

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

Ana Elisa Antunes dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS 3D DE CARDIOMIÓCITOS EM
SUBSTRATOS FORMADOS POR NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE
ASSOCIADAS OU NÃO AO URUCUM**

Belo Horizonte

2020

Ana Elisa Antunes dos Santos

**CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS 3D DE CARDIOMIÓCITOS EM
SUBSTRATOS FORMADOS POR NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE
ASSOCIADAS OU NÃO AO URUCUM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestrado em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Belo Horizonte
2020

043

Santos, Ana Elisa Antunes dos.

Caracterização de culturas 3d de cardiomiócitos em substratos formados por nanofibras de acetato de celulose associadas ou não ao Urucum [manuscrito] / Ana Elisa Antunes dos Santos. – 2020.

65 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana de Oliveira Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Miócitos Cardíacos. 3. Celulose. 4. Bixaceae. 5. Engenharia Tecidual. I. Andrade, Luciana de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

ANA ELISA ANTUNES DOS SANTOS

328/2020
entrada
1º/2018
2018699037

Às quatorze horas do dia 27 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS 3D DE CARDIOMIÓCITOS EM SUBSTRATOS FORMADOS POR NANOFIBRAS DE ACETATO DE CELULOSE ASSOCIADAS OU NÃO AO URUCUM**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luciana de Oliveira Andrade**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Luciana de Oliveira Andrade	UFMG	APROVADA
Dra. Gregory Thomas Kitten	UFMG	Aprovada
Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.**

Drª. Luciana de Oliveira Andrade (Orientadora)

Ph.D. Gregory Thomas Kitten

Drª. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Vanessa Pinho da Silva
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular ICB/UFMG

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Luciana de Oliveira Andrade pela orientação, confiança e por contribuir imensamente na minha formação científica. Obrigada por acreditar no meu esforço e sempre me apoiar e me incentivar.

À Prof^ª. Dr^ª. Aline Bruna da Silva e à Prof^ª. Dr^ª. Roberta Ferreira Viana, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG), pelo apoio e colaboração durante a realização desse projeto.

Ao Laboratório de Biomateriais do CEFET-MG, pela ajuda na confecção das membranas de nanofibras.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular: Anny, Carol, Jorge, Luísa, Natália e Raí, e aos amigos do Laboratório de Genes Inflamatórios: Helianna, Brenner, Isadora, Alice, Giovanni e Sérgio. Agradeço pelo amizade e pelos ensinamentos, que sempre deixaram a jornada mais agradável.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, pelo auxílio com as imagens de microscopia eletrônica.

Ao CDTN, em especial à Lorraine e ao Omar, por ajudar tão prontamente com a irradiação das membranas.

Agradeço também ao CEBIO, por sempre conseguir os animais que precisava.

À Capes, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Morfologia, todos os professores e funcionários.

Aos meus pais, Fátima e Antônio, pelo apoio e carinho.

Ao meu irmão, Vinícius, por sempre estar ao meu lado.

Aos meus familiares que sempre torceram e torcem pelo meu sucesso.

Aos amigos de bases por toda assistência durante o curso.

À todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

RESUMO

O infarto do miocárdio é uma das principais causas de morte no mundo. O resultado clínico, em alguns casos, é a substituição do tecido nativo por tecido cicatricial levando a perda de função naquele local. A engenharia de tecidos aplica os princípios da engenharia de materiais e das ciências da vida para produção de substitutos biológicos em medicina regenerativa, entre outros. O desenvolvimento da engenharia de tecidos cardíaca pode levar a produção de substitutos biológicos capazes de restaurar a função do miocárdio danificado. A criação de *scaffolds* bioativos, os quais são matrizes tridimensionais capazes de permitir a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, permitiram o cultivo celular tridimensional para a produção de órgãos e tecidos em vários tipos de matrizes. Nanofibras de acetato de celulose são uma excelente opção para a utilização como *scaffolds*, devido a sua biocompatibilidade e seu baixo custo. As nanofibras mimetizam a matriz extracelular nativa, permitem a regulação de propriedades mecânicas e possuem uma grande área superficial, possibilitando uma melhor adesão e proliferação celular. A fim de otimizar as nanofibras de acetato de celulose, foi feita a incorporação de bixina, uma molécula bioativa derivada da semente de urucum. Nesse sentido, pretendemos testar o cultivo celular de cardiomiócitos de linhagem e primários em nanofibras de acetato de celulose funcionalizados ou não com extrato bruto de urucum, o que seria o primeiro passo para a produção de um substituto cardíaco. Através de análises *in vitro* foi possível demonstrar que as membranas de nanofibras de acetato de celulose incorporadas ou não ao urucum apresentaram biocompatibilidade com células H9c2, mioblastos cardíacos, favorecendo a adesão e a viabilidade celular. Além disso, as células H9c2 cultivadas nas nanofibras apresentaram morfologia semelhante a miócitos cardíacos em meio proliferativo. Ademais, quando induzidas a diferenciação, essas células não apresentaram mudança de formato, o que poderia indicar um processo de diferenciação nessas matrizes sem a necessidade da indução da diferenciação. Por fim, as membranas de nanofibras de acetato de celulose incorporadas ou não ao urucum apresentaram ser uma boa matriz para a cultura de cardiomiócitos primários.

Palavras-chave: Cardiomiócitos. Acetato de celulose. Urucum. Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Myocardial infarction is one of the leading causes of death worldwide. The clinical result, in some cases, is the replacement of native tissue with scar tissue leading to loss of function at that location. Tissue engineering applies the principles of materials engineering and life sciences to the production of biological substitutes in regenerative medicine, among others. The development of cardiac tissue engineering may lead to the production of biological substitutes capable of restoring the function of the damaged myocardium. The creation of bioactive scaffolds, which are three-dimensional matrices capable of allowing cell adhesion, migration, proliferation and differentiation, allowed three-dimensional cell culture for the production of organs and tissues in various types of matrices. Cellulose acetate nanofibers are an excellent option for use as scaffolds, due to their biocompatibility and low cost. Nanofibers mimic the native extracellular matrix, allow the regulation of mechanical properties and have a large surface area, enabling better adhesion and cell proliferation. In order to optimize the cellulose acetate nanofibers, bixin, a bioactive molecule derived from annatto seed, was incorporated. In this sense, we intend to test the cell culture of lineage and primary cardiomyocytes in cellulose acetate nanofibers functionalized or not with crude annatto extract, which would be the first step towards the production of a cardiac substitute. Through *in vitro* analyzes it was possible to demonstrate that cellulose acetate nanofiber membranes incorporated or not to annatto showed biocompatibility with H9c2 cells, cardiac myoblasts, favoring cell adhesion and viability. In addition, the H9c2 cells cultured in the nanofibers showed morphology similar to cardiac myocytes in a proliferative medium. Furthermore, when differentiation was induced, these cells did not change in shape, which could indicate a differentiation process in these matrices without the need to induce differentiation. Finally, cellulose acetate nanofiber membranes incorporated or not into annatto proved to be a good matrix for the culture of primary cardiomyocytes.

Keywords: Cardiomyocytes. Cellulose acetate. Annatto. Tissue engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do equipamento utilizado na eletrofiação.....	17
Figura 2 – Imagem da folha e semente do urucum e a estrutura molecular da bixina...19	
Figura 3 – Ilustração esquemática da produção do extrato de urucum e a impregnação do polímero de acetato de celulose.....	23
Figura 4 – Esquema do processo de eletrofiação para as nanofibras de acetato de celulose incorporadas com extrato de urucum.....	24
Figura 5 – Espectro de absorbância do extrato bruto de urucum através da técnica de UV-vis.....	31
Figura 6 – Imagens representativas de nanofibras de acetato de celulose e acetato de celulose com urucum vistas ao microscópio eletrônico de varredura.....	33
Figura 7 – Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio obtidos de nanofibras de acetato de celulose com urucum.....	34
Figura 8 – Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular por ensaio de MTT das células H9c2 cultivadas na placa de cultura e nas nanofibras de acetato de celulose e acetato de celulose com urucum após 1, 2 e 7 dias.....	36
Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando a adesão celular às nanofibras através de prolongamentos citoplasmáticos.....	37
Figura 10 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro após 1, 2 e 7 dias.....	39
Figura 11 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre nanofibras de acetato de celulose após 1, 2 e 7 dias.....	40
Figura 12 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre nanofibras de acetato de celulose com urucum após 1, 2 e 7 dias.....	41
Figura 13 – Avaliação da diferenciação de células H9c2 em meio de crescimento ou de diferenciação através de imagens de microscopia de campo claro e qPCR.....	43
Figura 14 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro, nanofibras	

de acetato de celulose e nanofibras de acetato de celulose com urucum após indução da diferenciação.....	44
Figura 15 – Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular por ensaio de MTT dos cardiomiócitos primários derivados de neonatos de camundongos BALB/c cultivados na placa de cultura, nas nanofibras e na matriz de colágeno após 7 dias.....	46
Figura 16 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico dos miócitos cardíacos primários cultivadas sobre lamínulas de vidro, nanofibras de acetato de celulose e nanofibras de acetato de celulose com urucum com e sem revestimento de fibronectina.....	47
Figura 17 – Vista do topo e corte transversal dos cardiomiócitos aderidos a placa de cultura, as nanofibras de acetato de celulose com e sem urucum e a matriz de colágeno após 7 dias de cultivo através do Microscópio ApoTome.....	49
Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando cardiomiócitos primários cultivados em diferentes substratos após 7 dias de cultura, em menor aumento.....	50
Figura 19 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando cardiomiócitos primários cultivados em diferentes substratos após 7 dias de cultura, em maior aumento.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acetato de Celulose

ACU – Acetato de Celulose com Urucum

CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CEFET-MG – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

CM – Cardiomiócitos

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – *deoxyribonucleic acid*

H9C2 – Mioblasto do coração de *Rattus norvegicus*

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

L-15 – meio Leibovitz

PBS – *Phosphate Buff*

MEC - Matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mL, µl - Mililitro, microlitro

MTT - Tetrazólio3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS+/+ – *Phosphate Buffered Saline* enriquecido com cálcio e magnésio

qPCR – *Polymerase Chain Reaction* quantitativa

RNA – *ribonucleic acid*

SFB – Soro Fetal Bovino

T.A. – temperatura ambiente

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Infarto do miocárdio e a engenharia de tecidos.....	12
1.2	Nanofibra de Acetato de Celulose.....	15
1.3	Óleos Essenciais.....	18
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivo Geral.....	21
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Produção das nanofibras de acetato de celulose e preparação para cultura de células.....	22
3.2	Caracterização das nanofibras por Ressonância Nuclear Magnética e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
3.3	Cultura Celular.....	25
3.4	Viabilidade e Proliferação Celular – MTT.....	26
3.5	Análise morfológica da cultura celular através da marcação do citoesqueleto de actina.....	27
3.6	Análise morfológica da cultura celular através da Microscopia Eletrônica de Varredura.....	28
3.7	Avaliação da diferenciação dos mioblastos cardíacos h9c2 através de ensaios fluorescência e PCRq.....	29
3.8	Análise Estatística.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Caracterização do extrato bruto de urucum e das nanofibras de acetato de celulose associada ou não ao urucum.....	31
4.2	Avaliação da viabilidade celular e proliferação de mioblastos cardíacos nas nanofibras de AC e AC/Urucum.....	35
4.3	Caracterização por Microscopia eletrônica de varredura das culturas de células H9c2 cultivadas sobre os diferentes substratos.....	36
4.4	Avaliação morfológica das células H9c2 cultivadas sobre os diferentes substratos.....	38

4.5	Avaliação da capacidade de diferenciação em cardiomiócitos de células H9c2 cultivadas sobre nanofibras de AC e ACU.....	42
4.6	Avaliação da proliferação e viabilidade celular das membranas de nanofibras colonizadas com miócitos cardíacos primários.....	45
4.7	Avaliação morfológica de miócitos cardíacos primários cultivados nas nanofibras de AC e ACU através da marcação do filamento de actina.....	46
4.8	Caracterização das miócitos cardíacos primários cultivados nas nanofibras de AC e ACU por MEV.....	49
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infarto do miocárdio e a engenharia de tecidos

As doenças cardiovasculares representam um conjunto de enfermidades relacionadas ao coração e vasos sanguíneos, tais como aterosclerose, insuficiência cardíaca, doenças coronarianas, dentre outras. Segundo a organização mundial da saúde (WHO, 2017), 17,7 milhões de pessoas morrem ao ano devido às doenças cardiovasculares, representando cerca de 31% das mortes registradas no mundo. Essas enfermidades podem culminar com o infarto agudo do miocárdio (IAM), o qual se caracteriza pela morte do tecido cardíaco, principalmente de cardiomiócitos.

O termo infarto do miocárdio se refere a morte celular de miócitos cardíacos causada por isquemia, que é o resultado de um desequilíbrio de perfusão entre oferta e demanda. O IAM é um evento primariamente resultante da ruptura ou erosão de uma placa aterosclerótica, levando a formação de um trombo com subsequente oclusão completa do vaso e morte celular miocárdica por hipóxia (BADIMON; PADRÓ; VILAHUR, 2012). A aterosclerose coronariana é uma doença crônica com períodos estáveis e instáveis. Durante os períodos instáveis com inflamação ativada na parede vascular, os pacientes podem desenvolver um infarto do miocárdio. O infarto do miocárdio pode ser um evento menor em uma doença crônica ao longo da vida, pode até mesmo não ser detectado, mas também pode ser um grande evento catastrófico que leva à morte súbita ou a um quadro hemodinâmico grave (THYGESEN; ALPERT; WHITE, 2007).

O IAM resulta na migração de macrófagos, monócitos e neutrófilos para a zona do infarto, que inicia a sinalização intracelular e ativação neuro-hormonal, começando um processo inflamatório (SUTTON; SHARPE, 2000). Após o início da isquemia miocárdica, a morte celular não é imediata, mas sim como uma onda de necrose que começa no subendocárdio e avança em sentido epicárdico e progride em função do tempo (GREULICH et al., 2019). Demora várias horas até que a necrose miocárdica possa ser identificada por exame post-mortem macroscópico ou microscópico. A necrose completa de todas as células do miocárdio em risco requer entre 2 a 4 horas ou mais, dependendo da presença de circulação colateral na zona isquêmica, oclusão arterial coronariana persistente ou intermitente, sensibilidade dos miócitos à isquemia, pré-condicionamento ou, demanda individual por oxigênio e nutrientes do miocárdio (THYGESEN; ALPERT; WHITE, 2007).

O resultado clínico, em alguns casos, é a substituição do tecido nativo por tecido cicatricial levando a perda de função naquele local (CLEUTJENS et al., 1999). A necrose miocítica e o consequente aumento da carga desencadeiam uma cascata de processos bioquímicos de sinalização intracelular que iniciam e subseqüentemente modulam alterações reparadoras, que incluem dilatação, hipertrofia e formação de uma discreta cicatriz de colágeno (SUTTON; SHARPE, 2000). O tamanho, localização, composição, estrutura e propriedades mecânicas do tecido cicatricial são todos determinantes críticos do destino dos pacientes que sobrevivem ao infarto inicial. A depressão inicial da função da bomba ventricular esquerda depende fortemente do tamanho do infarto, assim como o risco de longo prazo do remodelamento ventricular esquerdo, que comumente leva à insuficiência cardíaca após o infarto, no entanto, mesmo infartos de tamanho idêntico em locais diferentes têm prognósticos diferentes (RICHARDSON et al., 2015).

Embora o tecido cicatricial formado mantenha o órgão intacto, ele não possui capacidade de contração. Assim, a estrutura do tecido cicatricial tem importância central na determinação da função e remodelação do coração. No entanto, o desenvolvimento de terapias que melhorem a função cardíaca ou limitem a remodelação, modificando a estrutura da cicatriz tem se mostrado notavelmente difícil, visto que os tratamentos atuais não conseguem devolver a função tecidual nativa (Law

Entre as terapias atuais, a terapia de reperfusão tem como objetivo o restabelecimento rápido do fluxo sanguíneo ao miocárdio, com objetivo de diminuir o tamanho da área infartada, preservar a função ventricular e diminuir a mortalidade a curto e a longo prazo (LI et al., 2016). As terapias de reperfusão são tempo-dependente. Dessa forma, a recanalização da artéria ocluída deve ser feita o mais precocemente possível, para proporcionar uma nutrição miocárdica adequada e assim limitar a extensão da necrose miocárdica (VOGEL et al., 2019).

A intervenção clínica ideal evitaria a formação de cicatriz ou simplesmente substituiria o tecido cicatrizado formado por tecido muscular cardíaco funcional. Em uma primeira abordagem a essa terapia, os pesquisadores usaram injeções de novas células em áreas danificadas do tecido cardíaco. Estes estudos tiveram sucesso limitado devido à morte celular, saída de células do coração e fraca integração celular com o tecido cardíaco receptor. Tratamentos alternativos através do uso de células pluripotentes induzidas para o tratamento dessas doenças cardíacas tem se mostrado promissor, mas encontra-se ainda muito incipiente (MUSUNURU et al., 2018). Dessa forma, estudos complementares, relacionados à área de

engenharia de tecidos cardíaca se faz necessária e pode levar a novos tratamentos mais eficazes.

Segundo Langer e Vacanti (1993), a engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função tecidual.

O termo “engenharia de tecido do miocárdico” refere-se, num sentido amplo, à aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos cardíacos normais e patológicos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido. Um paradigma de engenharia de tecidos para o uso de células cardíacas envolve o uso coordenado de estruturas de biomateriais, fornecendo um modelo estrutural para a adesão das células e a formação de tecidos, sinais regulatórios bioquímicos e físicos (LAW et. al, 2017; ZHAO et. al, 2017).

Sabe-se que as células têm certos requisitos para sua sobrevivência em qualquer ambiente. Muitos deles se relacionam com a difusão de substâncias disponíveis, com nutrientes e oxigênio fluindo para as células enquanto as moléculas de resíduos e sinalização são removidas. No entanto, outro requisito menos conhecido, mas essencial para quase todas as células, é a necessidade de um substrato físico específico. A maioria dos tipos de células, incluindo os miócitos cardíacos, só se desenvolve quando ligada a uma superfície de suporte adequada. O propósito da engenharia de tecidos é, então, criar um ambiente celular viável através do uso de materiais biologicamente aceitáveis (NOVAKOVIC; ESCHENHAGEN; MUMMERY, 2014).

A aplicação de biomateriais na engenharia de tecidos é predominantemente na forma de *scaffolds*, os quais não apenas fornecem suporte físico às células, mas sua composição e estrutura também fornecem importantes estímulos bioquímicos e biomecânicos. Estes estímulos são capazes de guiar os processos celulares fundamentais, como adesão, migração, proliferação e diferenciação (LAW et. al, 2017; ZHAO et. al, 2017).

Os *scaffolds* devem mimetizar a arquitetura da MEC nativa, proporcionando resistência mecânica, como rigidez e elasticidade, semelhante ao tecido nativo. Além disso, eles devem permitir a remodelação por células para restaurar a estrutura do tecido. Assim como as células

são influenciadas por proteínas extracelulares, como o colágeno, elas também são capazes de responder a estruturas artificiais na mesma faixa de tamanho (CURTIS; RUSSELL, 2009).

Estudos demonstraram que miócitos cardíacos apresentaram adesão e contração espontânea em fibras nanométricas de materiais sintéticos. Projeções na escala do micrômetro demonstraram causar alterações na forma dos miócitos cardíacos e remodelação das proteínas celulares responsáveis pela fixação do substrato (CURTIS; RUSSELL, 2009). Forças mecânicas, geradas por contração celular ou detectadas por fontes externas, têm efeitos pronunciados na diferenciação, crescimento e sobrevivência das células miocárdicas (LAW et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Para a seleção e estrutura do material, primeiramente, é importante definir o melhor material (sintético, natural ou híbrido) para aplicações cardíacas. Algumas propriedades desejadas para estes materiais são taxas de degradação ajustáveis, boa porosidade, biocompatibilidade, hemocompatibilidade, boa adesão celular, propriedades mecânicas e elásticas compatíveis com o coração, e que o material permite um acoplamento elétrico entre as células e entre o andaime e o tecido nativo. Em segundo lugar, é necessário escolher a técnica para produzir o substrato em que as células vão ser semeadas antes da implantação (RODRIGUES et al., 2018).

Muitos tipos diferentes de materiais foram considerados para a engenharia de tecidos cardíacos. De acordo com sua origem, podemos distinguir: materiais de origem biológica, tecidos descelularizados e materiais sintéticos. Os materiais naturais incluem colágeno, gelatina, fibrina, seda e alginato; e materiais sintéticos incluem poliuretano (PU), ácido polilactídeo (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) ou poliglicerolsebacato (PGS), entre outros (ARNAL-PASTOR et al., 2013).

1.2 Nanofibra de Acetato de Celulose

A seleção do material adequado é fundamental para produzir um *scaffold* que mimetize a arquitetura e a funcionalidade da MEC do tecido nativo. Alguns requisitos são importantes na seleção do material, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, microestrutura, morfologia, propriedades mecânicas e versatilidade. Cumprindo a maioria dos requisitos mencionados acima, o colágeno é um biomaterial ideal para aplicações de engenharia de tecidos cardíaca e tem sido um dos biomateriais comumente usados para este fim, segundo Arnal-Pastor e colaboradores (2013). Contudo, a dificuldade e os altos custos relacionados a

extração e purificação desses polímeros naturais levou a utilização de polímeros sintéticos, que apresentam um preço mais acessível e permitem sua modulação, como alterações da resistência mecânica e flexibilidade (STRATTON et al., 2016; LAW et al., 2017; ZHAO et al., 2017).

Existem várias técnicas para produção de *scaffolds*, as quais resultam em substratos com diferentes formatos e características, tais como esponjas, hidrogéis, nanofibras e microesferas. Esses *scaffolds* podem ser ainda produzidos pela descelularização tecidual ou impressão 3D. A produção dessa variedade de matrizes tridimensionais permitiu uma ampla gama de aplicações, desde regeneração óssea, regeneração nervosa, regeneração muscular, regeneração de tendões, ligamentos e muito mais. (OLATUNJI, 2015; STRATTON et al., 2016)

Dentre as técnicas de produção de *scaffolds* a eletrofiação é uma técnica versátil e simples que fabrica estruturas fibrosas, de diâmetro de escala micro a nanométrica, com áreas superficiais elevadas, essas fibras são frequentemente chamadas de 'nanofibras' (RIM; SHIN; SHIN, 2013). Esse processo emprega forças eletrostáticas para produzir fibras poliméricas nas quais vários parâmetros como tensão aplicada, concentração de polímero, solvente, distância entre pontas e diâmetro da agulha influenciam a qualidade das nanofibras. A facilidade de controlar a estrutura tridimensional e as propriedades químicas e físicas das fibras formadas permitem várias aplicações desses materiais em engenharia de tecidos, uma vez que a maioria dos tecidos e órgãos, incluindo osso, pele, tendão e cartilagem, é composta por estruturas fibrosas altamente organizadas (SUNDARAMURTHI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2014; RIM; SHIN; SHIN, 2013).

O processamento por *electrospinning* consiste em colocar uma solução polimérica em uma seringa ligada a uma agulha e aplicar a essa, um potencial elétrico. Quando a força eletrostática ultrapassa a tensão superficial da solução polimérica, cone de Taylor, é criada uma instabilidade que produz jatos de fibras que são depositadas em um coletor na forma de nanofibras. A formação das fibras ocorre quando as propriedades intrínsecas da solução polimérica e os parâmetros de processamento são otimizados (MCCULLEN, et. al, 2007).

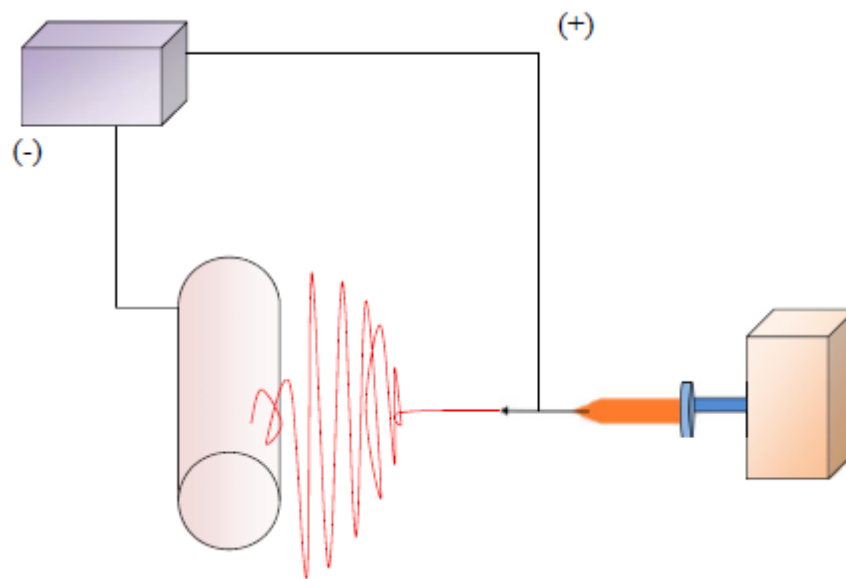


Figura 1 – Esquema do equipamento utilizado na eletrospiação.
Fonte: Adaptado de Rezaei, Nasirpour e Fathi (2015).

Novotna e colaboradores (2013) avaliaram dois tipos de materiais à base de celulose, que foram preparados e testados para uso potencial em engenharia de tecidos. Os materiais foram funcionalizados com arginina ou quitosana e semeados com células musculares lisas vasculares (CMLV). A funcionalização do material com arginina e quitosana melhorou ainda mais a maturação fenotípica das CMLV. A quitosana também melhorou a adesão e o crescimento dessas células.

O acetato de celulose (AC) é um polímero natural que possui boa solubilidade e pode ser facilmente controlado morfologicamente. Essas propriedades tornam as fibras de acetato de celulose úteis em uma ampla gama de áreas, como filtração, aplicações biomédicas e roupas de proteção (JANG e colaboradores, 2014). As nanofibras de AC (NAC) são muito interessantes em aplicações biomédicas, pois além de ser um material biocompatível sua fabricação pelo processo de eletrospiação é relativamente fácil (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013).

Du e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade, proliferação e diferenciação da linhagem PC12 de rato e células-tronco neurais humanas em quitosana, acetato de celulose (AC) e nanofibras eletrofuncionais derivadas de polietersulfona (PES). A quitosana que possui uma superfície mais hidrofílica e carregada positivamente que o AC, proporcionou resultados melhores em relação a viabilidade e diferenciação das células nervosas. O AC usado neste estudo foi um excelente material estrutural, mas por não possuir grupos amino

encontrados na maioria dos glicosaminoglicanos de mamíferos e outros polissacarídeos, apresentou um resultado inferior a quitosana.

Segundo Konwarh e colaboradores (2013), é pertinente mencionar que, embora haja uma infinidade de relatórios sobre a escolha apropriada de celulose para aplicações biomédicas, a aplicação de NAC eletrofuncionais para engenharia de tecidos ainda não está bem estabelecida na literatura (KONWARH; KARAK; MISRA, 2013). Uma busca no banco de dados PubMed retornou 140 referências para a consulta de pesquisa 'nanofibras acetato de celulose' em 13 de janeiro de 2020. É importante mencionar ainda que destes, somente 23 são relacionados à engenharia de tecidos.

Estudos anteriores demonstraram a importância da estrutura em nanoescala e de sua anisotropia em polímeros sintéticos para o desenvolvimento de matrizes cardíacas. Estudos de nanofibras de acetato de celulose para aplicações em engenharia de tecidos cardíaca ainda são escassos. A aplicação de nanofibras de acetato de celulose em engenharia cardíaca pode ser uma opção mais econômica que os polímeros sintéticos já utilizados, e ter um possível potencial de crescimento e diferenciação dessas células.

1.3 Óleos Essenciais

Recentemente, óleos essenciais extraídos de plantas receberam muita atenção devido a suas propriedades regenerativas e bactericidas. Diferentes pesquisas demonstraram que a incorporação de óleos essenciais em biopolímeros aumenta a atividade antimicrobiana na aplicação de *scaffolds*.

Liakos e colaboradores (2017) criaram NACs recobertas de óleos essenciais de alecrim e orégano pela técnica de eletrofiação, para aplicações biomédicas, como curativo e filtro de agentes patogênicos. Descobriu-se que essas nanofibras funcionalizadas apresentaram boas propriedades antimicrobianas contra as espécies microbianas comuns, frequentemente encontradas em infecções hospitalares, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*.

O urucum é o fruto do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.) nativo da América do Sul. As sementes do urucum são consideradas antibióticas de caráter medicinal, atuando como anti-inflamatório para contusões e feridas, tendo também uso na cura de bronquites e queimaduras externas (RIVERA-MADRID et al., 2016).

Além disso, o urucum tem uma longa história de uso na indústria alimentícia como corante natural. O principal componente de coloração do urucum é a bixina, que é o éster monometílico de um cis-apocarotenóide dicarboxílico com um total de 11 ligações duplas (SCOTTER, 2009). A bixina foi a primeira cis-caratenoide a ser isolada de uma fonte natural, e é graças a ela que o urucum exibe atividade antioxidante de quebra de cadeia, eliminando os radicais livres (RIVERA-MADRID et al., 2016) (PACHECO et al., 2018).

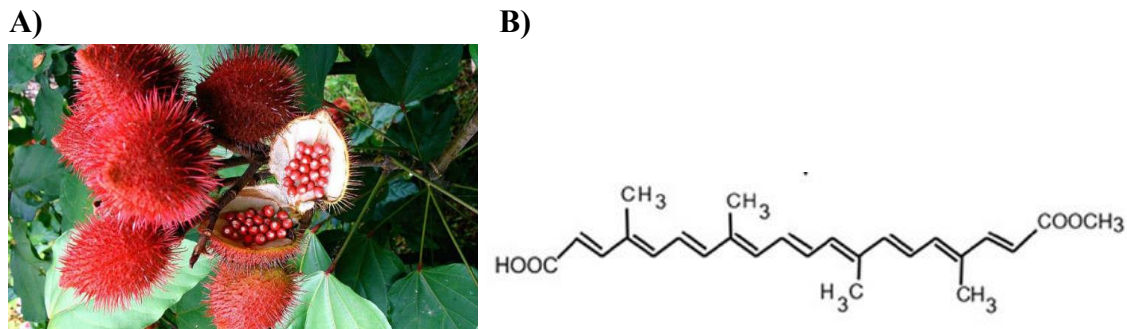


Figura 2 – (A) imagem da folha e semente de urucum. (B) Estrutura molecular da bixina, principal carotenoide presente nas sementes de urucum. Fonte: google e RIVERA-MADRID (2016)

Atualmente, muitos procedimentos cirúrgicos minimamente invasivo no coração, como angioplastia coronariana e cateter, são realizados todos os dias. Embora essas técnicas sejam seguras, uma grande variedade de complicações sistêmicas e locais associadas a esses procedimentos foram relatadas (Muñoz et al., 2001). Estudos de Nof e Epstein (2012) e Nielsen, Gerdes e Varma (2015) focaram nas complicações causadas por infecções após o implante cardíaco, que apesar de serem raras, representam um grande risco para o paciente, causando morbidade significativa, aumento da mortalidade e aumento considerável dos custos de assistência médica.

Segundo os estudos de Boden, Eagle e Granger (2007), pacientes que foram submetidos a procedimentos como revascularização miocárdica, bombeamento com balão intra-aórtico e diálise, desenvolveram infecções graves comumente causadas por *Staphylococcus aureus*, que foram associadas ao aumento de cinco vezes a taxa de mortalidade após o infarto do miocárdio.

Um grande número de estudos mostraram que a bixina exibe atividades antibacterianas e antifúngicas (STOHS, 2013) (TAHAM; CABRAL; BARROZO, 2015). Fleischer (2013) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos etílicos de urucum, utilizando a folha e a semente, em sete microorganismos comuns: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

pyogenes, *Salmonellatyphi*, *Escherichicoli*, *Candidaalbicans*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato de urucum inibiu o crescimento de ambos os fungos e bactérias.

Até agora, a combinação de extrato de urucum e polímeros foi relatada em apenas dois trabalhos, De Souza e colaboradores (2016) e Pagnan (2017), que focaram no desenvolvimento de estabilizadores para fotodegradação em polímeros. No entanto, não há relato sobre a incorporação do extrato de urucum em micro ou nanofibras

Apesar da importância de infecções em pacientes que sofreram intervenção cirúrgica após o infarto do miocárdio, ainda há poucos estudos sobre o assunto, principalmente relacionados à alternativas para a minimização dessas ocorrências. Dessa forma, a incorporação de moléculas bioativas derivadas do urucum pode auxiliar na diminuição de contaminação na cultura celular e ter aplicações dentro da medicina regenerativa cardíaca devido a suas propriedades antimicrobianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer e avaliar a eficiência do cultivo de miócitos cardíacos de linhagem e primários nas nanofibras de acetato de celulose e nanofibras de acetato de celulose com urucum.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer o cultivo de miócitos cardíacos de linhagem e primários nos diferentes substratos tridimensionais;
- Caracterizar fenotipicamente as células cultivadas nos diferentes substratos por microscopia de fluorescência e eletrônica, comparado com culturas bidimensionais;
- Avaliar e mensurar a biocompatibilidade in vitro das diferentes matrizes tridimensionais, através de ensaios de viabilidade celular, comparado com culturas bidimensionais;
- Avaliar a expressão e presença de marcadores cardíacos específicos através de PCR em tempo real e por microscopia de fluorescência;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produção das nanofibras de acetato de celulose e preparação para cultura de células

As nanofibras foram preparadas pela técnica de eletrospinning. O processo consiste em aplicar uma alta tensão em uma solução polimérica. A solução polimérica de acetato de celulose foi produzida utilizando acetato de celulose (AC, Mn: 30,000), e os solventes acetona e N,N-dimetilformamida (DMF). A solução foi preparada com 12% m/v de AC em uma mistura de solventes de acetona e DMF (3:1, v/v), por agitação magnética em velocidade média durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Para a fabricação da solução de AC contendo moléculas bioativas do urucum (ACU) foi preparado um extrato de urucum, com sementes de urucum frescas. O urucum foi coletado em Sete Lagoas, MG, Brasil, durante os meses de junho e julho de 2018. As sementes foram retiradas e lavadas com água, e posteriormente moídas. O pó foi levado para agitação magnética em etanol por 60 minutos, a 50 °C. A solução foi filtrada em filtro de papel Whatman 40 e armazenada em um ambiente livre de luz para posterior impregnação do polímero. Para confirmar a presença da molécula bixina no extrato de urucum, foi realizada a espectroscopia UV-visível (UV-vis) do extrato bruto de urucum em um espectrômetro Perkin Elmer Lambda 1050, a faixa de comprimento de onda foi de 250 a 800 nm e a velocidade de varredura foi de 266,75 nm/min. O extrato de urucum em etanol utilizado nesta análise foi diluído mais 50 vezes. A medição foi realizada logo após a preparação do extrato.

A impregnação do polímero foi realizada por um método simples, onde foram misturados 5 g de acetato de celulose em pó com 20 mL de extrato de urucum, até obter uma mistura homogênea. Em seguida, a mistura foi colocada à temperatura ambiente para permitir a evaporação do etanol e, finalmente, seca em estufa a 60°C por 1 hora. A solução de acetato de celulose impregnado com urucum (ACU) foi preparada com 12% m/v de ACU em uma mistura de solventes de acetona e dimetilformamida (3:1, v/v), por agitação magnética em velocidade média a temperatura ambiente. O esquema de produção do extrato e da impregnação do polímero AC está ilustrado na figura 3.

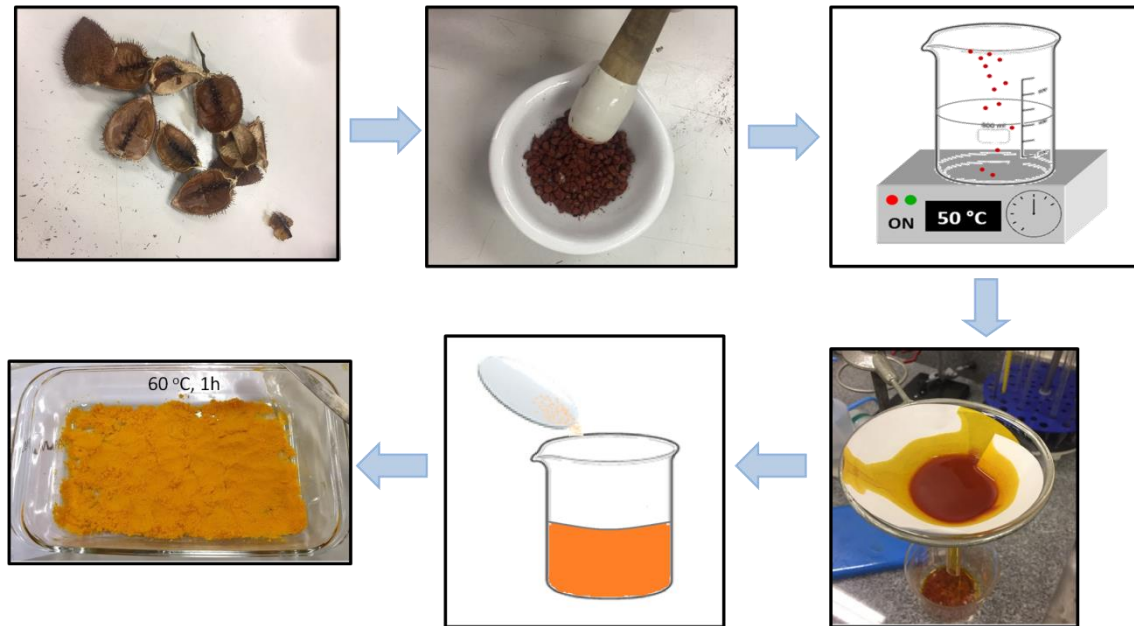


Figura 3 – Ilustração esquemática da produção do extrato de urucum e a impregnação do polímero de acetato de celulose. As sementes de urucum foram retiradas e moídas em um cadinho de cerâmica, em seguida, o urucum moído foi solubilizado em álcool absoluto e posteriormente filtrado em filtro de papel. A solução filtrada foi despejada sobre o pó de acetato de celulose e o álcool foi evaporado.

O polímero de acetato de celulose e o polímero de acetato de celulose impregnado com urucum foram dissolvidos em acetona e DMF, separadamente, e posteriormente as soluções foram transferidas para uma seringa de 10 ml e alimentada continuamente por uma bomba com uma taxa de vazão de 0,8ml/h através de uma agulha de aço inoxidável com diâmetro de 0,7 mm, no aparelho de eletrospinação. A alta tensão usada foi de 12 kV e a distância entre ponta e o coletor foi de 10 cm, como representado na figura 4.

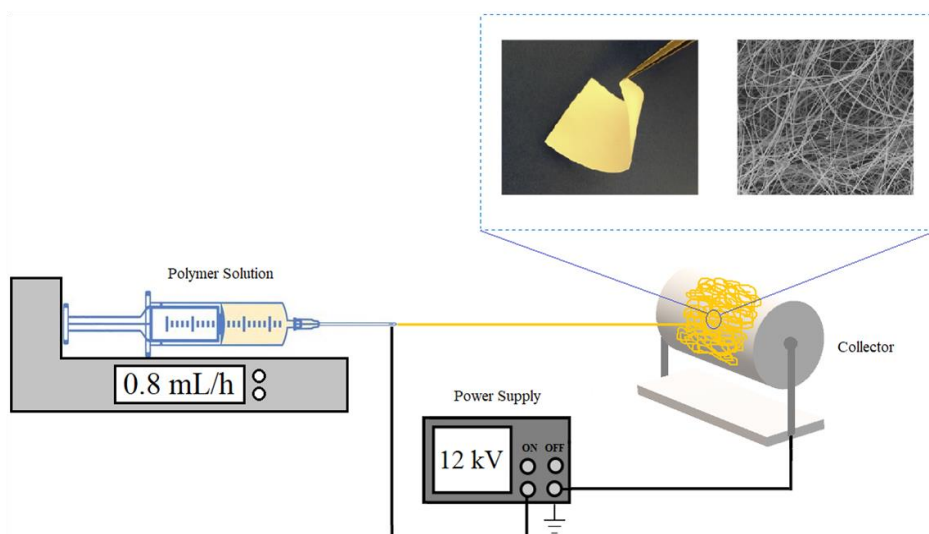


Figura 4 – Esquema do processo de eletrospinação para as nanofibras de acetato de celulose incorporadas com extrato de urucum.

Para a utilização das nanofibras para o cultivo celular, as mesmas foram cortadas em uma máquina a laser em formato de discos de aproximadamente 16 mm de diâmetro para se adequarem ao tamanho dos poços das placas de 24 poços. Posteriormente, as nanofibras devidamente cortadas foram esterilizadas por irradiação gama, a 10 KGy, no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) e transferidas para as placas de cultivo. Para evitar que as membranas flutuassem no meio de cultura, elas foram fixadas no fundo do poço com uma solução de alginato, pipetada nas bordas da placa. Adicionalmente, antes do plaquemanto as membranas foram equilibradas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, Gibco) e 1% de antibiótico (100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL) – meio DMEM 10%, por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.2 Caracterização das nanofibras por Ressonância Nuclear Magnética e Microscopia Eletrônica de Varredura

As nanofibras de acetato de celulose incorporadas com urucum foram caracterizadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) a fim de confirmar a presença da molécula bixina nas nanofibras produzidas. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro Bruker DPX-400 Avance (400 MHz), em um laboratório de ressonância magnética de alta resolução usando uma sequência padrão de pulso de eco de spin Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), com ou sem pré-saturação do sinal do solvente. O equipamento é pertencente ao Departamento de Química/UFMG. As nanofibras de acetato de celulose com urucum foram diluídas em acetona-*d*₆ e os espectros de ¹H NMR foram adquiridos a 25 °C com largura espectral de 16 ppm, com 128 varreduras e 32K pontos de dados. Os dados brutos foram processados usando uma ampliação linear de 0,3 Hz na transformada de Fourier. A fase e a linha de base foram corrigidas e o sinal de acetona-*d*₆ a 2,05 ppm foi usado como referência interna. A sequência da CPMG foi realizada com um atraso de τ de 1,5 ms e o eco foi repetido 80 vezes para produzir um período de atraso de relaxamento total de 2 τ de 240 ms.

Ambas as nanofibras produzidas foram ainda caracterizadas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da Shimadzu - 550, com tensão de 10 kV e detecção de imagens de elétrons secundários no Departamento de engenharia de materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Para isso, as amostras foram fixadas em *stubs* com fita de

carbono e metalizadas com uma camada de 3 nm de ouro para análise no MEV. A partir das imagens obtidas foram calculados os diâmetro médio das fibras pelo programa imageJ.

3.3 Cultura Celular

Para este estudo foram utilizadas uma linhagem de mioblastos cardíacos, bem como miócitos cardíacos de camundongos obtidos através de cultura primária.

A linhagem de mioblastos cardíacos utilizada foi a H9c2, as quais são provenientes de células cardíacas de ratos embrionários, possuindo características morfológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas comparáveis às dos cardiomiócitos nativos (PEREIRA e colaboradores, 2011). Essas células foram mantidas em cultura por passagens sucessivas em garrafas de 25 cm³, em meio DMEM 10% – Meio de crescimento (MC). Para os ensaios de diferenciação celular, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços, mantidas em meio de cultura por três dias (DMEM 10%) e posteriormente incubadas em meio DMEM, suplementado com 1% de SFB, 10 nM de ácido retinóico e 1% de antibiótico – Meio de diferenciação (MD).

A cultura primária de cardiomiócitos foram preparadas de acordo com protocolo previamente descrito (HISSA e colaboradores, 2012), a partir de camundongos neonatos (0-3 dias), da linhagem BALB/c. Os camundongos foram limpos com álcool iodado 1%, sacrificados por decapitação e o coração foi removido e mantido em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* - SIGMA®) gelado. Terminada a extração dos corações, os mesmos foram lavados através da passagem sucessiva em poços de uma placa de seis poços, contendo 3 mL de HBSS gelado. Os corações foram então colocados sobre uma lâmina escavada, o átrio retirado com o auxílio de um bisturi e o restante fragmentado em pedaços menores para realização da digestão enzimática. A digestão foi realizada em tubo cônico de 50 mL contendo 7 mL de solução de HBSS, contendo tripsina/EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid* - GIBCO®) na concentração final de 0,0125%. O tubo foi mantido *overnight* a 4°C sob agitação moderada. No dia seguinte, 0,7 mL de SFB foram acrescentados ao tubo com os fragmentos cardíacos já parcialmente digeridos, juntamente com Colagenase tipo II (Worthington®) a 0,1% em meio L-15 (meio Leibovitz - SIGMA®). Logo depois foram realizados 10 ciclos de 5 minutos em *shaker* longitudinal em velocidade média, os ciclos foram realizados a 37°C. Entre os ciclos, o tubo contendo os fragmentos dos corações foi vortexado somente uma vez. Ao fim dos ciclos, realizou-se a dissociação mecânica com pipeta de 10 mL. A solução contendo as células segregadas foi incubada por 5 minutos à T.A. e filtrada em peneira de 70 µm. Após a

filtragem, a solução foi novamente incubada por 40 minutos a 37°C e em seguida submetida à centrifugação por 5 minutos a 300 g. O *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de meio DMEM enriquecido com 10% de SFB e 1% de antibiótico, transferido para uma garrafa de cultura de 75 cm² e mantido em estufa à 37°C, com 5% de CO₂, por 2 horas, para a adesão diferencial dos fibroblastos e purificação dos cardiomiócitos. Durante este período, placas de 24 poços foram preparadas com lamínulas de vidro redondas de 13 cm de diâmetro ou com os substratos 3D. Para análise de comparação, metade das lamínulas de vidros e dos substratos 3D foram tratados por 2 horas com fibronectina 1 µg/mL. Os cardiomiócitos purificados foram plaqueados na proporção de 2x10⁵ células por poço em meio DMEM contendo 10% de SFB. Todos os procedimentos usados estão em conformidade com os princípios éticos da experimentação animal e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG – Protocolo 45/2009).

3.4 Viabilidade e Proliferação Celular - MTT

O ensaio de MTT (Mosmann, 1983) é um método colorimétrico sensível que mensura a viabilidade e proliferação celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade óptica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

As células de linhagem e primária foram avaliadas por MTT. Os mioblastos H9c2 foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 5×10⁴ células/poço sobre as nanofibras de AC e as nanofibras de ACU. Além disso, os cardiomiócitos primários foram semeados em placas de 24 poços na densidade de 2×10⁵ células/poço sobre as nanofibras de AC e as nanofibras de ACU. Como controle, as células também foram plaqueadas sem as membranas, nos poços na placa de 24. As células H9c2 foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂, e analisadas por 2, 3 e 7 dias, em DMEM 10%. Os cardiomiócitos primários foram analisados após 7 dias incubados em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após cada período, o meio de cultura foi retirado e 210µL de meio de cultura basal foram adicionados. Em seguida, foram acrescentados 170 µL da solução de MTT (Sigma), 5 mg/mL, e a placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 1ml/poço de isopropanol-ácido e uma triplicata de cada amostra do homogeneizado foi transferida para

uma placa de 96 poços. A leitura dos valores de absorvância da solução resultante foi realizada no espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram feitas em triplicatas. Como controle da interferência da membrana no processo de colorimetria do MTT, as membranas foram incubadas em meio de cultura basal, sem células, pelos mesmos períodos e todos os processos repetidos nas mesmas condições experimentais. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade com o objetivo de proteger a sua reatividade. Os resultados obtidos foram plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa GraphPad Prism© 5.

3.5 Análise morfológica da cultura celular através da marcação do citoesqueleto de actina

Para a avaliação da morfologia celular através da marcação do citoesqueleto de actina, foram avaliadas as células H9c2 e os cardiomiócitos primários. As células (H9c2) foram plaqueadas, em triplicata, na concentração de 5×10^4 células/poço na placa de 24 poços, sobre as lamínulas de vidro e sobre as nanofibras de AC ou ACU e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO_2 em DMEM 10%. Os cardiomiócitos primários foram semeados em placas de 24 poços na densidade de 2×10^5 células/poço sobre lamínulas de vidro com e sem revestimento de fibronectina, e sobre as nanofibras de AC e as nanofibras de ACU com e sem revestimento de fibronectina.

As células H9c2 foram incubadas em estufa a 37°C e 5% CO_2 , em DMEM 10%, e analisadas por 2, 3 e 7 dias. Os cardiomiócitos primários foram analisados após 7 dias incubados em estufa a 37°C e 5% CO_2 . Após esse período, as células sobre a membrana foram lavadas com solução salina tamponada com tampão fosfato, contendo cálcio e magnésio (PBS+/+) e fixadas com formaldeído 3,7%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, foram realizadas três lavagens com PBS-/- e feita a permeabilização da membrana celular, utilizando-se 0,1% Triton-X100 em PBS-/-, por 10 minutos. Após a permeabilização, as amostras foram novamente lavadas com PBS-/- (3 vezes/5min) e então incubadas com Faloidina conjugada com Alexa fluor 546® 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS-/- (3 vezes/10min) e as amostras montadas sobre lâminas de vidro com gel de montagem, Hydromount® (Electron Microscopy Sciences).

3.6 Análise morfológica da cultura celular através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise ultraestrutural das células aderidas à sua superfície dos diferentes substratos foram realizadas imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células H9c2 foram plaqueadas, em triplicata, na concentração de 5×10^4 células/poço de placas de 24 poços, sobre os diferentes substratos (lamínula de vidro ou nanofibras de AC ou ACU) e mantidas em cultivo com DMEM 10% por 3 dias, em estufa a 37°C e 5% CO₂. Os cardiomiócitos primários foram plaquados, em triplicata, na concentração de 2×10^5 células/poço de placas de 24 poços, sobre os diferentes substratos (lamínula de vidro ou nanofibras de AC ou ACU, com e sem revestimento de fibronectina) e mantidas em cultivo com DMEM 10% por 7 dias, em estufa a 37°C e 5% CO₂.

Para a visualização no MEV os diferentes substratos contendo as células foram lavados com PBS sem cloreto de cálcio e magnésio (PBS^{-/-}) duas vezes, após retirada do meio de cultura, e fixados com 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1M por 2 horas à temperatura ambiente. O volume adicionado a cada poço foi o suficiente para cobrir completamente as amostras. Após este período, os poços foram lavados com tampão fosfato 0,1 M. Em seguida, as amostras foram desidratadas por uma bateria gradual de álcoois (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%) por 15 minutos cada. Finalizada a desidratação, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO₂. A secagem em ponto crítico é o processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO₂, evitando dano à célula causado pela tensão superficial durante o processo da evaporação natural. O material foi seco no aparelho de ponto crítico de Balzers, modelo CPD-020 no Centro de Microscopia da UFMG. Por fim, as amostras foram fixadas em *stubs* com fita de carbono e metalizadas com uma camada de 3 nm de ouro para análise no MEV. As micrografias foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura - FEI Quanta 200 FEG do Centro de Microscopia da UFMG. A Voltagem utilizada foi de 15kV.

3.7 Avaliação da diferenciação dos mioblastos cardíacos h9c2 através de ensaios fluorescência e PCR

A fim de avaliar o estado de diferenciação da culturas de H9c2 nos diferentes substratos, mantidos ou não em MD por 7 dias, foi realizada a análise da expressão de um gene que codifica uma proteína presente nos cardiomioblastos diferenciados, a Troponina T, por PCR.

Paralelamente, foi realizada a marcação por fluorescência dos filamentos de actina das células mantidos ou não em MD por 7 dias. Conforme descrito no item 3.4, as células foram analisadas por marcação com faloidina conjugada com AlexaFluo 546[®] e DAPI.

Para a avaliação da expressão gênica por PCR, o RNA total das culturas celulares, nas diferentes condições de crescimento foi isolado. Para isso, 5×10^4 células/poço foram semeadas sobre os diferentes substratos e cultivadas em MC ou MD por 7 dias, em placas de 24 poços. Após este período as células foram lisadas utilizando-se 500 ul do reagente Trizol (Gibco), por poço, e incubados por 5 minutos à T.A. A solução contendo as células lisadas em Trizol foi centrifugada a 13000 rpm, por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase superior contendo o RNA total foi coletada e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico (Merck) por 10 minutos à T.A. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 13000rpm, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e adicionado etanol 75% (Merck). As amostras foram então lavadas por centrifugação a 7500rpm, por 10 minutos a 4°C. O RNA total purificado foi diluído em água destilada DNase e RNase free (Gibco). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm em leitor NanoDrop Lite (Thermo Scientific).

A partir do RNA total isolado, foi sintetizado o cDNA utilizando-se o RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0,5 µg de oligo(dT)18, a 70°C por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, 5X reaction buffer, 20unidades RibolockTM Ribonuclease inhibitor, 10mM dNTP mix, e foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima RevertAidTM H Minus M-MuLV RT (Fermentas) e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos. O cDNA resultante foi utilizado nas reações de PCR.

3.8 Análise estatística

Os ensaios de MTT e PCR foram analisados através do software *Prism statistical software* (Graphpad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados utilizando-se *One way ANOVA* e *t-test*, sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$. Os resultados apresentados representam a média de triplicatas \pm o desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do extrato bruto de urucum e das nanofibras de AC e ACU

Os principais compostos encontrados na semente do urucum são carotenoides e apocarotenoides. A bixina é o principal composto carotenoide presente no urucum, correspondendo a 80% da sua composição (SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016). Além disso, terpenóides, ácidos fenólicos, flavonoides e outros carotenoides também são encontrados (MAHANOM et al. 1990). Vários estudos demonstraram as propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos extratos brutos de sementes do urucum (VIUDA-MARTOS et al., 2012). Existe uma ampla gama de tipos de solventes utilizados para a extração das moléculas bioativas do urucum, entre eles o etanol, em que o extrato bruto do urucum demonstrou ter atividade antibacteriana. (SILVA; NACHTIGALL; STRINGHETA, 2010) (ONGSAKUL et al. 2009; FLEISCHER et al. 2003).

No presente trabalho, desenvolvemos uma metodologia simples para a obtenção do extrato de urucum, utilizando o etanol como solvente orgânico. Para caracterizar o extrato produzido, e garantir a presença de um dos princípios ativos no substrato, a bixina, foi utilizada a espectroscopia UV-vis, uma vez que a energia e a intensidade da absorção do extrato de urucum são características e fornecem informações sobre os componentes. O perfil do extrato obtido através da espectroscopia é mostrado na figura 5.

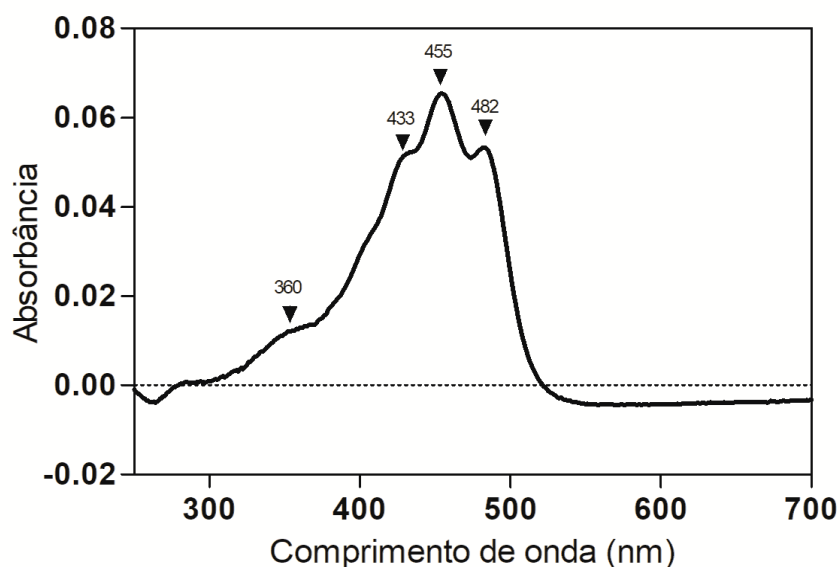
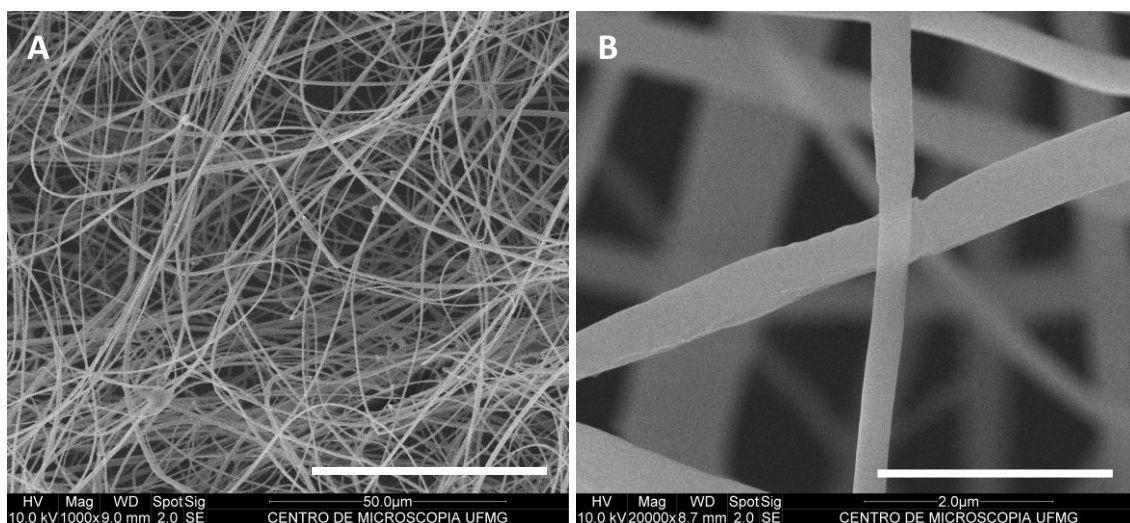


Figura 5 – Espectro de absorvância do extrato bruto de urucum através da técnica de UV-vis

Os espectros de UV-vis mostraram picos nos comprimentos de onda de ~ 360 nm, 433 nm, 454 nm e 482 nm. Apesar da característica de dependência do solvente nos espectros de absorção, o pico de absorção a ~360 nm é característico da conformação cis-bixina (RAHMALIA; FABRE; MOULOINGUI, 2015), indicando a presença deste composto em nosso extrato. Da mesma forma, a presença de um outro pico em 482nm também indica a presença da cis-bixina, uma vez que esta conformação apresenta absorbância máxima nos comprimentos de onda entre 470-501 nm. Esses resultados indicam que o extrato bruto de urucum é rico em caratenóides cis-bixina .

Para a obtenção das nanofibras de acetato de celulose (AC) foi utilizada a metodologia de *electrospinning*, a qual permitiu a obtenção de membranas de AC, conforme descrito no item metodologia. As membranas puras ou contendo o extrato de urucum (ACU) foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através dessa técnica, verificou-se que as nanofibras estão dispostas em várias camadas e em diferentes direções, formando um emaranhado de fibras, possivelmente capazes de sustentar células de forma eficiente (Fig. 6A-D). Embora as membranas de ACU tenham apresentado diâmetro médio menor que aquelas das membranas de AC puras, 269 ± 101 nm e 468 ± 173 nm, respectivamente (Fig. 6E), ambas apresentaram aspecto liso e sem rugosidades (Fig. 6A-D). Dessa forma, a adição do extrato bruto de urucum não alterou significativamente a capacidade do acetato de celulose de fiação e formação de nanofibras.



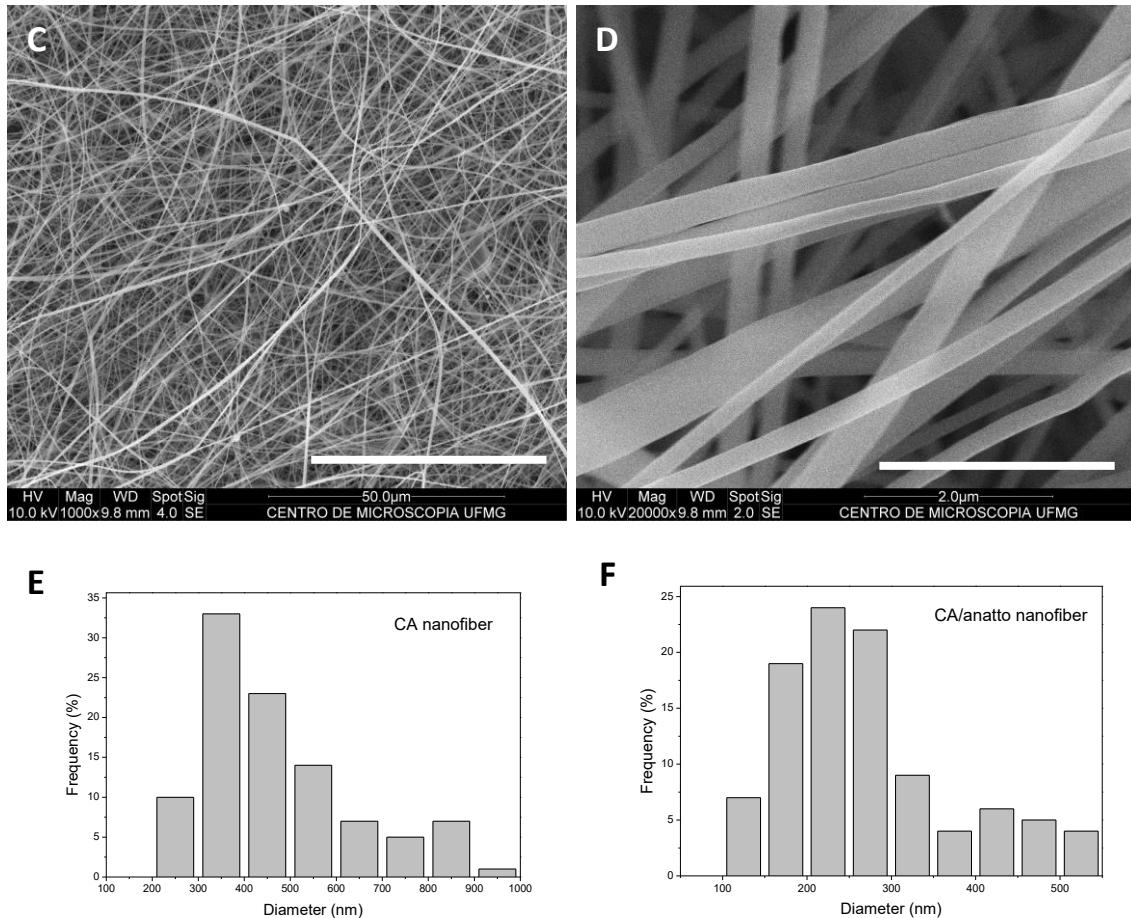


Figura 6 – Imagens representativas de (A e B) nanofibras de acetato de celulose (AC) e (C e D) acetato de celulose com urucum (ACU) vistas ao microscópio eletrônico de varredura. Gráfico de distribuição de frequência dos diâmetros, em nanômetros, de (E) nanofibras de AC e (F) nanofibras de ACU. Aumentos: 1000x (A e C) e 20000x (B e D). Barra de escala: 50 μm (A e C) e 2 μm (B e D).

Para garantir que houve a incorporação efetiva das moléculas bioativas nas nanofibras de acetato de celulose contendo o extrato de urucum, as nanofibras foram dissolvidas em acetona e analisadas por espectroscopia através da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) sem e com experimentos de CPMG RMN. A aquisição de CPMG RMN é mais adequada para a detecção de pequenas moléculas, fornecendo uma atenuação de amplos sinais decorrentes das nanofibras. A bixina possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$, como mostrado na figura 2. Outro constituinte majoritário das sementes de urucum é o geranilgeraniol, que representando 1% das sementes secas. Dessa forma, a comparação de todos os espectros com o mesmo deslocamento químico foi realizada e foi possível detectar as características do sinal dos derivados da bixina e de geranilgeraniol (Kelly e colaboradores, 2010), confirmando a presença das moléculas bioativas do extrato bruto de urucum nas

nanofibras (Fig. 7A). A Fig. 7 mostra o espectro das nanofibras ACU com expansões nas regiões de mudança química características dos derivados da bixina e constituintes do urucum. A presença da bixina foi comprovada através da análise dos espectros de RMN ^1H mediante observação de dois pares de dubletos em δ 5,89/ 7,98 ($J=15,8$ Hz) e δ 5,93/7,47 ($J=15,5$ Hz) atribuídos, respectivamente, a H- α /H- β aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster, juntamente com o singlete em δ 3,80 de metoxila de éster (COSTA; CHAVES, 2005). Os sinais observados no espectro de RMN ^1H que caracterizam o geranilgeraniol (Figura 7) são: δ 4,18 , δ 5,43 , δ 5,12 , δ 1,62 e δ 1,70(COSTA; CHAVES, 2005). Esses resultados corroboraram a fabricação bem-sucedida do extrato de urucum incorporado na nanofibra de acetato de celulose.

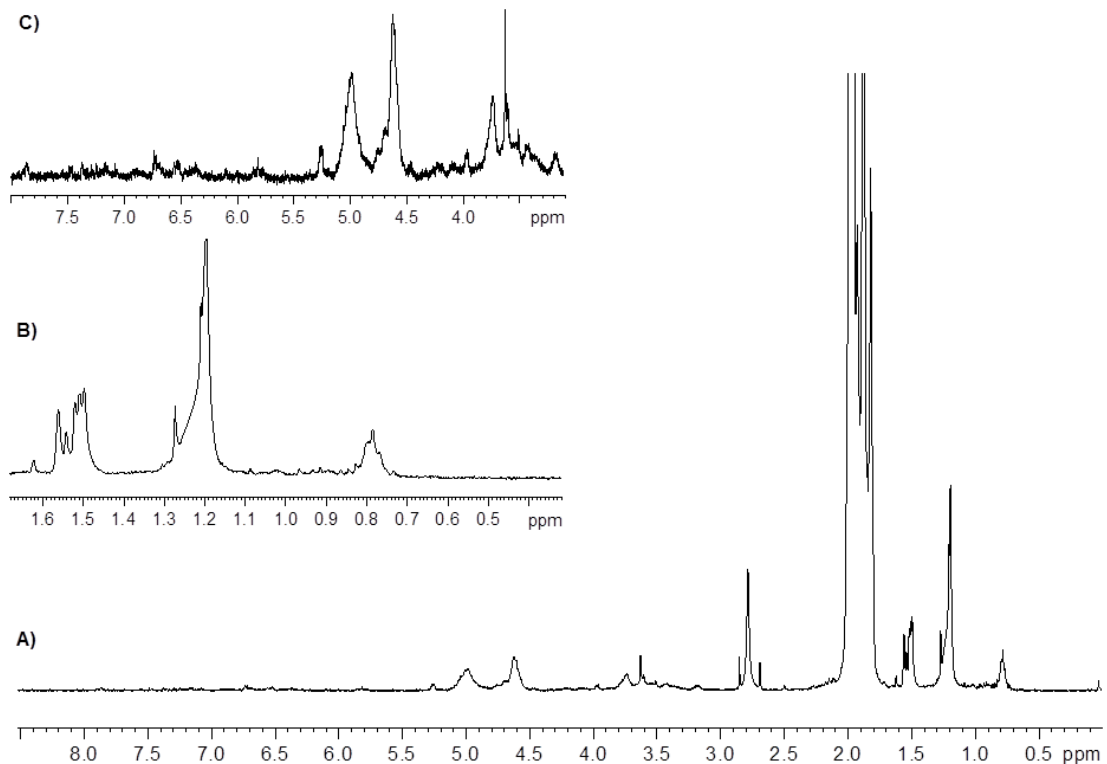


Figura 7 – (A) Espectro de RMN de ^1H CPMG obtido de mantas de nanofibras AC/Urucum $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz] dissolvidas em acetona. B) Expansão na região do próton alifático na faixa de δ 0,8-2. C) Expansão na região de sinais conjugados de prótons olefínicos e sinais de metoxil na faixa de δ 3,59 - 8,08.

4.2 Avaliação da viabilidade celular e proliferação de mioblastos cardíacos nas nanofibras de AC e AC/Urucum

Para verificar a biocompatibilidade das diferentes nanofibras no cultivo *in vitro* de mioblastos cardíacos, células da linhagem H9c2 foram semeadas em poços de placas de cultivo celular de 24 poços, contendo as nanofibras de AC ou ACU, e cultivadas por 1, 2 ou 7 dias. Células semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro, foram cultivadas sob as mesmas condições e utilizadas para fins de comparação do perfil de viabilidade e crescimento celular. Para cada um desses períodos de cultivo foi realizado o ensaio de metabolização do MTT, o qual consiste na metabolização do reagente MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando à formação de cristais de formazan. Após a formação dos cristais, esses são solubilizados e lidos em espectrofotômetro a 595nm. Paralelamente, para verificar se havia interferência das nanofibras na leitura dos dados obtidos pelo ensaio de MTT, esse foi também realizado nas membranas de AC e ACU sem células, como controle negativo. Através da visualização macroscópica das membranas contendo ou não células, foi possível visualizar que não houve interferência colorimétrica por parte das membranas. Esse dado foi comprovado pelo valor de absorbância obtido no ensaio de MTT dessas amostras, no qual AC e ACU apresentaram valores de absorbância de 0,0480 e 0,0515 nm, respectivamente, os quais foram similares ao valor obtido sem nanofibras e sem a presença de células (branco), 0,0460 (dados não mostrados). Esses valores foram computados como controles negativos da reação de MTT e subtraídos dos valores obtidos nos ensaios com células.

De acordo com os dados obtidos das culturas de células foi possível observar que as células semeadas e mantidas sobre lamínulas de vidro tiveram os valores de MTT aumentados em 3 vezes entre os tempos de 24 e 48h de cultivo, indicando o aumento do número de células e, portanto, crescimento em cultura. Entre o período de 48h e 7 dias de cultivo o número de células se manteve estável (Fig. 8B). Também, um aumento nos valores de MTT, e portanto no número de células, pôde ser observado para a condição de cultivo sobre as nanofibras de ACU. Entretanto, nessa condição o aumento ocorreu entre os tempos de 48h e 7 dias, sendo este de apenas 25%. Por outro lado, para a condição de cultivo sobre nanofibras de AC sem urucum o valor de MTT permaneceu constante durante todo o período de cultivo, indicando que não houve morte, porém não houve crescimento celular. Outro ponto importante a ser ressaltado é que, embora o número de células semeadas nas diferentes condições tenha sido o mesmo, às 24h de cultivo os valores de MTT foram significativamente mais altos para as culturas semeadas sobre as nanofibras quando comparado com aquelas semeadas sobre as lamínulas de vidro. Esses dados indicam que a taxa de adesão/sobrevivência dessas células é

maior nas nanofibras do que no vidro. Esse resultado indica que as células permaneceram viáveis após 7 dias nas nanofibras mas não se multiplicaram como na placa de cultura, indicando uma regulação negativa para a proliferação nas nanofibras de AC e ACU.

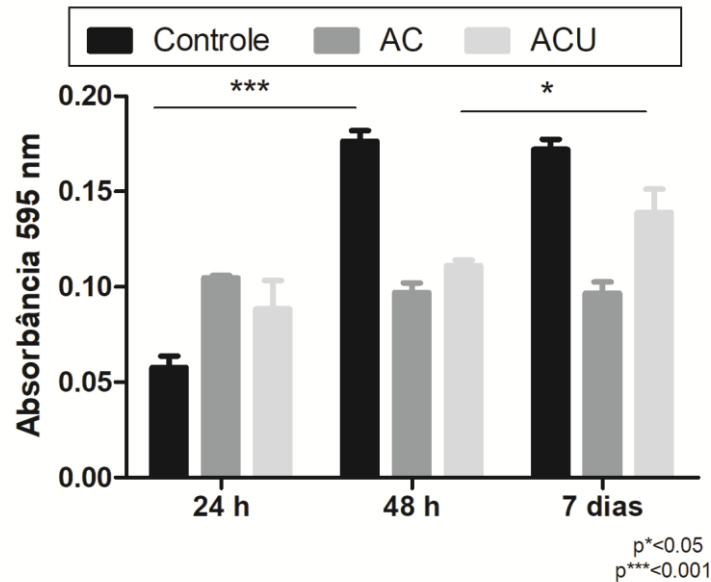


Figura 8 – Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular por ensaio de MTT das células H9c2 cultivadas na placa de cultura e nas nanofibras de AC e ACU, após 1, 2 e 7 dias. As células nas nanofibras se mantiveram viáveis porém não houve proliferação significativa após 48h quando comparadas ao controle. Após 7 dias de cultivo, houve apenas um aumento significativo na proliferação das células cultivadas sobre as nanofibras de ACU. Cada ensaio de MTT foi realizado em triplicata e repetido três vezes. Os dados representam a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($*p \leq 0,05$, $p^{***} \leq 0,001$ – Teste t student).

4.3 Caracterização por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das culturas de células H9c2 cultivadas sobre os diferentes substratos

A fim de verificar se as células estavam realmente aderidas à membrana foi realizado a Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, 5×10^4 células foram semeadas na sobre os diferentes substratos e mantidas em cultivo por 3 dias. Após esse período, o material foi processado para análise por MEV, de acordo com o protocolo descrito no item materiais e métodos. As imagens obtidas revelaram uma baixa densidade celular para aquelas culturas semeadas sobre as nanofibras em relação àquelas cultivadas sobre lamínulas de vidro, em concordância com os dados obtidos anteriormente através do teste de viabilidade por MTT (Figura 9). As células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro, figuras 5A e 5B, apresentaram uma morfologia alongada com diversas projeções em direções aleatórias. Por

outro lado, as células H9c2 cultivadas sobre as nanofibras apresentaram um perfil mais alongado, com diversos pontos de adesão às nanofibras, tanto de AC quanto ACU. (Figura 9C - F). Ainda, as células apresentaram, em sua maioria, um formato achatado e com formação de filopódios periféricos (Figura 9).

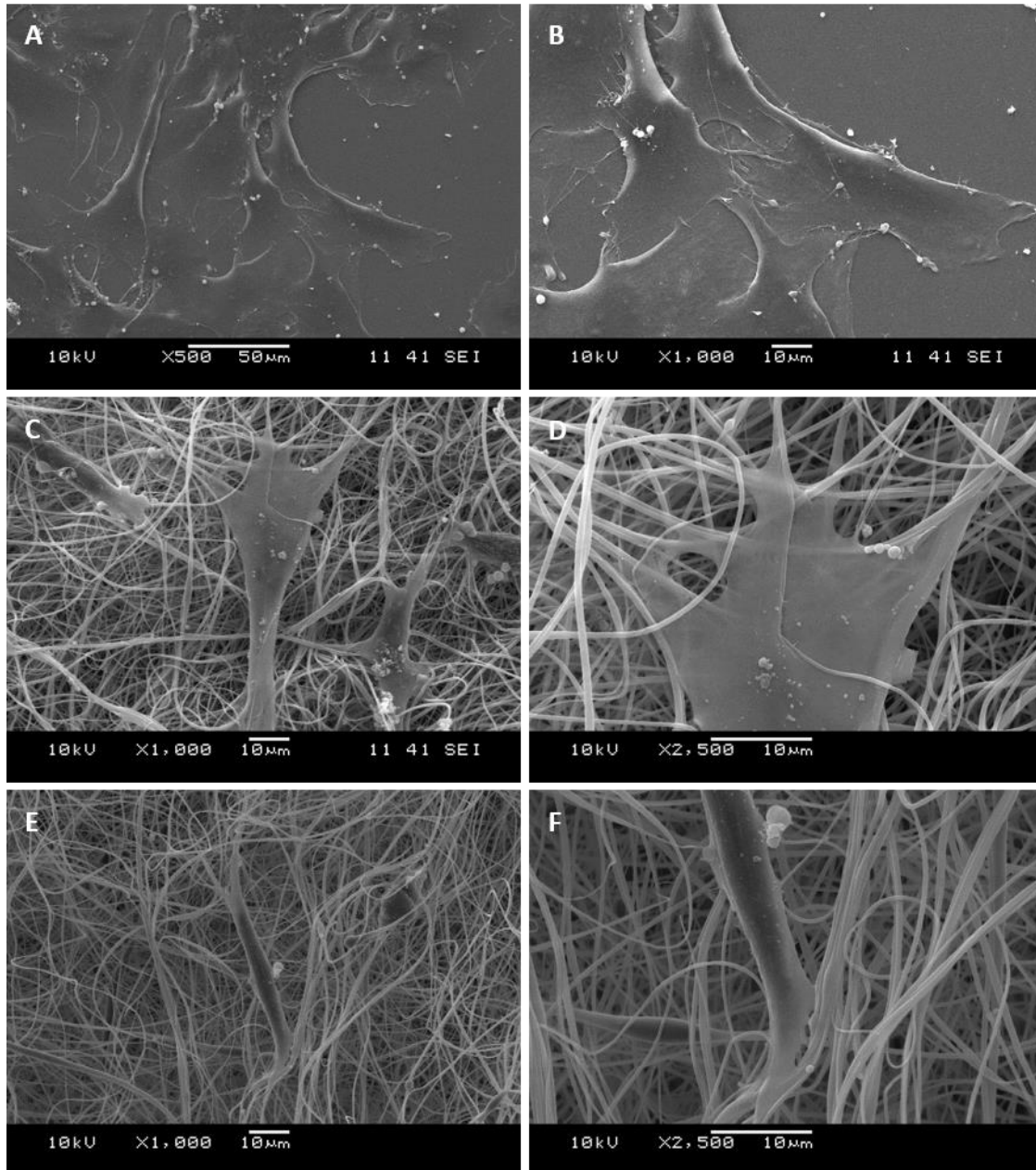


Figura 9 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando a adesão celular às nanofibras através de prolongamentos citoplasmáticos. Os painéis mostram imagens representativas de culturas de células H9c2 mantidas por 3 dias sobre lamínulas de vidro (controle) (A,B), nanofibras de acetato de celulose (C,D) e nanofibras de acetato de celulose com urucum (E,F). A barra de escala corresponde a 10 µm.

4.4 Avaliação morfológica das células H9c2 cultivadas sobre os diferentes substratos.

Além da viabilidade e proliferação celular realizamos também a avaliação morfológica das células H9c2 nas nanofibras de AC e ACU. Devido a limitação da visualização da morfologia das células através da microscopia óptica de campo claro nas nanofibras, em razão do seu caráter opaco, a avaliação do aspecto morfológico celular foi realizado utilizando-se a microscopia de fluorescência. Para isso, as células foram marcadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para identificação do núcleo das células e Faloidina conjugada com Alexa Fluor 546® para marcação dos filamentos de actina. Novamente, células cultivadas sobre lamínulas de vidro foram utilizadas para comparação. Através da microscopia de fluorescência, foi possível observar que as células cultivadas sobre lamínulas de vidro apresentaram um aspecto fusiforme, com células aparentemente mononucleadas e dispostas homoganeamente sobre toda a superfície da lamínula ao longo dos diferentes tempos de cultivo analisados (1, 2 e 7 dias) (Fig. 10). Devido a estrutura tridimensional das nanofibras, sobre este substrato as células puderam ser observadas em diferentes planos, o que dificultou a visualização dos filamentos de actina e do núcleo em microscópio de epifluorescência. De qualquer forma, diferentemente da morfologia das células na placa de cultura, foi possível observar que as células nas nanofibras de AC e ACU após 24 e 48 horas apresentaram morfologia alongada, com células próximas umas das outras, apresentando um arranjo mais ordenado e com células aparentemente multinucleadas (Fig. 11, 12).

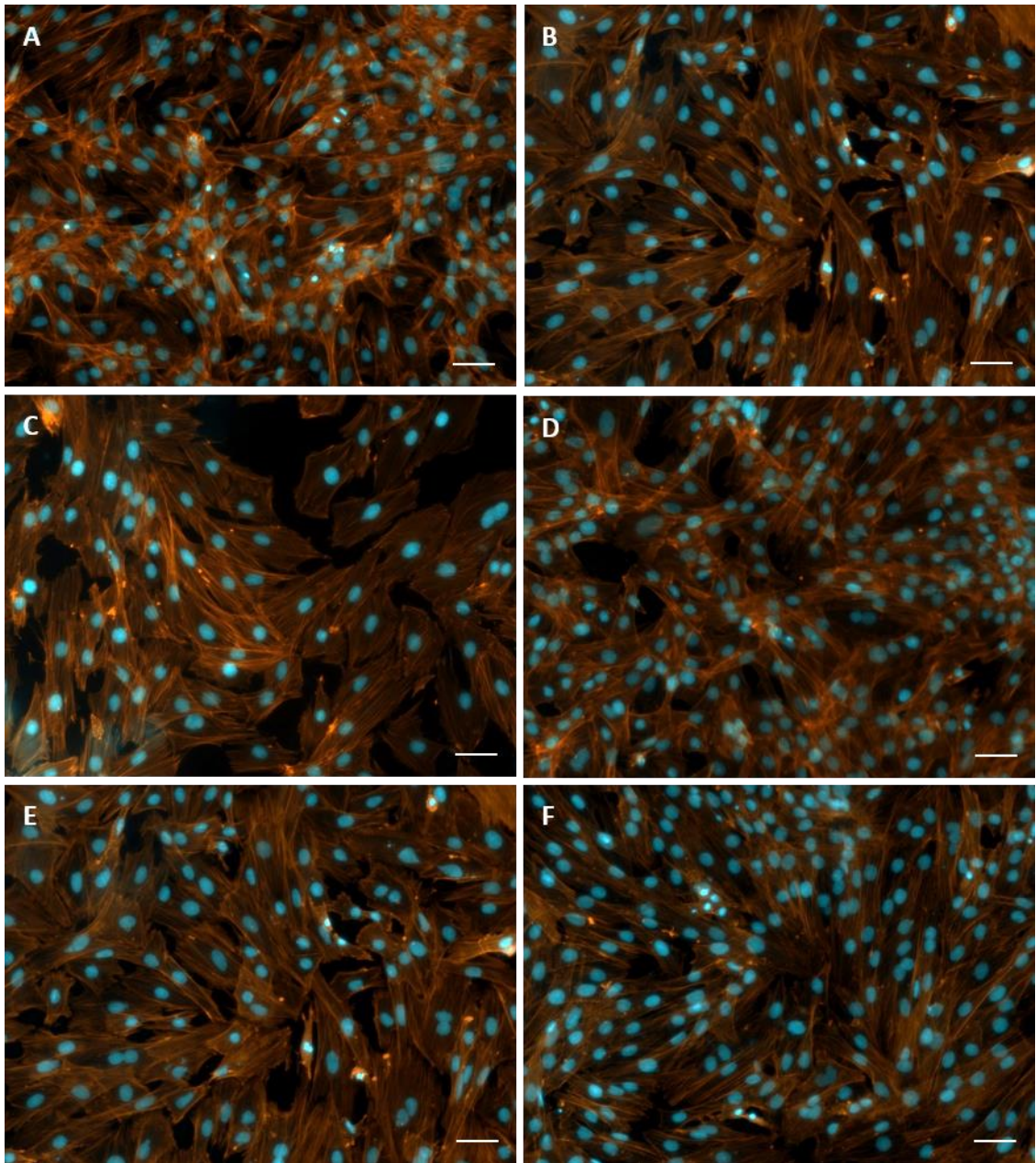


Figura 10 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro após 1 dia (A,B), 2 dias (C,D), e 7 dias de cultivo (E,F). Os painéis mostram imagens representativas de culturas de células mantidas por 1, 2 e 7 dias sobre lamínulas de vidro (controle). Em azul o núcleo celular marcado com DAPI e em vermelho os filamentos de actina marcado com Faloidina –Alexa Fluor 546. A barra de escala corresponde a 50 μ m. As setas brancas indicam células com mais de um núcleo. Aumento 10X.

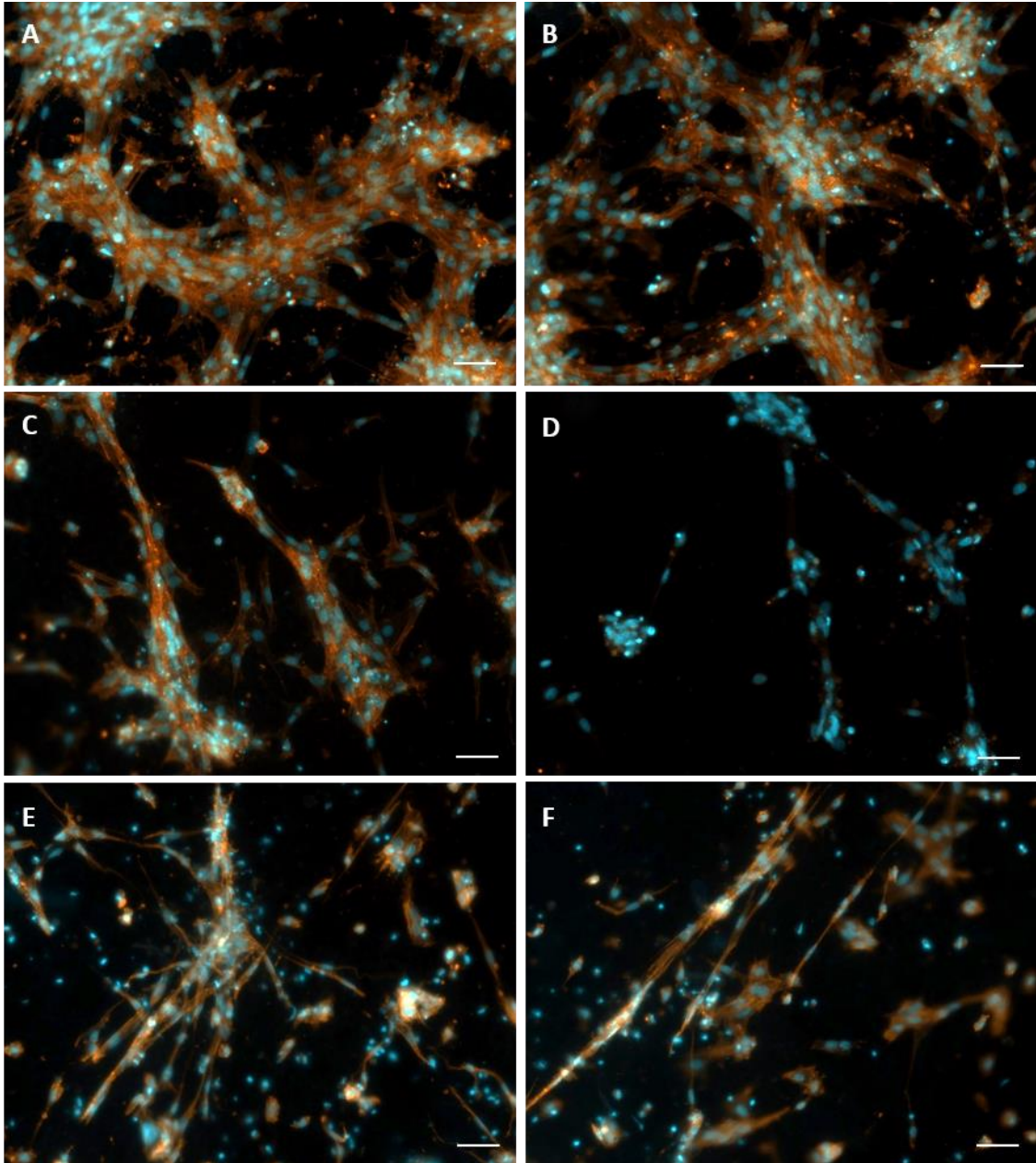


Figura 11 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre as nanofibras de acetato de celulose após 1 dia (A,B), 2 dias (C,D), e 7 dias de cultivo (E,F). Os painéis mostram imagens representativas de culturas de células mantidas por 1, 2 e 7 dias sobre nanofibras de AC. Em azul o núcleo celular marcado com DAPI e em vermelho os filamentos de actina marcado com Faloidina –Alexa Fluor 546. A barra de escala corresponde a 50 μ m. As setas brancas indicam células com mais de um núcleo. Aumento 10X.

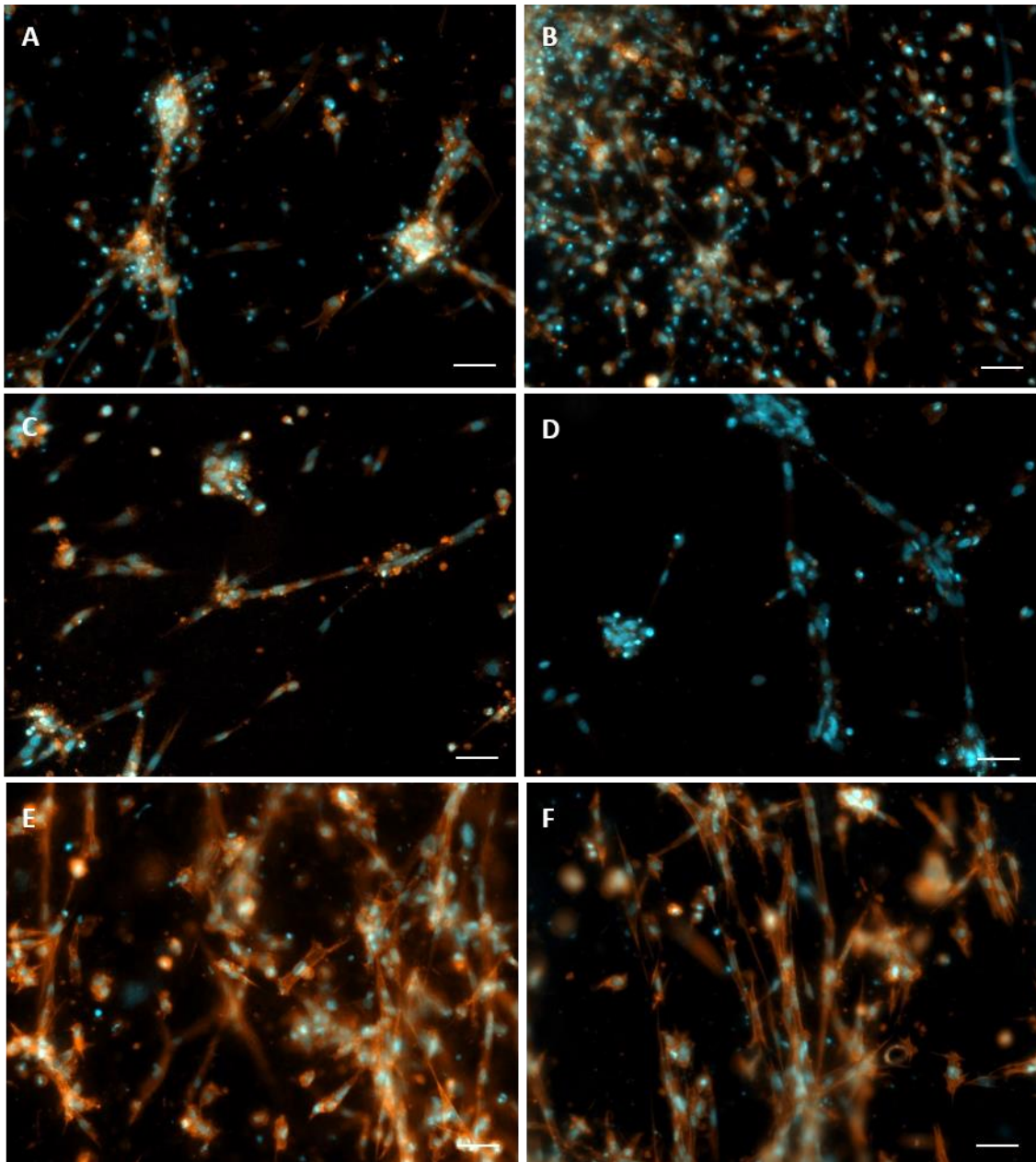


Figura 12 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre as nanofibras de acetato de celulose com urucum após 1 dia (A,B), 2 dias (C,D), e 7 dias de cultivo (E,F). Os painéis mostram imagens representativas de culturas de células mantidas por 1, 2 e 7 dias sobre nanofibras de ACU. Em azul o núcleo celular marcado com DAPI e em vermelho os filamentos de actina marcado com Faloidina – Alexa Fluor 546. A barra de escala corresponde a 50 μ m. As setas brancas indicam células com mais de um núcleo. Aumento 10X.

4.5 Avaliação da capacidade de diferenciação em cardiomiócitos de células H9c2 cultivadas sobre nanofibras de AC e AC/urucum

Mioblastos H9c2 são capazes de se diferenciar em miócitos utilizando meio de diferenciação adequado. Conforme descrito na literatura por Pereira e colaboradores (2011), a redução do conteúdo de SFB de 10% para 1% no meio de cultura induz preferencialmente uma diferenciação miogênica produzindo células multinucleadas com fenótipo de músculo esquelético, enquanto a redução sérica acompanhada de uma adição diária de 10 nM de ácido retinol (AR) induz um fenótipo do tipo cardíaco, com o aparecimento de células multinucleadas ramificadas, apresentando marcadores específicos. Dessa forma, decidimos avaliar a capacidade de diferenciação das células H9c2 em cardiomiócitos, de acordo com protocolo previamente descrito. Para isso, as células foram plaqueadas sobre os diferentes substratos, na presença ou não do meio de diferenciação a partir do 3º dia de cultura. O estado diferenciado foi confirmado através da marcação do citoesqueleto de actina e através de qPCR para marcadores de diferenciação específicos de miócitos e cardiomiócitos (Figs. 13, 14).

A troponina cardíaca T desempenha um papel importante no sistema contrátil, e é normalmente usada como um marcador específico para células musculares cardíacas (RUIZ e colaboradores, 2012). Para confirmar a eficiência do meio de diferenciação, mioblastos H9c2 cultivados sobre lamínulas de vidro por 10 dias em meio de crescimento ou 3 dias em meio de crescimento e mais 7 dias em meio de diferenciação foram lisados para extração do RNA e preparação do cDNA (a ser usado na reação de qPCR) ou fixados para análise por microscopia de fluorescência. A análise por microscopia de campo claro das células cultivadas nos diferentes meios, logo antes da lise para preparação do RNA total, mostra o aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas em 10% de SFB (Fig. 13A) e 1 % de SFB (Fig. 13B). Após 7 dias em 1% de SFB + 10 nM de AR as células parecem finas e alongadas, frequentemente fundidas para formar sincícios multinucleados (miotucos), já as células cultivadas em 10% de SFB exibem um fenótipo arredondado e plano. Além disso, a quantificação da expressão do gene para troponina T nessas culturas mostrou um aumento da expressão desse gene na condição contendo o meio de diferenciação, como esperado, indicando a diferenciação da cultura em células musculares cardíacas (Fig. 13C).

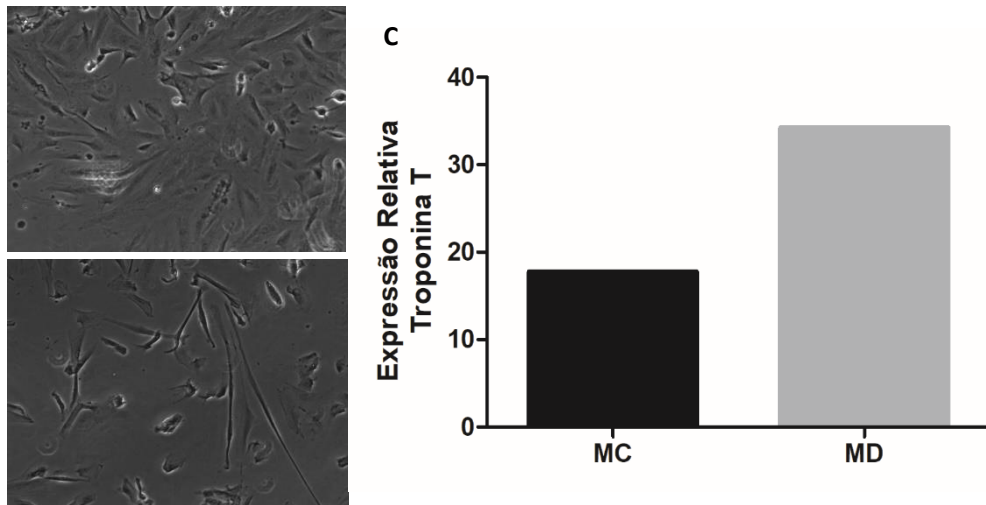


Figura 13 – Avaliação da diferenciação de H9c2 em meio de crescimento ou de diferenciação. (A e B) Imagens de microscopia de campo claro das células H9c2 cultivadas por 10 dias em meio de crescimento (10% SFB) (A), 3 dias em meio de crescimento (10% SFB) e 7 dias em meio de diferenciação (1% SFB+10 nM de AR) (B). Avaliação da expressão de Troponina T em culturas de 10 dias em meio de crescimento (10%SFB) e 3 dias em meio de crescimento mais 7 dias em meio de diferenciação (1% SFB+10 nM de AR) em células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro (C).

A avaliação morfológica das células em meio de crescimento e meio de diferenciação revelou diferenças marcantes. Como descrito anteriormente, as células H9c2 indiferenciadas cultivadas em lamínulas de vidro aparecem geralmente como pequenas células mononucleadas e irregulares em forma de fuso (Fig. 14A), enquanto as células diferenciadas apresentam células multinucleadas longas ramificadas (Fig. 14D). De maneira interessante, as células H9c2 cultivadas sobre as nanofibras de acetato de celulose e acetato de celulose com urucum em meio de crescimento (Figs. 14C e 14E) apresentaram morfologia semelhante às células cultivadas em meio de diferenciação (Fig. 14B, 14D e 14F). De acordo com as imagens da figura 10, não houve diferença na morfologia das células H9c2 cultivadas nas nanofibras de AC e ACU em meio de diferenciação e em meio de crescimento.

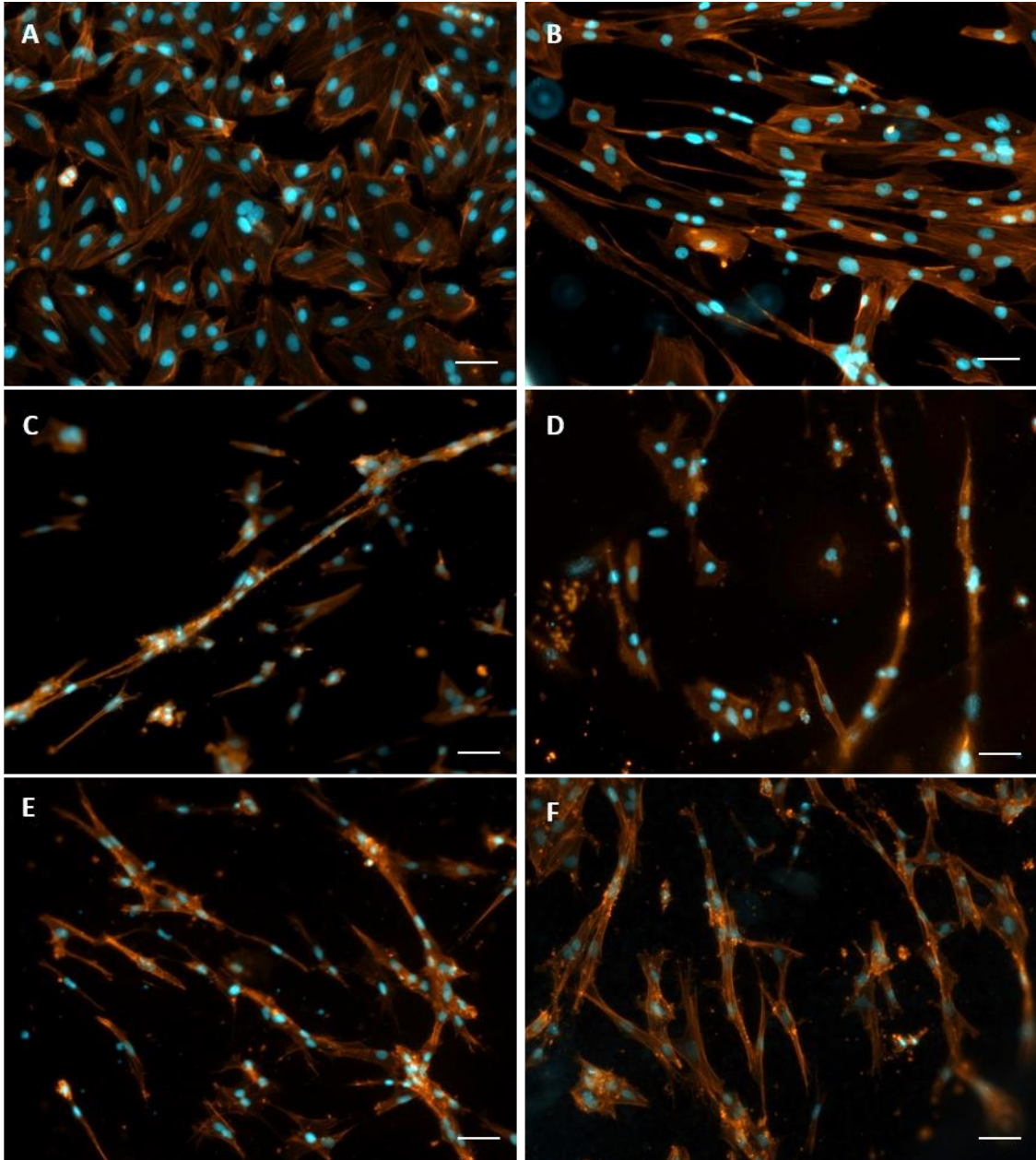


Figura 14 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico das células H9c2 cultivadas sobre lamínulas de vidro (A,B), nanofibras de acetato de celulose (C,D) e nanofibras de acetato de celulose com urucum (E,F). Os painéis mostram imagens representativas células H9c2 cultivadas em meio de crescimento (10% de SFB) por 10 dias (A,C,E) e cultivadas em meio de crescimento por 3 dias e em meio de diferenciação (1% de SFB + 10 nM) por 7 dias (B,D, F). Em azul o núcleo celular marcado com DAPI e em vermelho os filamentos de actina marcado com Faloidina –Alexa Fluor 546. A barra de escala corresponde a 50 μm . As setas brancas indicam células com mais de um núcleo. Aumento 10X.

4.6 Avaliação da proliferação e viabilidade celular das membranas de nanofibras colonizadas com miócitos cardíacos primários

Uma vez verificada a biocompatibilidade das nanofibras de AC e ACU em termos de adesão e viabilidade dos cardiomioblastos H9c2, decidimos investigar a sua boa compatibilidade para a manutenção e cultivo de cardiomiócitos primários (CMs). Os cardiomiócitos primários foram divididos em dois grupos: um grupo onde as matrizes e lamínulas de vidro foram previamente revestidos com fibronectina e outro onde não houve revestimento. Adicionalmente, foi utilizada uma outra matriz 3D, formada por colágeno do tipo I para o cultivo dos cardiomioblastos primários, para fins de comparação com as nanofibras. Utilizamos uma matriz tridimensional de colágeno do tipo I, já descrita por Kitten e colaboradores (1996), como uma matriz 3D comparativa.

Foi avaliada a proliferação e a viabilidade celular de cardiomiócitos primários obtidos de camundongos neonatos BALB/c após 7 dias de cultivo em DMEM 10%. Para isso, foi realizado o ensaio de metabolização do MTT, já descrito anteriormente. De acordo com o gráfico da figura 15, foi possível observar que os CMs semeados e mantidos sobre lamínulas de vidro tiveram os menores valores de MTT após 7 dias de cultivo em comparação com os substratos 3D, nos grupos revestidos ou não com fibronectina. As nanofibras de AC e ACU apresentaram os maiores valores de MTT no grupo sem revestimento, apresentando diferença significativa entre o controle e a matriz de colágeno. Por outro lado, no grupo revestido com fibronectina não houve diferença estatística de viabilidade entre os substratos 3D. Além disso, não houve diferença significativa entre os valores de viabilidade nas nanofibras de AC revestidas ou não com fibronectina. Esses resultados confirmam a boa viabilidade celular dos CMs nas nanofibras de AC e ACU com e sem revestimento, indicando que não é necessário o revestimento com proteínas da matriz extracelular para promover a adesão dos CMs nessas nanofibras.

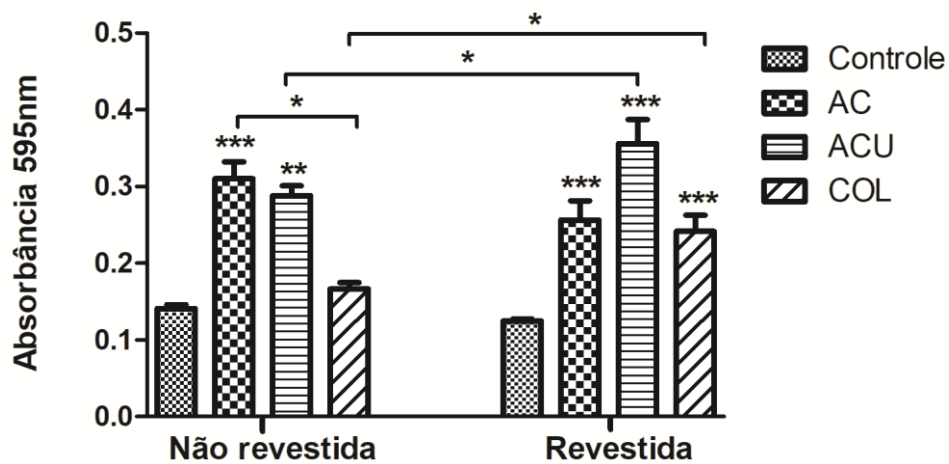


Figura 15 – Representação gráfica da viabilidade e proliferação celular por ensaio de MTT dos cardiomiócitos primários derivados de neonatos de camundongos BALB/c cultivados na placa de cultura, nas nanofibras de AC e ACU e na matriz de colágeno do tipo I após 7 dias. As células nas nanofibras se mantiveram viáveis porém não houve proliferação significativa após 48h quando comparadas ao controle. Após 7 dias de cultivo, houve apenas um aumento significativo na proliferação das células cultivadas sobre as nanofibras de ACU. Cada ensaio de MTT foi realizado em triplicata e repetido três vezes. Os dados representam a média de triplicatas \pm o desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas (* $p \leq 0,05$, $p^{***} \leq 0,001$ – Teste t student).

4.7 Avaliação morfológica de miócitos cardíacos primários cultivados nas nanofibras de AC e ACU através da marcação do filamento de actina

A avaliação morfológica foi feita pela marcação do citoesqueleto de actina após 7 dias de cultura dos CMs em DMEM 10%. Os CMs cultivados na placa de cultura (controle) apresentaram uma morfologia mais arredondada, principalmente nas células cultivadas com revestimento de fibronectina (figura 16A,16B). Os CMs cultivados nas matrizes tridimensionais apresentaram um perfil completamente diferente. Em ambas as nanofibras, de AC e de AC/bixina, as células apresentaram um perfil mais alongado e empacotado, é possível observar que os prolongamentos das células estavam em outro plano, devido a dificuldade de focalização da imagem (figura 16). Como descrito pelo ensaio de MTT, também não houve diferença na morfologia das células nas nanofibras revestidas e não revestidas com fibronectina. Na matriz de colágeno não revestida, figura 12G, os CMs apresentaram um perfil mais alongado com muitos prolongamentos, além disso as células parecem estar bem conectadas. Na figura 16H, os CMs na matriz de colágeno revestida

apresentaram um perfil mais empacotado com prolongamento menores, demonstrando que o revestimento da matriz provocou alteração na morfologia das células.

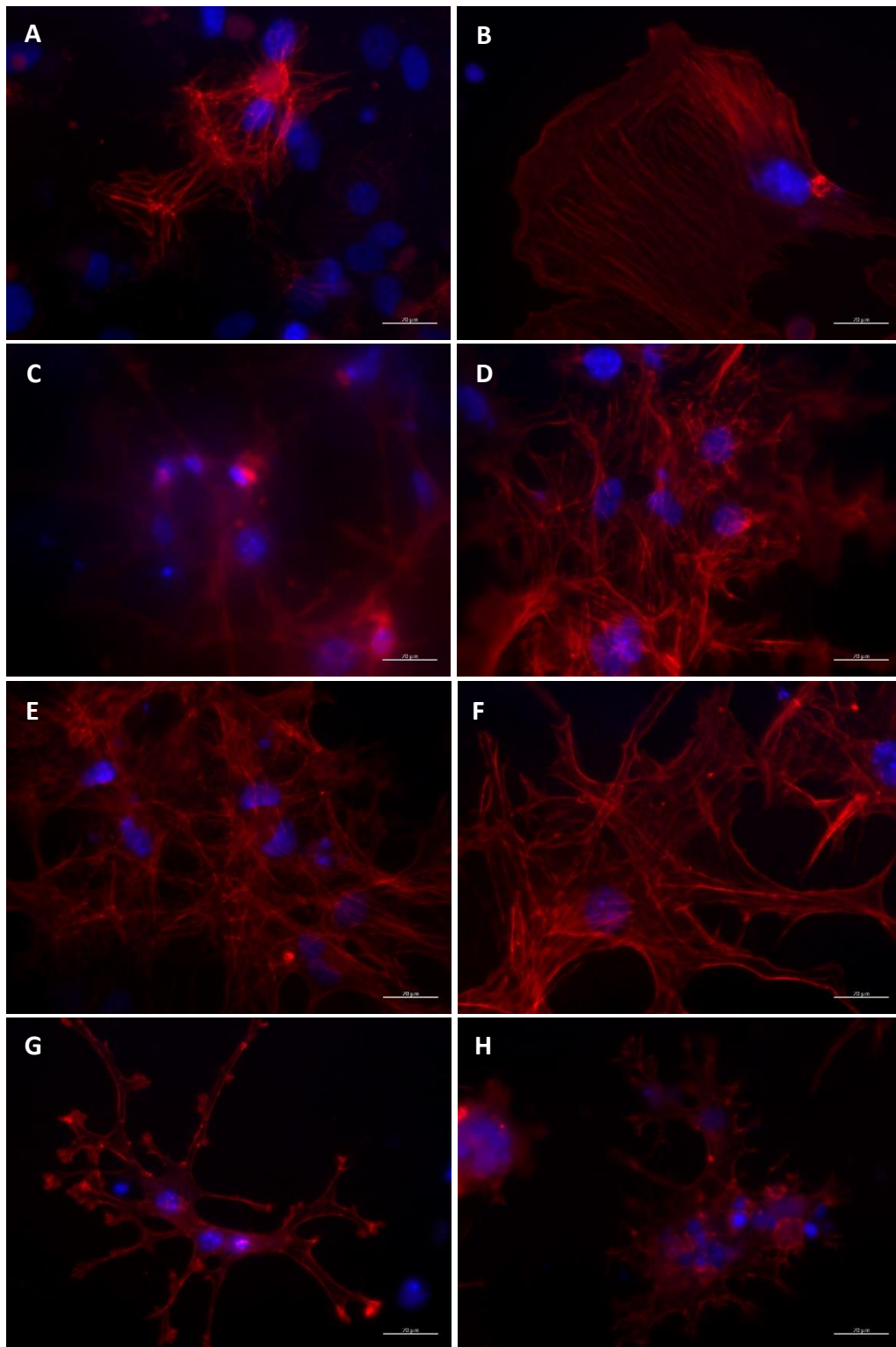
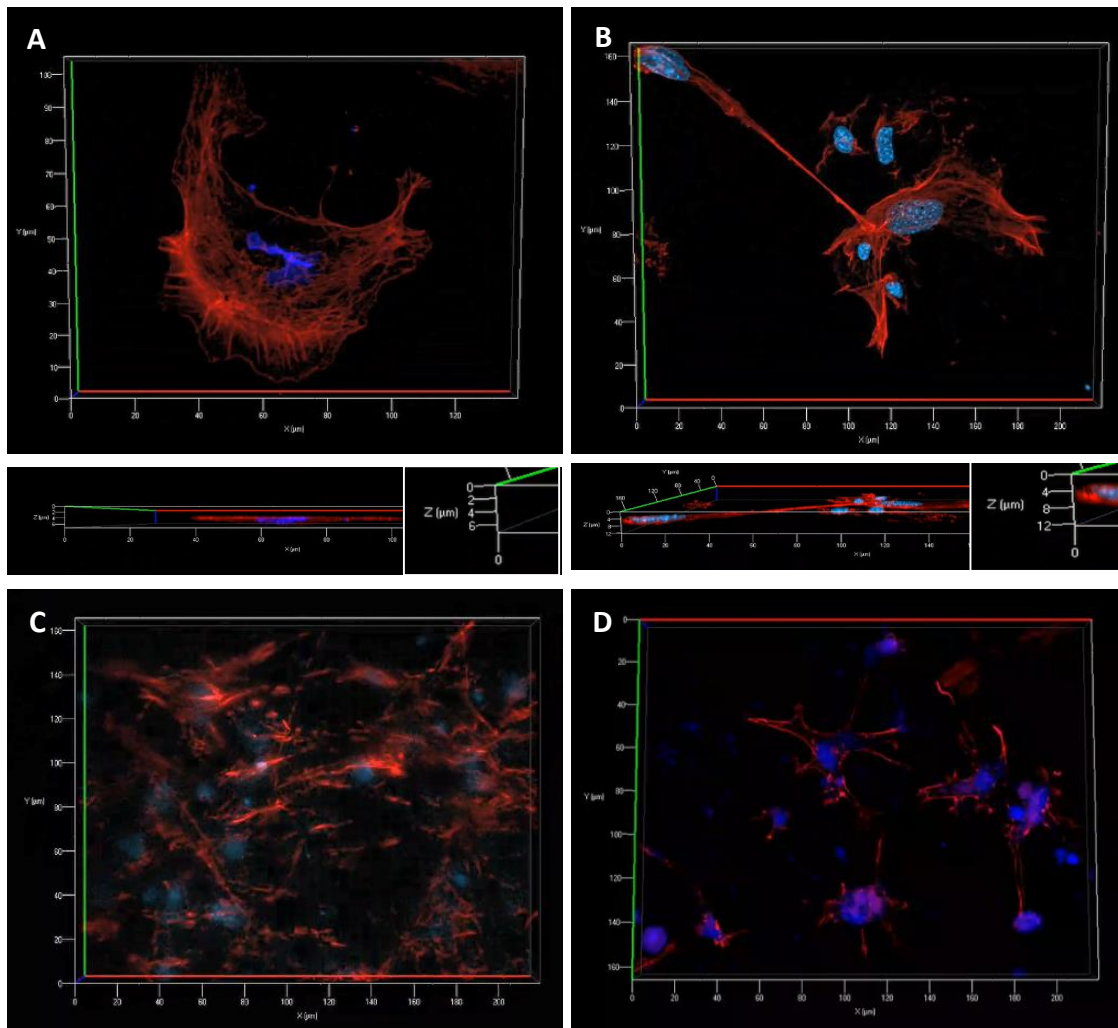


Figura 16 – Microscopia de fluorescência para avaliação da organização dos filamentos de actina e aspecto morfológico dos miócitos cardíacos primários cultivadas sobre lamínulas de vidro (A,B), nanofibras de acetato de celulose (C,D), nanofibras de acetato de celulose com urucum (E,F) e matriz de colágeno tipo I (G,H), com e sem revestimento de fibronectina. Os painéis mostram imagens

representativas dos miócitos cardíacos primários cultivados em meio de crescimento (10% de SFB) por 7 dias (A,C,E,G) em substratos sem revestimento de fibronectina e nos substratos revestidos com fibronectina (B,D, F,H). Em azul o núcleo celular marcado com DAPI e em vermelho os filamentos de actina marcado com Faloidina –Alexa Fluor 546. A barra de escala corresponde a 50 μm . As setas brancas indicam células com mais de um núcleo. Aumento 10X.

Em paralelo às imagens de epifluorescência convencionais, as amostras foram também avaliadas usando um microscópio de fluorescência acoplado ao sistema Apotome para melhor visualização das culturas semeadas sobre os diferentes substratos 3D. As imagens coletadas com o sistema ApoTome confirmam a cultura de CMs em uma estrutura tridimensional bem-sucedida. Através das imagens podemos evidenciar uma interação dos CMs com as nanofibras, demonstrando uma colonização efetiva nesses substratos. Adicionalmente, as imagens dos cortes transversais das culturas de CMs, revelaram que as culturas semeadas sobre os substratos 3D apresentaram um eixo Z duas vezes maior quando comparados com os CMs cultivados na placa de cultura (figura 17).



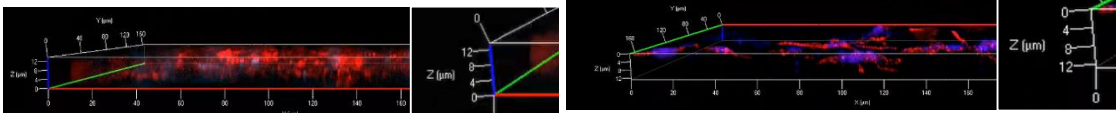


Figura 17 – Vista do topo e corte transversal dos cardiomiócitos aderidos a placa de cultura (A), as nanofibras de AC (B), as nanofibras AC/bixina (C) e a matriz de colágeno (D) após 7 dias de cultivo em DMEM 10%. Aumento 40X. Em azul o marcador nuclear, DAPI, e em vermelho a sonda faloidina, marcador do filamento de actina. A barra de escala corresponde a 20 μm .

4.8 Caracterização das miócitos cardíacos primários cultivados nas nanofibras de AC e ACU por MEV

2×10^5 células foram semeadas na sobre os diferentes substratos e mantidas em cultivo por 7 dias. Após esse período, o material foi processado para análise por MEV, de acordo com o protocolo descrito no item materiais e métodos. As imagens obtidas revelaram uma alta densidade celular para aquelas culturas semeadas sobre as nanofibras em relação àquelas cultivadas sobre lamínulas de vidro, em concordância com os dados obtidos anteriormente através do teste de viabilidade por MTT (Figura 15). As células observadas apresentaram um aspecto morfológico homogêneo nas nanofibras revestidas ou não com fibronectina (Figura 18). Em sua maioria se mostraram com formato estalado, com diversos pontos de adesão a outras células e às fibras da membrana. As imagens de MEV na matriz de colágeno revelaram uma baixa densidade celular, diferente do observado nas outras matrizes tridimensionais. Além disso, é possível observar que as células estavam contraindo a matriz de colágeno, apresentando uma morfologia menos achatada.

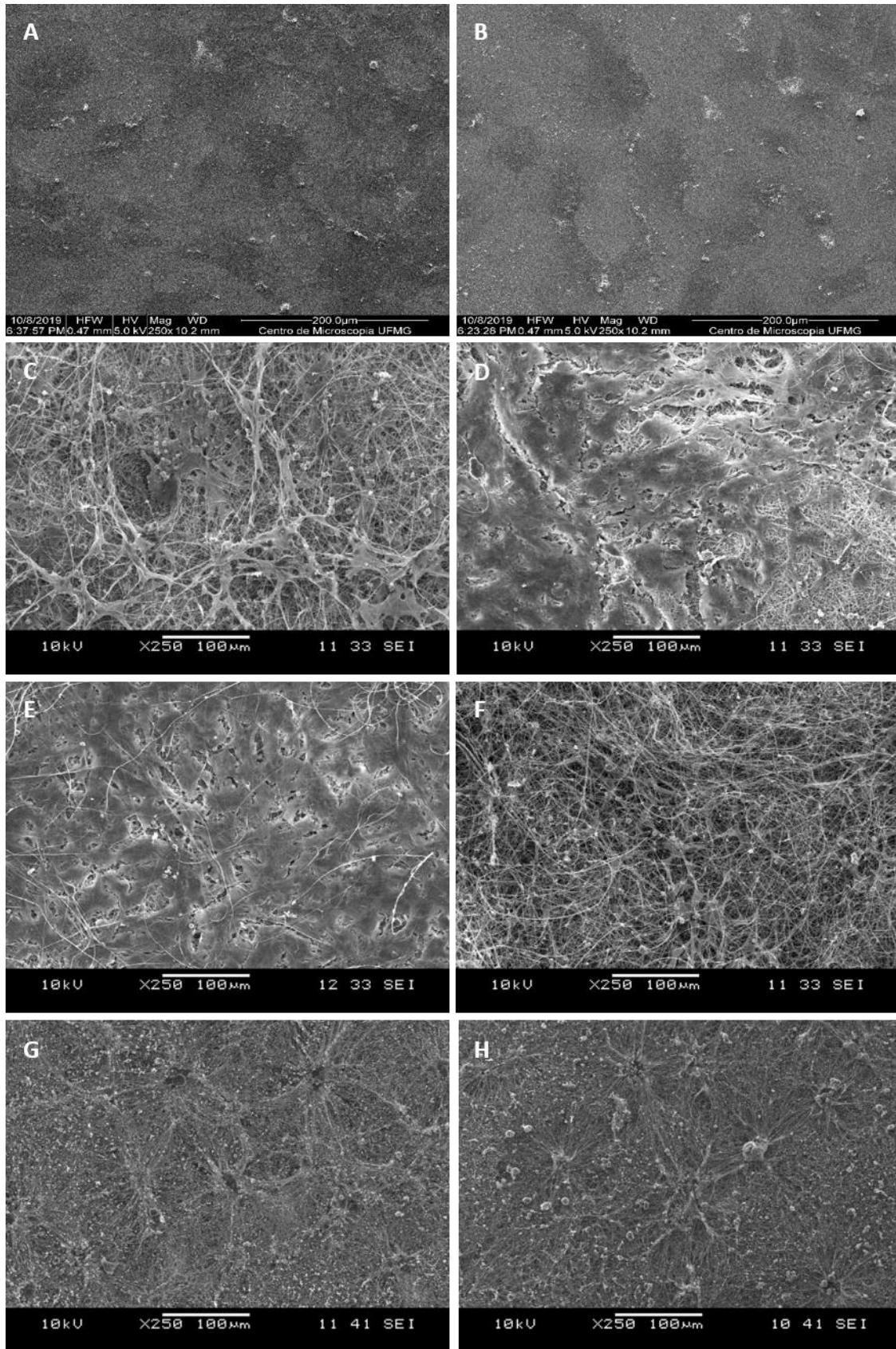


Figura 18 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando cardiomiócitos primários cultivados em diferentes substratos após 7 dias de cultura, com magnificação de 250x. Os painéis mostram imagens representativas de miócitos cardíacos primários cultivadas sobre lamínulas de vidro

(A,B), nanofibras de acetato de celulose (C,D), nanofibras de acetato de celulose com urucum (E,F) e matriz de colágeno tipo I (G,H), com e sem revestimento de fibronectina. Os painéis mostram imagens representativas dos miócitos cardíacos primários cultivados em meio de crescimento (10% de SFB) por 7 dias (A,C,E,G) em substratos sem revestimento de fibronectina e nos substratos revestidos com fibronectina (B,D,F,H). A barra de escala corresponde a 100 μm .

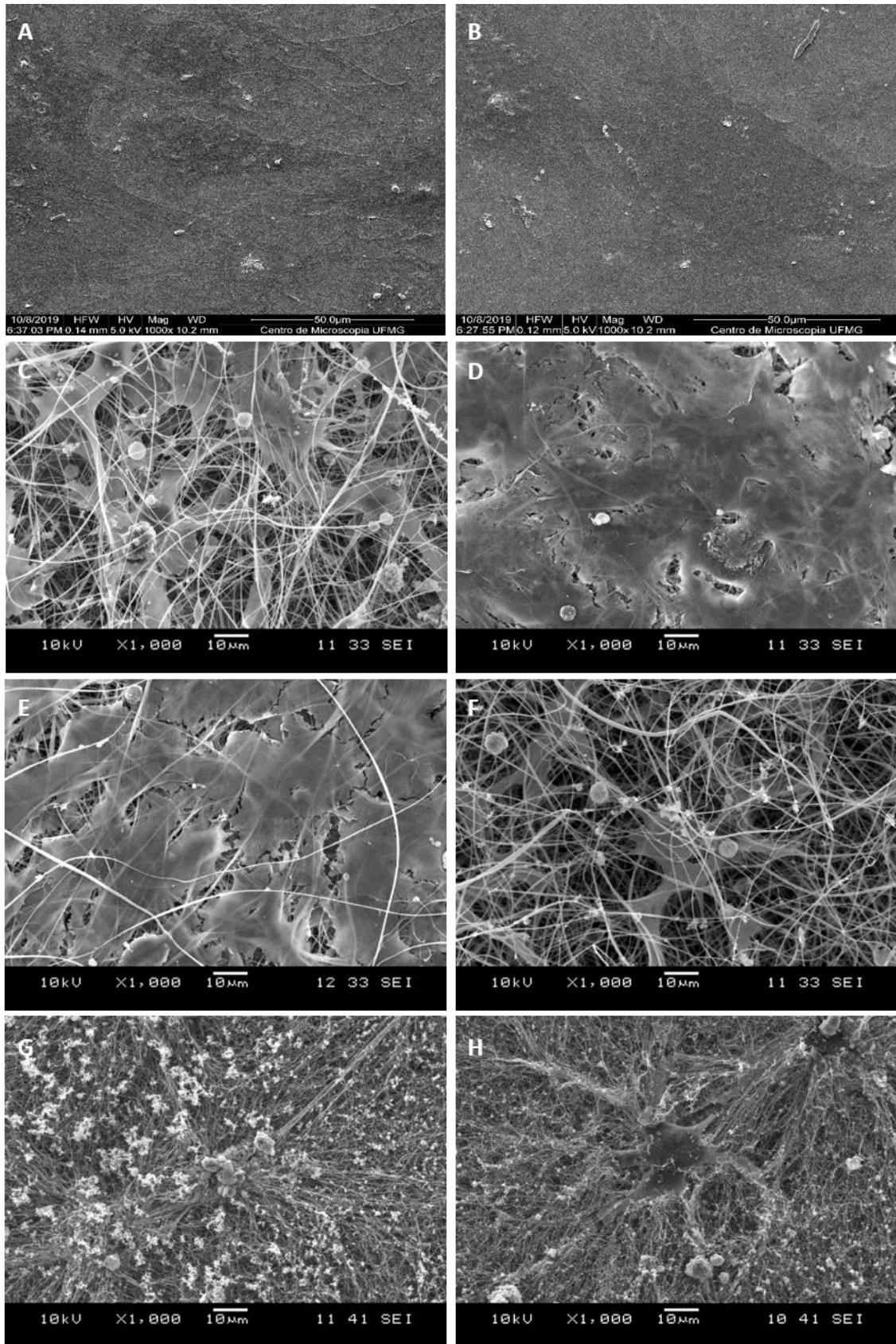


Figura 19 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando cardiomiócitos primários cultivados em diferentes substratos após 7 dias de cultura, com magnificação de 1000x. Os painéis mostram imagens representativas de miócitos cardíacos primários cultivadas sobre lamínulas de vidro

(A,B), nanofibras de acetato de celulose (C,D), nanofibras de acetato de celulose com urucum (E,F) e matriz de colágeno tipo I (G,H), com e sem revestimento de fibronectina. Os painéis mostram imagens representativas dos miócitos cardíacos primários cultivados em meio de crescimento (10% de SFB) por 7 dias (A,C,E,G) em substratos sem revestimento de fibronectina e nos substratos revestidos com fibronectina (B,D,F,H). A barra de escala corresponde a 10 μm .

5. DISCUSSÃO

Segundo a organização mundial da saúde (WHO, 2017) as doenças cardiovasculares estão entre as de maior prevalência no mundo e são as maiores responsáveis por degeneração do tecido muscular com comprometimento de função do coração e sobrevida do paciente. Ataques cardíacos e derrames são geralmente eventos agudos e são causados principalmente por um bloqueio que impede que o sangue flua para o coração ou cérebro. O infarto agudo do miocárdio ou ataque cardíaco pode causar danos irreversíveis para o coração do paciente, como perda extensiva de células cardíacas e substituição do tecido necrosado por um tecido cicatricial (RAO et al., 2011). Embora as intervenções cirúrgicas atuais envolvam ponte de safena, angioplastia com balão e *stent*, elas geralmente são muito limitadas em trazer de volta a função normal do coração (SUHAERI et al., 2016). Nesse sentido, a engenharia de tecidos cardíaca é uma promissora alternativa para os tratamentos atuais.

A engenharia de tecidos cardíaca se baseia na possibilidade de auxiliar a regeneração de tecidos danificados. O substituto ideal deve mimetizar o tecido *in vivo*, e isso pode ser conseguido através do uso de biomateriais que servem como um suporte para que as células cardíacas possam aderir, proliferar, diferenciar e manter suas funções (Gomes e Reis, 2004). Atualmente, o uso de biomateriais funcionalizados com moléculas bioativas derivadas de óleos essenciais recebeu bastante atenção devido a suas propriedades regenerativas e bactericidas (LIAKOS et al., 2017). Dessa forma, as moléculas bioativas do urucum parecem ter propriedades promissoras para aplicações dentro da engenharia de tecidos cardíaca.

Várias matrizes estruturais compostas de acetato de celulose (AC) vêm sendo desenvolvidas e apresentam biocompatibilidade com diferentes tipos celulares. A mudança na composição das nanofibras de AC podem variar a morfologia da fibra, a biocompatibilidade, as propriedades mecânica, entre outros (RUBENSTEIN et al., 2010; CHAINOGLU et al., 2016). No tecido cardíaco, a MEC do miocárdio consiste em uma matriz estrutural complexa composta principalmente por colágeno fibrilar tipo I (80%) e tipo III (11%) e menores quantidades de colágeno tipo IV e tipo V, juntamente com glicosaminoglicanos. O colágeno forma uma matriz complexa de nanofibras, responsável não apenas pelo apoio e alinhamento dos cardiomiócitos e vasos sanguíneos, mas também pela rigidez do miocárdio.

Para a fabricação das nanofibras de acetato de celulose associada ou não ao urucum utilizamos a técnica de eletrofiação. Segundo Araujo (2007) e de acordo com os resultados obtidos, essa técnica permite a produção de matrizes estruturais capazes de mimetizar a

estrutura das fibras de colágeno da matriz extracelular (MEC). De fato, foi possível obter membranas com fibras de diâmetro de 216-980nm para nanofibras de AC e 110-595nm para nanofibras de ACU, que favoreceram a adesão celular de modo eficiente e adequado. De acordo com os resultados obtidos por Chen e colaboradores (2007) células NIH 3T3 apresentaram melhor adesão em *scaffolds* eletrofiados de menor diâmetro, e uma possível razão para esse fenômeno é devido ao aumento da área superficial do *scaffold*. Como as fibras de menor diâmetro oferecem maior área de superfície, mais proteína de adesão pode ser absorvida por elas, oferecendo assim um maior número de pontos de adesão focal disponíveis para fixação celular. Dessa forma, a diminuição do diâmetro médio das nanofibras de ACU pode favorecer a adesão celular.

No presente estudo decidimos avaliar a citotoxicidade e a morfologia de uma linhagem de mioblastos cardíacos *in vitro*. Como modelo de estudo utilizamos a linhagem de mioblastos cardíacos H9c2, que são células derivadas da parte ventricular do coração de um rato BDIX, e que têm sido extensivamente aplicadas como modelo para células cardíacas em uma multiplicidade de estudos como os mecanismos de diferenciação cardíaca, hipertrofia cardíaca, cardiotoxicologia, isquemia/lesão por reperfusão, estresse oxidativo, entre outros (PEREIRA et al., 2011).

O termo biocompatibilidade não é definido apenas pela falta de citotoxicidade do material, mas também por sua biofuncionalidade, o que lhe permite suportar as interações entre as células e a matriz, além de desempenhar a função específica do local onde o constructo será aplicado (WILLIAMS, 2008). Como já demonstrado por Rodriguez e colaboradores (2012) nanofibras de acetato de celulose são biocompatíveis. Nesse trabalho confirmamos a biocompatibilidade de nanofibras de acetato de celulose associadas ou não ao urucum de células H9c2, através do ensaio de MTT. O ensaio de MTT é o mais aplicado para a avaliação da citotoxicidade, sendo um ensaio colorimétrico que avalia a viabilidade e proliferação celular (ONUKE et al., 2008). Esse ensaio é realizado para avaliação da biocompatibilidade de vários tipos de biomateriais, utilizando diferentes tipos de linhagens celulares (VALERIO et al., 2004; GUO et al., 2009). Através do ensaio de MTT, foi confirmando que a adição do extrato bruto do urucum não alterou a biocompatibilidade nesse material. Além disso, os resultados obtidos através de imunofluorescência e MEV demonstraram que as células H9c2 foram capazes de aderir à membrana de AC e ACU e estabelecer conexões entre células.

Adicionalmente analisamos a proliferação através do MTT, segundo Koyanagi, Kawakabe e Arimura (2015) o ensaio de MTT é um método indireto de proliferação celular, que utiliza a atividade de enzimática das células, em vez da estimativa direta do número de células em proliferação. De fato, foi observado que as amostras de nanofibras de AC e ACU no período de 48h e 7 dias de cultivo mantiveram o número de células estáveis, o que pode indicar a parada da capacidade proliferativa dessas células.

A avaliação morfológica das células H9c2 nos substratos tridimensionais foi feita através da marcação dos filamentos de actina. Nesta perspectiva, vimos a morfologia celular como um parâmetro potencial na avaliação das respostas celulares em diferentes microambientes. Os mioblastos H9c2 são células em forma de fuso a estreladas que podem ser mono- ou multinucleadas (SARDÃO et al., 2008). Os resultados obtidos através da marcação do filamento de actina mostraram a morfologia das células na placa de cultura de forma semelhante a descrição da Sardão e colaboradores (2008), e as células crescidas nas nanofibras de AC e ACU após 24 e 48 horas apresentaram morfologia alongada, com células próximas umas das outras, apresentando um arranjo mais ordenado.

As células H9c2, possuem um fenótipo proliferativo e relativamente indiferenciado, mas podem ser direcionadas para diferenciar sob condições séricas reduzidas, originando células que apresentam características musculares. Os fenótipos esqueléticos ou cardíacos podem ser originados dependendo se a redução sérica é acompanhada ou não de um tratamento diário com ácido all-trans-retinóico (AR) (PEREIRA e colaboradores, 2011). Dessa forma, avaliamos a capacidade de diferenciação das células H9c2 nas nanofibras através da marcação do citoesqueleto de actina sob condições séricas reduzidas e adição de AR. As células diferenciadas cultivadas em lamínulas de vidro aparecem como células multinucleadas longas ramificadas, o que indica a formação de miócitos cardíacos. As células cultivadas sobre as nanofibras apresentaram morfologia semelhante as células cultivadas sobre a lamínula de vidro com e sem meio de diferenciação. O aspecto morfológico e as células multinucleadas podem indicar que essas células sofreram um processo de diferenciação, formando cardiomiócitos nos substratos tridimensionais sem a necessidade de estímulos.

Em relação à proliferação celular, foi demonstrado anteriormente que o processo de diferenciação inicia uma parada do ciclo celular, o que diminui a proliferação celular (BRANCO et al., 2015). O menor número de células nas nanofibras e morfologia longa e alongada pode estar relacionado a uma maior capacidade de diferenciação em matrizes

nanofibras. A diferenciação de mioblastos em miotubos, de fato, depende de dois eventos críticos e relacionados: cessação da proliferação e contatos de ponta a ponta entre mioblastos (CLARK et al., 2002). A diminuição da taxa de proliferação celular poderia, portanto, ser considerada, neste caso, como uma condição favorável para um processo de diferenciação mais sustentado. O que corrobora com o resultado encontrado no MTT. Os resultados atuais são prematuros para reivindicar uma forte correlação entre características morfológicas e diferenciação celular, o que necessitaria uma análise fenotípica, de marcadores específicos de diferenciação nas células cardíacas.

Após a avaliação e comprovação da biocompatibilidade *in vitro* das nanofibras de AC e ACU em mioblastos cardíacos de linhagem, avaliamos miócitos cardíacos primários através de ensaios de MTT, fluorescência para actina e MEV, nesses substratos. Nesse trabalho utilizamos uma cultura de cardiomiócitos obtidos de embriões de camundongos BALB/c. Essas células são uma fonte celular valiosa para muitos estudos em engenharia de tecidos cardíacos, como projeto de novos biomateriais (WILLIAMS et al., 2014). O desenvolvimento de CMs está fortemente relacionado às propriedades do microambiente, como rigidez da matriz, e sua nanotopografia. Alterações em qualquer uma dessas propriedades são detectadas pelas células e subsequentemente refletidas nas alterações do fenótipo e função celular (SUHAERI et al., 2016).

Uma importante abordagem para o sucesso da engenharia de tecidos é a obtenção de uma colonização celular eficaz do *scaffold*. A adesão celular é a fase inicial do processo de bioengenharia e influencia criticamente a morfologia celular e a função biológica. Os materiais sintéticos geralmente não têm sinais bioquímicos específicos, mas podem ser modificados para aumentar artificialmente a adesão celular (BURKE et al., 2017). Para isso, na literatura, as nanofibras de materiais sintéticos são funcionalizadas com fibronectina, ou com outras proteínas relevantes da MEC, como laminina e caderina. Uma das formas mais comuns de obter a funcionalização é através do revestimento das nanofibras com proteínas de adesão. A fibronectina é uma das proteínas da matriz extracelular, em particular é uma proteína de afinidade ligante-integrina, amplamente utilizada para o revestimento de placas de cultura de células para promover a adesão e a disseminação celular, mas também para a funcionalização de *scaffolds* eletrofiados (HU et al., 2018; LIVERANI; KILLIAN; BOCCACCINI, 2019).

Os dados de viabilidade através do ensaio de MTT corroboram com os dados encontrados para as células de linhagem H9c2, em que os CMs permaneceram viáveis nas nanofibras após 7 dias de cultivo. Para os CMs, os substratos tridimensionais apresentaram viabilidade maior em relação a cultura nas lamínulas de vidro. Além disso, não houve diferença na viabilidade das células cultivadas nos substratos com e sem revestimento de fibronectina. Esse dado é muito interessante, já que a maioria dos substratos sintéticos tridimensionais utilizam de revestimento com proteínas da MEC para promover uma adesão mediada por receptor, como fibronectina, colágeno e laminina, que apresentam seqüências de aminoácidos de ligação celular, como Arg-Gly-Asp (RGD). Nesse caso, a adesão livre de receptores pode estar ocorrendo por mecanismos físicos e químicos não específicos, como interações hidrofóbicas ou eletrostáticas, que se formam entre moléculas da membrana celular e grupos funcionais na superfície do material. Segundo Burke e colaboradores (2017), materiais à base de celulose exibem melhores propriedades de adesão do que a maioria das superfícies poliméricas, o que têm sido associado a um componente específico da tensão superficial (indicador de hidrofiliabilidade/hidrofobicidade do material) e a introdução de células em um microambiente polissacarídico através do *scaffold*, consistente com o glicocálice natural da célula.

A análise morfológica dos CMs através da marcação dos filamentos de actina mostrou uma morfologia circular com poucos prolongamentos dos CMs sobre a lamínula de vidro, e uma morfologia mais alongada com vários prolongamentos nos substratos tridimensionais. De acordo com Yang, Pabon e Murry (2014), os cardiomiócitos imaturos são circulares na morfologia, enquanto maduros as células têm o formato de bastão. Esses resultados podem sugerir diferentes desenvolvimentos do fenótipo celular em microambientes específicos, permitindo que os CMs neonatais imaturos se tornem maduros em nanofibras de AC e ACU.

Finalmente, a análise dos CMs através de imagens do MEV, corroborou os resultados encontrados no MTT e na marcação dos filamentos de actina. Imagens de MEV revelaram que os CMs cultivados sobre as nanofibras interagem tanto com a matrix, quanto com células ao seu redor. Como já mencionado anteriormente, uma importante abordagem para o sucesso da engenharia de tecidos é a obtenção de uma colonização celular eficaz do *scaffold*, ou seja, as células serem capazes de aderir e proliferar em toda a superfície livre da matriz. Como demonstrado pelas imagens de MEV, a superfície das nanofibras de AC e de ACU foram completamente cobertas por CMs.

Como demonstrado neste trabalho, nanofibras de acetato de celulose associadas ou não ao urucum apresentam características importantes relacionadas ao cultivo de cardiomiócitos. Embora os resultados *in vitro* não comprovem o efeito da diferenciação dos mioblastos cardíacos nos diferentes substratos, as imagens indicam que o comportamento dessas células é alterado nessas matrizes, além disso, os dados *in vitro* do cultivo de cardiomiócitos primários demonstraram resultados promissores sobre a biocompatibilidade e sobrevivências dessas células nessas nanofibras.

6. CONCLUSÃO

Nossas conclusões são:

- 1 - As nanofibras de acetato de celulose demonstraram ser um bom substrato para a cultura de cardiomiócitos, em comparação ao colágeno;
- 2 - A incorporação de urucum em nanofibras de acetato de celulose não interferiu no crescimento ou morfologia celular;
- 3- As nanofibras de acetato de celulose não precisam de revestimento prévio com fibroectina para melhorar seu desempenho;
- 4 - As células cultivadas em substratos 3D mostram melhor distribuição espacial e morfologia quando comparadas às células cultivadas em monocamada.

7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. V., A. MARTINS, *et al.* Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. **J Biomater Sci Polym Ed**, v.19, n.10, p.1261-78. 2008.
- ARNAL-PASTOR, M. *et al.* Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering. **Regenerative Medicine And Tissue Engineering**, [s.l.], p.0-2, 22 maio 2013.
- BADIMON, Lina; PADRÓ, Teresa; VILAHUR, Gemma. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. **European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.60-74, abr. 2012
- BRANCO, Ana F. *et al.* Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 6, 29 jun. 2015.
- BODEN, William E.; EAGLE, Kim; GRANGER, Christopher B.. Reperfusion Strategies in Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 50, n. 10, p.917-929, set. 2007. Elsevier BV.
- BURKE, Madeline *et al.* Regulation of Scaffold Cell Adhesion Using Artificial Membrane Binding Proteins. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 17, n. 7, p.0-2, 24 fev. 2017.
- CLARK, P. *et al.* Alignment of myoblasts on ultrafine gratings inhibits fusion in vitro. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.816-825, jul. 2002.
- CHAINOGLU, Eirini *et al.* Development of Biofunctionalized Cellulose Acetate Nanoscaffolds for Heart Valve Tissue Engineering. **World Journal Of Nano Science And Engineering**, [s.l.], v. 06, n. 04, p.129-152, 2016.
- CHEN, Ming *et al.* Role of Fiber Diameter in Adhesion and Proliferation of NIH 3T3 Fibroblast on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. **Tissue Engineering**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.579-587, mar. 2007.
- CLEUTJENS, J. The infarcted myocardium Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.232-241, nov. 1999.
- CURTIS, Matthew W.; RUSSELL, Brenda. Cardiac Tissue Engineering. **The Journal Of Cardiovascular Nursing**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.87-92, mar. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
- DE SOUSA, A.R.; DORNAS, G.P.; CARVALHO. I.C., DA SILVA SANTOS, R. F. *International Journal of Polymer Science*, 1–12, 2016.
- FLEISCHER, T.C., AMEADE, E.P.K., MENSAH, M.L.K., SAWER, I.K., Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixaorellana*. **Fitoterapia**, 74, 136–138, 2003.
- GREULICH, Simon *et al.* Time-Dependent Myocardial Necrosis in Patients With ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction Without Angiographic Collateral Flow Visualized

by Cardiac Magnetic Resonance Imaging: Results From the Multicenter STEMI - SCAR Project. **Journal Of The American Heart Association**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.0-2, 18 jun. 2019.

GUO, H., J. Su, *et al.* Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca- deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, v.5, n.1, Jan, p.268-78. 2009.

HU, Qiongying *et al.* FGFR1 is essential for N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline regulation of mitochondrial dynamics by upregulating microRNA let-7b-5p. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 495, n. 3, p.2214-2220, jan. 2018.

KELLY, D. R. *et al.* ChemInform Abstract: NMR, MS and X-Ray Crystal Structure Determination of the Bixin Family of Apocarotenoids.. **Cheminform**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.0-0, 4 ago. 2010. Wiley.

KOYANAGI, Madoka; KAWAKABE, So; ARIMURA, Yutaka. A comparative study of colorimetric cell proliferation assays in immune cells. **Cytotechnology**, [s.l.], v. 68, n. 4, p.1489-1498, 18 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

KONWARH, Rocktotpal; KARAK, Niranjan; MISRA, Manjusri. Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.421-437, jul. 2013.

LANGER, R; VACANTI, J.. Tissue engineering. **Science**, [s.l.], v. 260, n. 5110, p.920-926, 14 maio 1993. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LAW, Jia Xian e colaboradores. Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering. **Tissue Engineering And Regenerative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.699-718, 10 ago. 2017. Springer Nature.

LI, Xianchi *et al.* Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.3823-3829, 7 nov. 2016.

LIAKOS, Ioannis *et al.* Electrospun Fiber Pads of Cellulose Acetate and Essential Oils with Antimicrobial Activity. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 7, n. 4, p.84-87, 12 abr. 2017.

LIVERANI, Liliana; KILLIAN, Manuela S.; BOCCACCINI, Aldo R.. Fibronectin Functionalized Electrospun Fibers by Using Benign Solvents: Best Way to Achieve Effective Functionalization. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [s.l.], v. 7, p.342-345, 3 abr. 2019

MCCULLEN, S. D., D. R. STEVENS, *et al.* Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. **Int J Nanomedicine**, v.2, n.2, p.253-63. 2007.

MUÑOZ, Patricia *et al.* Bloodstream Infections After Invasive Nonsurgical Cardiology Procedures. **Archives Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 161, n. 17, p.2110-2115, 24 set. 2001. American Medical Association (AMA).

MUSUNURU, Kiran *et al.* Interdisciplinary Models for Research and Clinical Endeavors in Genomic Medicine: A Scientific Statement From the American Heart

Association. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.0-2, jun. 2018.

NIELSEN, Jens Cosedis; GERDES, Jens Christian; VARMA, Niraj. Infected cardiac-implantable electronic devices: prevention, diagnosis, and treatment. **European Heart Journal**, [s.l.], v. 36, n. 37, p.2484-2490, 5 mar. 2015.

NOF, Eyal; EPSTEIN, Laurence M.. Complications of cardiac implants: handling device infections. **European Heart Journal**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.229-236, 22 out. 2012. Oxford University Press (OUP).

NOVAKOVIC, G. Vunjak; ESCHENHAGEN, T.; MUMMERY, C.. Myocardial Tissue Engineering: In Vitro Models. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.014076-014076, 1 mar. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory.

ONUKEI, Y., U. Bhardwaj, *et al.* A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J Diabetes Sci Technol*, v.2, n.6, Nov, p.1003-15. 2008.

PACHECO, Samanta Daliana Golin et al. Antioxidant and effects of processing using bixin potassium salt as a nitrite replacement in restructured meat products. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.4-23, 30 out. 2018.

PAGNAN, C. S.; MOTTIN, A. C.; ORÉFICE, R. L.; AYRES, E.; CÂMARA, J. J. D. Annatto-colored Poly(3-hydroxybutyrate): A Comprehensive Study on Photodegradation. **Journal of Polymers and the Environment**, 1572-8900, 2017.

PEREIRA, Sandro L. et al. Metabolic Remodeling During H9c2 Myoblast Differentiation: Relevance for In Vitro Toxicity Studies. **Cardiovascular Toxicology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.180-190, 24 mar. 2011. Springer Science and Business Media LLC.

RAHMALIA, Winda; FABRE, Jean-françois; MOULOUNGUI, Zéphirin. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. **Procedia Chemistry**, [s.l.], v. 14, p.455-464, 2015. Elsevier BV.

RAO, K. R. S.sambasiva et al. Myocardial infarction and stem cells. **Journal Of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.182-185, 2011.

REZAEI, Atefe; NASIRPOUR, Ali; FATHI, Milad. Application of Cellulosic Nanofibers in Food Science Using Electrospinning and Its Potential Risk. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.269-284, 17 fev. 2015. Wiley.

RICHARDSON, William J. et al. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. **Comprehensive Physiology**, [s.l.], p.1877-1909, 20 set. 2015. John Wiley & Sons, Inc.

RICOTTI, Leonardo et al. Proliferation and skeletal myotube formation capability of C2C12 and H9c2 cells on isotropic and anisotropic electrospun nanofibrous PHB scaffolds. **Biomedical Materials**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.1-5, 5 abr. 2012. IOP Publishing.

RIM, Nae Gyune; SHIN, Choongsoo S; SHIN, Heungsoo. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. **Biomedical Materials**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.014102-014102, 25 jan. 2013. IOP Publishing.

RIVERA-MADRID, Renata et al. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 7, p.1-7, 21 set. 2016. Frontiers Media SA.

RODRIGUES, Isabella Caroline Pereira et al. Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. **Einstein (são Paulo)**, [s.l.], v. 16, n. 3, p.1-2, 21 set. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

RODRÍGUEZ, Katia; GATENHOLM, Paul; RENNECKAR, Scott. Electrospinning cellulosic nanofibers for biomedical applications: structure and in vitro biocompatibility. **Cellulose**, [s.l.], v. 19, n. 5, p.1583-1598, 19 jun. 2012.

ROSTAD, Christina A. et al. Bacterial infections after pediatric heart transplantation: Epidemiology, risk factors and outcomes. **The Journal Of Heart And Lung Transplantation**, [s.l.], v. 36, n. 9, p.996-1003, set. 2017. Elsevier BV.

RUBENSTEIN, David A. et al. In Vitro Biocompatibility of Sheath–Core Cellulose-Acetate-Based Electrospun Scaffolds Towards Endothelial Cells and Platelets. **Journal Of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [s.l.], v. 21, n. 13, p.1713-1736, jan. 2010.

RUIZ, Matthieu et al. A Cardiac-Specific Robotized Cellular Assay Identified Families of Human Ligands as Inducers of PGC-1 α Expression and Mitochondrial Biogenesis. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1-5, 3 out. 2012. Public Library of Science (PLoS).

SARDÃO, Vilma A. et al. Morphological alterations induced by doxorubicin on H9c2 myoblasts: nuclear, mitochondrial, and cytoskeletal targets. **Cell Biology And Toxicology**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.227-243, 3 abr. 2008.

SCOTTER, M.. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.1123-1145, ago. 2009.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, Luqman J.; MOHAMMAD, Faqeer. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications – A review. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.499-514, maio 2016. Elsevier BV.

STOHS, Sidney J.. Safety and Efficacy of *Bixa orellana* (Achiote, Annatto) Leaf Extracts. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 28, n. 7, p.956-960, 4 dez. 2013. Wiley-Blackwell.

STRATTON, Scott e colaboradores Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. **Bioactive Materials**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.93-108, dez. 2016.

SILVA, Pollyanna Ibrahim; NACHTIGALL, Aline Manke; STRINGHETA, Paulo Cesar. EFICIÊNCIA DE SOLVENTES NA OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CORANTES DE URUCUM (*Bixa orellana* L.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s.l.], v. 28, n. 1, 8 jul. 2010. Universidade Federal do Parana.

SUHAERI, Muhammad e colaboradores Novel Platform of Cardiomyocyte Culture and Coculture via Fibroblast-Derived Matrix-Coupled Aligned Electrospun Nanofiber. **Acs Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.224-235, 20 dez. 2016. American Chemical Society (ACS).

SUNDARAMURTHI, Dhakshinamoorthy; KRISHNAN, Uma Maheswari; SETHURAMAN, Swaminathan. Electrospun Nanofibers as Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Polymer Reviews**, [s.l.], v. 54, n. 2, p.348-376, 3 abr. 2014. Informa UK Limited.

SUTTON, Martin G. St. John; SHARPE, Norman. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. **Circulation**, [s.l.], v. 101, n. 25, p.2981-2988, 27 jun. 2000.

TAHAM, Thiago; CABRAL, Fernando A.; BARROZO, Marcos A.s.. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 100, p.175-183, maio 2015.

THYGESEN, Kristian; ALPERT, Joseph S.; WHITE, Harvey D.. Universal Definition of Myocardial Infarction. **Journal Of The American College Of Cardiology**, [s.l.], v. 50, n. 22, p.2173-2195, nov. 2007. Elsevier BV.

TRUFFA, Adriano A.m. et al. Serious Infection After Acute Myocardial Infarction. **Jacc: Cardiovascular Interventions**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.769-776, jul. 2012. Elsevier BV.

VALERIO, P., M. M. Pereira, *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v.25, n.15, Jul, p.2941-8. 2004.

VIUDA-MARTOS, Manuel et al. In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) Leaves and Seeds. **Journal Of Food Safety**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.399-406, 7 set. 2012. Wiley.

VOGEL, Birgit et al. ST-segment elevation myocardial infarction. **Nature Reviews Disease Primers**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.0-2, 6 jun. 2019.

WILLIAMS, C. et al. Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.194-204, jan. 2014.

YANG, Xiulan; PABON, Lil; MURRY, Charles E.. Engineering Adolescence. **Circulation Research**, [s.l.], v. 114, n. 3, p.511-523, 31 jan. 2014.

ZHAO, Peng e colaboradores Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review. **Frontiers Of Mechanical Engineer[ing]**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.107-119, 19 dez. 2017. Springer Nature.