names and institutions. Authors in all IOP journals have the option to include names in Chinese, Japanese or Korean characters in addition to the English name. The names will be displayed in parentheses after the English name. During the submission process, we recommend you supply **ORCID** identifiers for all authors to avoid ambiguity. If an author's current address is different from the address where the work was carried out, this should be explained in a footnote or acknowledgement. We encourage authors to make specific attributions of contribution and responsibility in the acknowledgements of the article, otherwise all co-authors will be taken to share full responsibility for all of the paper. Authors may wish to use a taxonomy such as **CRedit** to describe the contributions of each author. More guidance on authorship, including the responsibilities of the corresponding author, can be found **here**.

Keywords

When you submit an article, you will be asked to supply some keywords relevant to your work. If your article is accepted for publication, we will display these keywords on the published article, and they will be used to index your article, helping to make it more discoverable. When choosing keywords, think about the kinds of terms you would use when searching online for related articles.

Abstract

Your abstract should give readers a brief summary of your article. It should concisely describe the contents of your article, and include key terms (especially in the first two sentences, to increase search engine discoverability). It should be informative, accessible and not only indicate the general aims and scope of the article, but also state the methodology used, main results obtained and conclusions drawn. The abstract should be complete in itself; it should not contain undefined acronyms/abbreviations and no table numbers, figure numbers, references or equations should be referred to. Articles relying on clinical trials should quote the trial registration number at the end of the abstract. The abstract should be suitable for direct inclusion in abstracting services and should not normally be more than 300 words. If you submit an article with an abstract longer than 300 words, we may rescind the manuscript and ask you to re-write it. Some journals ask for abstracts to follow a particular structure. Check the **instructions for specific journals** to see if you need to submit a structured abstract.

Introduction

This should be concise and describe the nature of the problem under investigation and its background. It should also set your work in the context of previous research, citing relevant references. Introductions should expand on highly specialised terms and abbreviations used in the article to make it accessible for readers.

Method

This section should provide sufficient details of the experiment, simulation, statistical test or analysis carried out to generate the results such that the method can be repeated by another researcher and the results reproduced.

Results

The results section should detail the main findings and outcomes of your study. You should use tables only to improve conciseness or where the information cannot be given satisfactorily in other ways such as histograms or graphs. Tables should be numbered serially and referred to in the text by number (table 1, etc.). Each table should have an explanatory caption which should be as concise as possible.

Discussion

This should discuss the significance of the results and compare them with previous work using relevant references.

Conclusion

This section should be used to highlight the novelty and significance of the work, and any plans for future relevant work.

Acknowledgements

Check the **peer review model** for the journal you are submitting to when preparing the PDF version of your manuscript. If **double-anonymous** then do not include any author names or institution information in the Acknowledgements section of your manuscript. Author names and Funding information should be removed and can be re-added later in the peer review process. For **single-anonymous** please include an acknowledgements section before the References section in your PDF manuscript.

During the submission process all authors and co-authors are required to disclose any potential conflict(s) of interest when submitting an article (e.g. employment, consulting fees, research contracts, stock ownership, patent licences, honoraria, advisory affiliations, etc). This information should be included in an acknowledgements section at the end of the manuscript (before the references section). All sources of financial support for the project **must** also be disclosed in the acknowledgements section. The name of the funding agency and the grant number should be given, for example: *This work was partially funded by the National Institutes of Health (NIH) through a National Cancer Institute grant R21CA141833.* When completing the online submission form, we also ask you to select funders and provide grant numbers in order to help you meet your funder requirements. We encourage authors to use the acknowledgements section of the article to make specific attributions of author contribution and responsibility, otherwise all co-authors will be taken to share full responsibility for all of the paper.

Ethical statement

Some articles will require an **ethical statement**, particularly those that are reporting research involving humans or animals. This should state if the research was approved by any ethical committee, and which national or international standards were complied with.

References

This section should be used to list all relevant work. **More information on referencing.** However, check the **peer review model** for the journal you are submitting to. If **double-anonymous** then when referring to thesis/unpublished work, please avoid

identifying information. You should include non-identifiable information e.g. journal name, year etc...

If you need more information or guidance about any of the above then please **contact the journal** to which you are submitting.