UNIVERSIDADE DE SOROCABA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Fernanda Gomes Leite

AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS INFARTADOS SUBMETIDOS A IMPLANTE DE BIOMATERIAIS

Sorocaba/SP 2021

Fernanda Gomes Leite

AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS INFARTADOS SUBMETIDOS A IMPLANTE DE BIOMATERIAIS

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Grotto. Co-Orientador: Prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho

Sorocaba/SP 2021

Ficha Catalográfica

L552a	Leite, Fernanda Gomes Avaliação do perfil bioquímico e estresse oxidativo em ratos infartados submetidos a implante de biomateriais / Fernanda Gomes Leite. – 2021. 70 f. : il.
	Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto Coorientadora: Prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.
	 Infarto do miocárdio. 2. Materiais biomédicos. 3. Estresse oxidativo. I. Grotto, Denise, orient. II. Silveira Filho, Lindemberg da Mota, coorient. III. Universidade de Sorocaba. IV. Título.

Elaborada por Regina Célia Ferreira Boaventura - CRB-8/6179

Fernanda Gomes Leite

AVALIAÇÃO DO PERFIL BIOQUÍMICO E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS INFARTADOS SUBMETIDOS A IMPLANTE DE BIOMATERIAIS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba

Aprovado em: 18/03/2021

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Grotto Universidade de Sorocaba

Profa. Dra. Raquel de Mendonça Rosa-Castro Universidade de Sorocaba

> Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta Universidade de São Paulo

A dissertação a seguir é dedicada para todas as mulheres.

Para elas que, assim como eu, fazem ciência.

E para elas que estão concentradas em outras áreas.

Pois se foi uma luta chegar até aqui, dedico a minha vitória para todas nós que enfrentamos diariamente o peso (e o presente) de ser mulher nestes tempos.

AGRADECIMENTOS

Disseram-me que aqui eu poderia agradecer. E como eu seria feliz, se pudesse traduzir em texto, todos os meus presentes sentimentos.

Dentre todos os textos que escrevi durante estes anos, nada se comparou ao texto a seguir. Nunca achei que encerrar ciclos fosse uma tarefa fácil, ainda mais quando há tanto a agradecer. Então, permita-me tentar. Pois de todas as histórias que já escrevi, essa com certeza é a minha favorita.

Há professores e professores, não é mesmo? E creio que este ciclo se iniciou graças à minha professora, orientadora, amiga e até mesmo um pouco mãe, mesmo que meus 24 anos claramente não caibam em sua idade. Ela me ensinou muito, e me fez crescer não apenas academicamente, mas também como pessoa. Se eu dedico meu sucesso a alguém, com certeza ela é a primeira da lista. Espero um dia conseguir agradecê-la devidamente por todos os conselhos, ensinamentos e auxílio (e por sempre me ajudar a voar mais alto).

Mas também tive outra professora; ela, por sua vez, não ocupa o cargo oficialmente, mas me ensinou tanto que hoje acredito que não precisou do cargo para poder honrá-lo. Fez parte da minha vida pessoal e acadêmica, estando presente em momentos decisivos da minha graduação. Queria eu poder agradecê-la ou me despedir sem chorar, mas, isto sempre pareceu impossível.

E o acolhimento foi tão intenso, que hoje me sinto parte até mesmo de onde não fui parte. Minha gratidão à professora e amiga, que me acolheu como sua aluna também. Agradeço por todas as risadas e todos os conselhos. Sei que se não fosse ela, não haveria cruzado com tantas pessoas maravilhosas.

Dentre elas, talvez meu encontro (ou reencontro) com meu companheiro, tenha sido a melhor surpresa que este ciclo me proporcionou. Quase três anos do meu nó favorito. Do nó que me apoia e me ajuda como pode. Do nó que virou o mais maravilhoso nós e só nos faz crescer.

Mas há outros amores, sabe? Há o amor amigo, que acompanha, conversa e aconselha. E queria dizer que não sei onde estaria hoje, se não fossem as pessoas maravilhosas que tive o prazer de conviver. A minha gratidão é inexpressível, e eu gostaria que eles soubessem que, depois de

tantos anos, sei que sempre levarei comigo um pedaço de cada um. Aqui, também não lhes darei nomes, pois são muitos. Poderia gastar todas as páginas citando-os, pois tive a sorte de encontrar as melhores pessoas.

E todas as pessoas citadas até o momento, são para mim uma grande família. Uma divertida, diversa e inesquecível família. Elas foram a maior, e melhor, parte de mim. Agradeço por todo aprendizado, amizade e cuidado.

E se há a minha família de muitos anos, há outra que veio a mim apenas quando comecei o mestrado.

Então, ao meu professor de pouco tempo, que me ensinou tudo o que podia neste período, deixo expressa a minha gratidão. Levarei comigo os ensinamentos, as conversas engraçadas e discussões centradas, pois todas nos moldaram como equipe. Aliás, não posso deixar de agradecer a todos os membros desta equipe, que fizeram os dias longos passarem mais rápido, e os momentos mais densos se tornarem mais leves. Meu mais sincero: obrigada!

E veja bem, que significado essa palavra tem, não? "Família". Penso que esta palavra é muito maior do que seu curto significado encontrado nos livros. Assim, não posso deixar de agradecer à minha família de sangue; meus pais, meus avós e, principalmente, minha irmã, com quem dividi não apenas uma casa, mas as tristezas e alegrias desta jornada. Brindamos e festejamos juntas, adotamos dois gatos e provamos, inclusive para nós mesmas, que somos muito maiores do que os nossos problemas.

Há ainda outra família que, com muito carinho, me adotou nos últimos anos. Um presente gigantesco que meu companheiro me trouxe. Pois se ele se fez meu abrigo desde o início, com certeza meus sogros me acolheram como filha, e fizeram me sentir em casa. Não tenho palavras para agradecer o cuidado deles, e penso que talvez nunca tenha.

Bem, os ciclos são assim, sabe? Dão lugar para novos começos, mas nem por isso deixam de ser difíceis. Porém, penso eu, que posso ficar feliz. Sim, é difícil mudar. Mas, ao mesmo tempo, é fantástico ter estas pessoas maravilhosas na minha vida, assim como todo seu apoio; além disto, fins não significam, necessariamente, um adeus (e é o que me deixa feliz).

Ao fim, agradeço de coração a todos que fizeram parte deste ciclo! Pois eu não seria nada sem vocês.

"Não é esplêndido pensar em todas as coisas que há por descobrir? Isso simplesmente me deixa feliz por estar viva... o mundo é interessante demais. E ele não seria interessante assim se já soubéssemos de tudo, não é mesmo?"

(Anne de Green Gables - Lucy Maud Montgomery)

RESUMO

As doenças cardíacas isquêmicas são responsáveis por boa parte de todas as mortes no mundo. O infarto agudo do miocárdio (IAM) é um evento crítico para geração excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) e resulta no quadro de estresse oxidativo. O tratamento para o IAM é baseado em medicamentos e na necessidade de rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo. O uso de scaffolds têm recebido grande atenção por sua capacidade de fornecer suporte para o crescimento celular, apresentando uma alternativa para regeneração ou melhora do remodelamento miocárdico após IAM. Entretanto, a segurança no uso de novos dispositivos precisa ser investigada. O objetivo do trabalho foi avaliar a segurança do implante de patches de biomateriais na melhora da função do músculo cardíaco infartado. Para o estudo, ratos machos Wistar (n = 10/grupo) foram submetidos a indução do IAM e duas semanas após, scaffolds 1 (com colágeno-quitosana-fibroína) e scaffolds 2 (com colágeno-fibroína+polianilina) foram implantados sobre o epicárdio infartado na forma de patches, e o sangue foi coletado (T1). Os animais foram monitorados por dois meses, quando ocorreu a eutanásia, nova coleta de sangue (T2) e retirada do fígado, rim. Análises bioquímicas, hematológicas e histológicas foram realizadas. Dentre os resultados obtidos, destaca-se a ausência de danos cardíacos associados aos scaffolds quando analisados Creatina-quinase porção (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH) e Troponina I. O scaffold 2 apresentou aumento nas transaminases hepáticas e nas enzimas antioxidantes. Quando ao perfil hematológico, ambos scaffolds se mostraram seguros. Assim, sugere-se que o scaffold 2 poderia desencadear sinais de hepatotoxicidade e ainda efeito próoxidante. Esses resultados ressaltam a importância dos estudos de segurança in vivo antes da aplicação destes dispositivos.

Palavras-chave: Infarto Agudo do Miocárdio; Biomateriais; Segurança; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Ischemic heart disease and acute myocardial infarction (AMI) - have been responsible for most of all deaths in the world. AMI is a critical event for the excessive generation of Reactive Oxygen Species (ROSs) and Reactive Nitrogen Species (RNSs), resulting in oxidative stress. Treatment for AMI is based on medication and the need for rapid restoration of blood flow. Scaffolds have received great attention due to their ability to provide support for cell growth, which may be an alternative to regenerate or induce better myocardial tissue remodeling after MI. However, the safety of new devices needs to be investigated. The aim of this study was to evaluate the safety of implanting biomaterial patches in function repair of the infarcted heart muscle. For the study, male Wistar rats (n = 10/group) underwent AMI and two weeks later scaffolds 1 (with collagen-chitosan-fibroin) and scaffolds 2 (with collagen-fibroin + polyaniline) were implanted and blood was collected (T1). The animals were monitored for two months, when euthanasia and new blood samples were collected (T2) and liver and kidneys were harvested. Biochemical, hematological and histological analyzes were performed. Among the results obtained, Creatine Kinase MB (CK-MB), Lactate Dehydrogenase (LDH) and Troponin I results suggested the scaffolds were not related to cardiac damage. In addition, scaffold 2 presented increase in liver transaminases and antioxidant enzymes. Regarding the hematological profile, both scaffolds were safe. Thus, scaffold 2 might have triggered signs of hepatotoxicity and pro-oxidant effect. These results emphasize the importance of *in vivo* safety studies for this type of devices application.

Keywords: Acute Myocardial Infarction; Scaffolds; Safety; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação de placa aterosclerótica a partir de acúmulo e oxidação do LDL na camada subendotelial, iniciando o processo inflamatório e infiltração de células fagocitárias, para formação das "Foam Cells" (células esponjosas). A placa aterosclerótica deposita-se na parede do vaso, reduzindo o seu calibre.
Figura 2: Espessuras da parede ventricular (linhas tracejadas são da parede do ventrículo direito; linhas azuis são da parede do ventrículo esquerdo; (LVC)) cavidade ventricular esquerda; (LVW) parede ventricular esquerda; (RVC) cavidade ventricular direita e (RVW) parede do ventrículo direito). Corada com Hematoxilina-Eosina
Figura 3: Ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio (coloração tricrômica de Masson). Zona de fronteira (<i>border zone</i>): transição do tecido saudável para o tecido infartado; zona remota (<i>remote zone</i>): apenas tecido saudável 17
Figura 4: Eventos crônicos após infarto do miocárdio e subsequente progressão para insuficiência cardíaca. A) Coração normal. B) Hipertrofia do coração gerada por sobrecarga após IAM
Figura 5: Representação de um coração infartado e da aplicação de um patch. Em A) tem-se um <i>scaffold</i> e em B) o <i>patch</i> 23
Figura 6: Fluxograma de desenvolvimento geral do projeto
Figura 7: Apresentação dos <i>scaffold</i> s 1 (A) e 2 (B) em tamanho padronizado para implante (seta preta)
Figura 8: Scaffold 1 suturado em coração de animal infartado
Figura 9: Cronograma dos procedimentos realizados in vivo, ao longo de 10 semanas

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

- AIA: Artéria Interventricular Anterior.
- ALT: Alanina Aminotransferase
- AST: Aspartato Aminotransferase
- CAT: Catalase.
- CK-MB: Creatinofosfoquinase Fração MB (Muscle and Brain)
- CONTROL: Grupo de animais com infarto sem tratamento.
- CV: Central Vein ou ramo na veia central.
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico.
- EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético.
- ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio.
- EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.
- GCS: Guanilato ciclase solúvel.
- GLDH: Glutamato desidrogenase.
- GPx: Glutationa peroxidase.
- GSH: Glutationa Reduzida.
- H&E: Hematoxilina e eosina.
- Ht: Hematócrito.
- Hb: hemoglobina.
- IAM: Infarto Agudo do Miocárdio.
- IC: Insuficiência Cardíaca.
- LDH: Lactato Desidrogenase.
- LDL: Low Density Lipoproteins ou Lipoproteínas de baixa densidade.
- MCH: Hemoglobina Corpuscular Média.
- MCHC: Concentração de hemoglobina corpuscular média.
- MDA: Malondialdeído.
- MQC: Monofosfato de guanosina cíclico.
- NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado.
- NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido.
- NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
- PLT: Plaquetas
- RBC: Red Bood Cells ou hemácias.
- RL: Radicais Livres.

S-CF: Grupo de animais com infarto + scaffold 1.

S-CFP: Grupo de animais com infarto + *scaffold* 2.

SHAM: Grupo de animais com simples exposição do coração.

T1: Tempo 1.

T2: Tempo 2.

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico.

MCV: Volume Corpuscular Médio.

VE: Ventrículo Esquerdo.

WBC: White Blood Cells ou leucócitos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11	
2 REVISÃO DE LITERATURA	13	
2.1 Doenças Cardiovasculares	13	
2.2. Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)	13	
2.2.1 Fisiopatologia	13	
2.2.2 Estresse Oxidativo	17	
2.2.3. Tratamento	20	
2.2.4 Consequências	21	
2.3 Scaffolds	23	
2.4 Avaliação toxicológica e de segurança de novos produtos	26	
3 OBJETIVOS	29	
3.1 Geral	29	
3.2 Específicos	29	
4 MATERIAL E MÉTODOS	30	
4.1 Delineamento do estudo	30	
4.2 Composição dos s <i>caffolds</i>	31	
4.3 Procedimentos <i>in vivo</i>	32	
4.3.1 Análises hematológicas	35	
4.3.2 Análises Bioquímicas	35	
4.3.3 Marcadores de Estresse Oxidativo	37	
4.3.4 Histologia	38	
4.4 Análise estatística	39	
5 RESULTADOS E DISCUSSAO	40	
INTRODUCTION	43	
MATERIAL AND METHODS	44	
Composition and characterization of scaffolds	44	
Study design		
Hematological parameters		
Biochemical profile		
Oxidative Stress Markers		
Histology	47	

Statistical analysis	47
RESULTS	
T1 data	
T2 data	
Hematological parameters	
Biochemical profile	
Oxidative Stress Markers	
Liver profile	50
Renal profile	51
DISCUSSION	53
CONCLUSION	
REFERENCES	
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO I	70

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças cardiovasculares vêm tomando cada vez mais espaço nas emergências hospitalares. Este fenômeno pode ser atribuído a diversos fatores, especialmente os chamados fatores modificáveis. Sabe-se ainda que, dentre as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio (IAM) pode ser citado como fenômeno mais crítico, principalmente por suas consequências pós-evento (MARTINS, 2020).

O tratamento do IAM é realizado a partir do restabelecimento precoce do fluxo sanguíneo para o segmento acometido, sendo baseado também em medicamentos, incluindo agentes antiplaquetários, heparina, anticoagulantes orais, nitratos, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da enzima conversora da angiotensina (PASSINHO et al., 2018).

Porém, mesmo com o tratamento e com os protocolos de reperfusão, o coração evolui com remodelamento, pós-IAM podendo apresentar manifestações clínicas como angina pós-infarto, insuficiência cardíaca (IC), alterações anatômicas e fisiopatológicas. A ocorrência de IAM pode afetar diretamente a qualidade de vida dos pacientes nos mais diversos aspectos, gerando limitações e consequências permanentes. Desta maneira, encontrar um tratamento que possa induzir melhora no remodelamento miocárdio e até regeneração do tecido miocárdio lesado e amenize os sintomas provocados pelo IAM se torna uma ideia promissora, com alta aplicabilidade clínica (CAETANO, SOARES, 2007; PASSINHO et al., 2018).

No ramo da engenharia de tecidos, nos últimos anos, os *scaffolds* ganharam espaço e são cada vez mais utilizados para estudos com regeneração tecidual. Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais que tem como característica principal a porosidade, permitindo uma adesão e proliferação celular, servindo como esqueleto para o crescimento do tecido danificado (ALVES et al., 2018).

Considerando suas características e funções, os *scaffolds* aparecem como alternativa para o tratamento pós-IAM. Apesar de ainda não serem utilizados clinicamente, alguns biopolímeros já são utilizados experimentalmente como *patches* cardíacos aplicados sobre o epicárdio. O

scaffold para o tecido cardíaco, quando produzido, deve conter propriedades como boa taxa de degradação, porosidade, biocompatibilidade, hemocompatibilidade, boa adesão celular e propriedades mecânicas e elásticas compatíveis com o coração. Além disso, o material deve permitir boa adesão entre as células, o *scaffold* e o tecido muscular cardíaco (RODRIGUES et al., 2018).

Porém, como em qualquer tratamento, a segurança no uso de novos produtos precisa ser investigada. Parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos sempre devem ser avaliados, assegurando o uso de novos biomateriais, uma vez que vários desses marcadores desempenham funções importantes em eventos cardiovasculares (WENDLAND, FARIAS, MANFROI, 2009).

Os radicais livres e a defesa antioxidante do organismo desempenham um importante papel fisiológico quando falamos de IAM. É provável que os biomateriais desempenhem efeito antioxidante; entretanto, por se tratar de um "material estranho" ao organismo, o quadro de estresse oxidativo pode ser exacerbado. A injúria tecidual produz radicais livres; assim, um biomaterial que, além de fornecer suporte para o tecido crescer também pudesse conter esta produção, seria ideal (HAZINI et al., 2015; PACIFICO et al., 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Cardiovasculares

Desde a década de 60, as doenças cardíacas são responsáveis por grande parcela dos óbitos registrados no Brasil e no mundo. Estima-se que as doenças cardiovasculares abrangem 31% de todas as mortes no mundo até 2016, e cerca de 90% destes casos se dão por IAM e acidente vascular encefálico (AVE) (INGLES et al., 2020).

Dentre elas, o IAM pode ser destacado como principal causador de mortes em todo mundo, sendo responsável por 8,76 milhões de todas as mortes registradas em 2015. Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), o IAM também é responsável por grande parte das internações de emergência, sendo registradas 107.409 internações em 2016 (PASSINHO et al., 2018).

Por conta desta alta incidência, mortalidade e, principalmente, alta taxa de reinternação, o IAM vêm sendo alvo de pesquisas tanto na identificação e no diagnóstico precoce, reduzindo riscos pós-evento, quanto no tratamento e redução de sintomas após o IAM ocorrer (WANG et al., 2020).

2.2. Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)

2.2.1 Fisiopatologia

Patologicamente, o IAM pode ser definido como um evento que provoca a morte de cardiomiócitos em decorrência de uma isquemia prolongada por interrupção do fluxo sanguíneo que irriga as células cardíacas secundárias. Esta interrupção comumente é causada pelo rompimento de uma placa de ateroma em algum ramo de artéria coronária, que deflagra a formação de tampão fibrino-plaquetário, gerando trombo sanguíneo oclusivo. A interrupção da irrigação do respectivo segmento do miocárdio irrigado por aquele ramo, levará a processo de morte celular neste (WEIL; NEELAMEGHAM, 2019).

A aterosclerose pode ser definida como uma alteração patológica na parede arterial, ocorrendo por acúmulo de células lipídicas oxidadas em sua camada subendotelial (ZIEGLER et al., 2020). Este acúmulo acaba desencadeando uma resposta inflamatória, levando à invasão do tecido por parte de células fagocitárias. Os macrófagos, por sua vez, fagocitam o LDL oxidado e tornam-se células esponjosas cheias de gordura, se depositando na parede do vaso sanguíneo. Há, assim, um espessamento da camada túnica vascular (camada mais interna), reduzindo a luz do vaso. Com isto, tem-se uma lesão aterosclerótica. formando um complexo de lipoproteínas е proteoglicanos, sendo propensos à oxidação e agregação, os quais também são precursores de radicais livres (RL), induzindo ainda um quadro de estresse oxidativo (GABRIEL-COSTA, 2018; ZIEGLER et al., 2020).

Em estágios mais avançados, esta lesão aterosclerótica evolui para fibroateromas, que são placas finas e fibrosas que revestem o núcleo lipídico já em estado de necrose. Neste estágio, estas lesões são facilmente rompidas em decorrência do fluxo sanguíneo, expondo a matriz extracelular do vaso, contendo colágeno e fibrina, à corrente sanguínea. O colágeno e a fibrina podem se ligar às plaquetas, ativando-as, e assim há a formação de um trombo que, posteriormente, pode levar à oclusão de algum vaso cardíaco (ZIEGLER et al., 2020). A figura 1 ilustra o mecanismo de formação de placa aterosclerótica.

Figura 1: Formação de placa aterosclerótica a partir de acúmulo e oxidação do LDL na camada subendotelial, iniciando o processo inflamatório e infiltração de células fagocitárias, para formação das "Foam Cells" (células esponjosas). A placa aterosclerótica deposita-se na parede do vaso, reduzindo o seu calibre.



FONTE: KISHIMOTO, YOSHIDA, KONDO, 2016.

Histologicamente, o coração possui três camadas: i) a interna, também conhecida como endocárdio; ii) a média, ou miocárdio, e iii) a mais externa, ou epicárdio. Desta maneira, a integridade de todas as camadas garante seu bom funcionamento (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013). Quando há ocorrência de IAM, este conjunto de camadas morre, dando lugar à fibrose. A figura 2 ilustra um tecido cardíaco saudável.

Figura 2: Espessuras da parede ventricular (linhas tracejadas são da parede do ventrículo direito; linhas azuis são da parede do ventrículo esquerdo; (CVE)) cavidade ventricular esquerda; (PEV) parede ventricular esquerda; (CVD) cavidade ventricular direita e (PVD) parede do ventrículo direito). Corada com Hematoxilina-Eosina.



FONTE: HARASH et al., 2019.

Sem o restabelecimento precoce do fluxo sanguíneo, as células do miocárdio apresentam lesão, disfunção e necrose, sucessivamente. A capacidade de regeneração do segmento lesado é pequena, e na área atingida os cardiomiócitos serão progressivamente substituídos por tecido cicatricial. Assim, danos irreversíveis podem aparecer e a capacidade contrátil do miocárdio pode ser permanentemente comprometida (NAGASAWA et al., 2020; PASSINHO et al., 2018). A figura 3 apresenta o tecido cardíaco já infartado, com a parede ventricular menos espessa. A coloração utilizada permite identificar a formação de fibrose na área azulada do corte, característica importante no IAM.

Figura 3: Ventrículo esquerdo após infarto do miocárdio (coloração tricrômica de Masson). Zona de fronteira (*border zone*): transição do tecido saudável para o tecido infartado; zona remota (*remote zone*): apenas tecido saudável.



FONTE: NAGASAWA et al., 2020.

O grau de oclusão da artéria, assim como o volume do miocárdio afetado, estão correlacionados a fatores intrínsecos (genéticos); estes irão, ainda, determinar a apresentação clínica do paciente infartado e seus respectivos sintomas (SMIT et al., 2019).

2.2.2 Estresse Oxidativo

Apesar do oxigênio ser essencial para o funcionamento metabólico, alguns processos, como a cadeia respiratória, podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Já as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são formadas a partir da reação entre moléculas oxigenadas (especialmente as EROs) e óxidos de nitrogênio. As EROs e ERNs mais importantes envolvidas em processos patológicos são o radical ânion superóxido (O2⁻•), o radical hidroxila (•OH), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e alguns óxidos de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO•) e o radical peroxinitrito (ONOO⁻•) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; URSO, CLARKSON, 2003).

Tanto as EROs quanto as ERNs são descritas como formas moleculares ou átomos independentes, contendo ao menos um átomo de oxigênio e podem ou não ter um ou mais elétrons desemparelhados (BRADU et al., 2020; JAKUBCZYK et al., 2020). Os radicais livres (RL), por usa vez, englobam todos compostos químicos que possuem, exclusivamente, um elétron OS desemparelhado. São moléculas extremamente reativas e instáveis. que podem aceitar ou doar elétrons, atuando como oxidantes ou redutores. São produzidos pela quebra de duplas ligações, pela adição de elétrons em moléculas ou ainda pela remoção de hidrogênios por outros radicais. Há alguns compostos químicos, como o peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, que não são considerados RL pois não apresentam nenhum elétron desemparelhado. Entretanto, induzem a formação de RL, então são considerados EROs e ERNs, respectivamente (JAMSHIDI-KIA et al., 2020).

A reação que gera RL a partir de H_2O_2 é a reação de Fenton. Esta reação é baseada na interação entre íons de ferro bivalente (Fe²⁺) ou ferro trivalente (Fe³⁺), com o H_2O_2 . Por ser uma ERO, o H_2O_2 oxida os íons de ferro, formando o radical livre hidroxila (•OH) (Fe²⁺ + $H_2O_2 \rightarrow$ Fe³⁺ + •OH + OH–). Este mecanismo vem sendo muito estudado e aplicado como descontaminante ambiental, uma vez que o RL gerado é muito reativo e pouco seletivo, sendo capaz de biodegradar principalmente compostos orgânicos (BARBOSA, MARTINS, 2020; FARRINELI et al., 2020).

RL, EROs e ERNs são produzidos continuamente pelas células como parte normal de seus processos metabólicos. O O₂ sofre redução e há formação de intermediários reativos; porém, em condições normais, sua neutralização ocorre rapidamente na mitocôndria. É válido citar também que há intensa produção de radical superóxido na ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (VAN DER POL et al., 2018).

O óxido nítrico (NO•), por exemplo, tem um papel fundamental na regulação do tônus arterial. Este composto é sintetizado no endotélio e promove a vasodilatação arterial por meio de relaxamento muscular. Assim, está diretamente relacionado à manutenção da pressão arterial. O NO•

atravessa a membrana celular das células musculares e se liga à guanilato ciclase solúvel (GCS), desencadeando a formação de monofosfato de guanosina cíclico (MQC), responsável pelo efeito relaxante (MUKOSERA et al., 2020; ZWEIER, ILANGOVAN, 2020)

Ainda assim, a excessiva produção de EROs e ERNs, ou a depleção das defesas antioxidantes, resulta em um quadro chamado de estresse oxidativo. Este quadro é caracterizado por um desequilíbrio no balanço próoxidante/antioxidante em favor do primeiro, que pode resultar em danos em componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA. A glutationa reduzida (GSH) é considerada um importante antioxidante protetor do miocárdio contra os danos causados por radicais livres. Sendo assim, uma redução de seus níveis pode comprometer a recuperação após períodos de isquemia (HALLIWELL, 2007; POLUEKTOV et al., 2019).

Muitas patologias são conhecidas por gerar excessivamente EROs e ERNs, podendo desencadear este quadro de estresse oxidativo. As doenças cardiovasculares são exemplos de geração de EROs e ERNs clinicamente e o IAM pode ser considerado como o evento cardiovascular mais crítico nessa produção (GARCIA et al., 2013). E mesmo a tentativa de reestabelecer o fluxo sanguíneo para garantir a integridade do músculo, pode gerar consequências; a produção de RL é uma delas. Sendo produzidos pelas mitocôndrias com a finalidade de transdução de sinais extracelulares, o estresse oxidativo cumpre um papel regulatório na lesão por reperfusão (WU et al., 2020; ZHOU, TOAN, 2020).

O malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, pode ser apontado como marcador importante no IAM, uma vez que tem relação direta com o dano celular (JAFRI, HYDER, MAHOOD, 2019). Além disso, o quadro de estresse oxidativo observado em pacientes com IAM pode ainda desencadear processos como oxidação proteica, dano do DNA, disfunção celular, proliferação de fibroblastos, ativação de metaloproteinases, estímulo de apoptose, alterações nas proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio, ativação de vias de sinalização para hipertrofia, entre outras, ações diretamente relacionadas com indução de remodelamento cardíaco (HAZINI et al., 2015). Yao e colaboradores (2019) descrevem ainda um possível papel fisiológico das EROs e ERNs na regeneração tecidual. As espécies reativas também desempenham função de sinalização celular. Sabe-se que o estresse oxidativo ativa a via c-Jun N-terminal quinase (JNK), além de outras vias de sinalização relacionadas a proteínas quinases, sendo conhecidas por facilitar a recuperação de tecidos lesionados (YAO et al., 2019).

Além disso, não se sabe o comportamento dos marcadores de estresse oxidativo após a aplicação dos biomateriais na estrutura cardíaca. É provável que os biomateriais, dependendo de sua composição, desempenhem efeito antioxidante. Entretanto, por se tratar de um "material estranho" ao organismo, os biomateriais podem também exacerbar o estresse oxidativo induzido pela lesão no miocárdio, considerando que as EROS e ERNs são superproduzidas em tecidos inflamados (YAO et al., 2019).

2.2.3. Tratamento

O tratamento para o IAM é baseado em medicamentos, incluindo antiplaquetários, heparina, anticoagulantes orais, agentes nitratos, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da enzima conversora da angiotensina, e na necessidade de restabelecer precocemente o fluxo sanguíneo para o segmento acometido. Geralmente isso é obtido por angioplastia coronária ou trombólise química. Porém, após o IAM, sob ação do processo de remodelamento miocárdico, alterações anatômicas е fisiopatológicas tendem a ocorrer; levando a manifestações clínicas como angina pós-infarto, disfunção ventricular esquerda, pericardite, insuficiência cardíaca e taquiarritmias. A ocorrência de IAM pode afetar diretamente a qualidade de vida dos pacientes, nos mais diversos aspectos, gerando limitações e consequências permanentes (CAETANO; SOARES, 2007).

Um padrão alimentar e um estilo de vida saudável também são considerados tratamentos não medicamentosos para a prevenção da recorrência de infartos e deve ser buscado por toda a vida mesmo pós-evento de IAM. Estas medidas são eficazes no controle da hipercolesterolemia, fator de risco importante quando se fala de eventos cardiovasculares (FALUDI et al., 2017).

Como alternativas cirúrgicas para melhorar a função de ventrículo esquerdo (VE) após IAM, temos as angioplastias coronárias percutâneas, a cirurgia de revascularização do miocárdio e a reconstrução ventricular cirúrgica entre outras. Muitos pacientes se beneficiam, porém, há relatos que sugerem que o VE tratado se dilata novamente e a insuficiência cardíaca congestiva frequentemente, apesar dessas intervenções cirúrgicas (NAGASAWA et al., 2020). Para cardiopatas isquêmicos em estágio terminal, muitas vezes é necessário o transplante cardíaco ou o uso de dispositivos de assistência circulatória mecânica muito complexos e praticamente não disponíveis no Brasil.

2.2.4 Consequências

Diversas alterações fisiológicas podem ser observadas em pacientes após a ocorrência do IAM, sendo o remodelamento ventricular a principal delas. O processo de remodelamento pode ser dividido em fase aguda, em que o aumento do espaço intraventricular é decorrente da expansão da área infartada, e fase tardia, em que ocorre a hipertrofia muscular gerada por sobrecarga. Em ambos os casos, a consequência é o aumento da cavidade do VE. Este aumento gera deformação no formato normal do coração, que deixa de ser ovalado e se torna esférico, aumentando a tensão da parede do VE e comprometendo seu funcionamento (AZEVEDO et al., 2016; ZORNOFF et al., 2009).

Apesar da deposição de fibrose ser essencial para o reparo do tecido cardíaco pós-infarto, há um comprometimento na contratilidade, uma vez que aumenta a rigidez deste tecido e prejudica a elasticidade do músculo. Assim, os processos de sístole e diástole demandam maior esforço. Este esforço desencadeia, então, uma hipertrofia cardíaca, o que contribui progressivamente para o avanço de um quadro de Insuficiência Cardíaca (IC) (GABRIEL-COSTA, 2018). A figura 4 mostra a diferença estrutural do coração antes e após a progressão da hipertrofia.

Uma vez que a IC se instaura, há um aumento, também, na pressão venosa hepática por conta da diminuição do fluxo sanguíneo. Como consequência, há redução da saturação arterial e fornecimento de oxigênio. Quando isto acontece, tem-se uma congestão hepática. A incidência da congestão hepática é de 15 a 65% quando há pacientes com IC grave (XANTHOPOULOS et al., 2019).

Figura 4: Eventos crônicos após IAM e subsequente progressão para insuficiência cardíaca. A) Coração normal. B) Hipertrofia do coração gerada por sobrecarga após IAM.



FONTE: Adaptado de GABRIEL-COSTA, 2018.

Além da congestão hepática, outra desordem co-existe em paciente com IC é a disfunção renal; este conjunto de desordens é chamado de reflexo hepatorrenal. Na IC, há uma disfunção na contração muscular cardíaca; assim, há uma redução do fluxo sanguíneo renal, aumentando a pressão venosa, causando, assim, uma congestão renal. As principais consequências envolvidas neste evento incluem a redução da perfusão renal e aumento da ativação neural e hormonal, desencadeando uma insuficiência renal (KOTECHA et al., 2019; XANTHOPOULOS et al., 2019). Este quadro interfere diretamente no metabolismo de excreção, afetando no tratamento medicamentoso do paciente, sujeito a alteração de prescrição, dosagem, manutenção e até mesmo efetividade das terapias medicamentosas (KOTECHA et al., 2019; RUOCCO, PALAZZUOLI, MAATEN, 2020).

2.3 Scaffolds

Dentro da engenharia de tecidos, os *scaffolds* têm recebido grande atenção por sua capacidade de fornecer suporte para o crescimento celular. Os *scaffolds* podem ser definidos como arcabouços tridimensionais que permitem a proliferação celular e, desta maneira, a regeneração do tecido lesionado. As principais vantagens dos *scaffols* são: sua composição a partir de biomateriais que mimetizam a matriz extracelular do local a ser inserido, o tornando biocompatível, e sua biodegradabilidade (ALVES et al., 2018).

Os scaffolds acelulares utilizados no tecido cardíaco frequentemente são utilizados como hidrogeis injetáveis e na forma de patches (Figura 5). Os patches, de maneira geral, devem mimetizar a matriz extracelular da região infartada, induzindo um remodelamento mais favorável do VE, além de melhorar as propriedades mecânicas do ventrículo e, ao máximo, reduzir a apoptose dos cardiomiócitos (ROSELLINI et al., 2019) Deve, também, conter propriedades boa taxa de degradação, alta como porosidade, biocompatibilidade, hemocompatibilidade, propriedades mecânicas e elásticas compatíveis com o coração (RODRIGUES et al., 2018).

Figura 5: Representação de um coração infartado e da aplicação de um patch. Em A) tem-se um *scaffold* e em B) o *patch*.



FONTE: Elaboração própria, criado em biorender.com.

O uso de *patches* vem sendo bastante explorado experimentalmente, sendo capaz de induzir melhora no remodelamento cardíaco e nos diversos índices de contratilidade (D'AMORE et al., 2016; TALEBI, LABBAF, KARIMZADEH, 2019; RODRIGUES et al., 2018; ZHU, PRETORIUS, ZHANG, 2019). Alguns biopolímeros já são utilizados, entre eles o ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-L-lático (PLLA), ácido glicólico polilático (PLGA) e poliuretanos (RODRIGUES et al., 2018).

A aplicação de *patch* híbrido em coração de ratos infartados foi verificada por D'Amore e colaboradores (2016). O *patch* consistia de poliéster carbonato uretano-ureia (PECUU) associado a gel de matriz extracelular (MEC) proveniente de tecido porcino decelularizado. Os autores reportaram melhora em parâmetros de remodelamento cardíaco, avaliados por ecocardiografia após 2 semanas de infarto, e diminuição da área de infarto em relação aos ratos controles.

A fibroína é o principal polímero que compõe o casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Este biomaterial que já é muito utilizado para suturas recentemente ganhou espaço para aplicações na engenharia tecidual, apresentando estabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e boa resistência, além de ser de fácil acesso e de custo reduzido (CHENG et al., 2018).

A fibroína é promissora em estudos para regeneração óssea, ainda mais quando associada a outros polímeros, a fim de melhorar suas propriedades mecânicas (FAROKHI et al., 2018; MELKE et al., 2016). Kim e colaboradores (2020) projetaram um hidrogel a partir da fibroína para aplicação em cartilagem; com impressão 4D, a morfologia do biomaterial foi semelhante à traqueia. Em análise histológica, foi observado que os biomateriais implantados apresentaram epitélio colunar ciliado pseudoestratificado muito semelhante ao grupo controle, demonstrando um grande potencial regenerativo. Entretanto, ainda não há, até o momento, nenhum estudo *in vivo* aplicando a fibroína em tecido cardíaco. E pouco se sabe quanto ao seu envolvimento no mecanismo de estresse oxidativo. Um material contendo fibroína em sua composição pode apresentar resultados promissores, tanto com relação à recuperação do tecido lesado, quanto a seu custo.

Assim, a confecção de *scaffolds* a base de colágeno e fibroína na forma de um *patch* cardíaco poderiam auxiliar em na recuperação do tecido lesado. Sua importância para a medicina é inegável, considerando a incidência de IAM, suas consequências e as desvantagens apresentada por todos os tratamentos existentes até o momento (ALVES et al., 2019).

Recentemente, Alves et al. (2018), colaboradores desse trabalho, desenvolveram um *scaffold* lamelar denso de colágeno-quitosana-fibroína de seda. Na caracterização desse material, os autores reportaram propriedades fisiomecânicas como grau de anisotropia, capacidade de intumescimento e capacidade de proliferação celular *in vitro* compatíveis para a aplicação do *scaffold* em tecido cardíaco. A adição ao *scaffold* de agentes com potencial de condutividade elétrica como a polianilina, também tem sido especulado como fator capaz de promover o aumento da quimiotaxia de células de linhagem primária ao tecido tratado (ALVES et al., 2019).

Os biomateriais com condutividade elétrica têm como característica principal uma estrutura química somente baseada em ligações simples e duplas, facilitando a passagem dos elétrons. Em um tecido fibrótico, há uma dessincronização na contração cardíaca, uma vez que o tecido retarda a condutividade elétrica naturalmente presente no músculo (HE et al., 2020). Assim, o *patch* cardíaco ideal deve, ainda, possibilitar esta condutividade; e a polianilina surge como um material muito promissor. Sendo um polímero condutor, ainda possui boa estabilidade ambiental e pode desempenhar um importante papel na regeneração tecidual (ALVES et al., 2019).

Os biopolímeros são frequentemente aplicados por sua flexibilidade, estrutura controlável e facilidade de processamento, além de suas propriedades mecânicas, elétricas e de biodegradação. Considerando que o coração é um músculo que se encontra frequentemente em movimento, o *patch* cardíaco ideal deve possuir força mecânica e ao mesmo tempo leveza, possibilitando a contração e evitando possíveis lesões na parede cardíaca (TALEBI, LABBAF, KARIMZADEH, 2019).

2.4 Avaliação toxicológica e de segurança de novos produtos

Como em qualquer tratamento, a segurança no uso de novos produtos precisa ser investigada. Parâmetros hematológicos, bioquímicos e histologia de órgãos não-alvo sempre devem ser avaliados, assegurando o uso de novos biomateriais, uma vez que vários desses marcadores desempenham funções importantes em eventos cardiovasculares (WENDLAND, FARIAS, MANFROI, 2009).

As troponinas cardíacas são os biomarcadores responsáveis por indicar lesão cardíaca e necrose, aplicadas como parâmetros de diagnósticos e preditivos para síndrome coronariana aguda e IAM. As troponinas cardíacas são proteínas estruturais liberadas pelas células por conta de necrose ou algum extravasamento de citosol celular, ou seja, quando alguma célula tem sua membrana danificada. São marcadores de alta sensibilidade e podem sugerir desde lesões menores até proporcionar a extensão do IAM (BEREZIN, BEREZIN, 2020).

Para avaliação da toxicidade de novos produtos, geralmente avalia-se perfil hepático e renal. A escolha desses dois órgaõs se dá uma vez que são órgãos responsáveis pelo metabolismo e excreção de xenobióticos, e sua integridade é um fator importante para atestar a segurança de novos produtos. A concentração sérica de marcaores hepáticos, como a alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), bem como ureia e creatinina para danos renais são importante parâmetros de toxicidade (RAMÍREZ et al., 2019; RAHNAVARD et al., 2019). A avaliação histológica destes órgãos também podem auxiliar na avaliação da toxicidade. Dentre todas as alterações geradas pelo IAM, o desenvolvimento de congestão tanto hepática quanto renal são características esperadas e que também podem servir como fator de avaliação.

A isoenzima creatinina quinase, porção MB (CK-MB), a enzima lactato desidrogenase (LDH) e a Troponina I também são utilizadas como marcadores de necrose cardíaca (RAMÍREZ et al., 2019; RAHNAVARD et al., 2019). Apesar de serem utilizadas como forma de diagnóstico, sua avaliação

tardia poderia identificar qualquer lesão que venha a ser gerada pelo próprio scaffold.

Deve-se ressaltar também que, como se trata de um biomaterial com aplicação recente, os testes *in vivo* com *scaffolds* contendo a fibroína e polianilina em sua composição ainda são escassos. Já nos testes *in vitro*, eles apresentam bons resultados (ALVES et al., 2018; BARUD et al., 2015; DU et al., 2018). Alves e colaboradores (2018) avaliara a segurança de um *scaffold* à base de fibroína e colágeno para aplicação em músculo cardíaco pelo teste de viabilidade celular com mioblástos (células H9c2). Os resultados descreveram viabilidade celular maior do que 90%, e nenhuma diferença significativa foi observada em relação ao grupo controle, demonstrando não-toxicidade (ALVES et al., 2018).

Barud e colaboradores (2015) descreveram e caracterizaram um *scaffold* a base de fibroína e celulose bacteriana. Para testar sua toxicidade, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com células L929, uma linhagem de fibroblastos. O *scaffold* com fibroína e celulose (1:1) não apresentou citotoxicidade, além de demonstrar uma boa viabilidade celular. Os resultados também mostraram que o *scaffold* com fibroína apresentou aumento significativo na adesão celular quando comparado à celulose bacteriana sozinha (BARUD et al., 2015).

Du e colaboradores (2018) utilizaram células derivadas de endotélio venoso para testar um *scaffold* de fibroína e poli (éster-uretano) ureia. O *scaffold* teria como finalidade a regeneração de válvulas cardíacas. O estudo concluiu que o *scaffold* não apresentou toxicidade *in vitro*, além de não alterar as células morfologicamente, mesmo em tempos longos de incubação. Além disso, o *scaffold* conjugado demonstrou boa proliferação celular (DU et al., 2018).

Os estudos que caracterizam estes *scaffolds* descrevem o biomaterial, principalmente em conjunto com outros polímeros, como promissor para a engenharia de tecidos cardíacos, porém ainda apenas em testes que não envolvam organismos vivos. Assim, seria de grande contribuição a realização de testes *in vivo* (DU et al., 2018).

A verificação *in vivo* do efeito desses *scaffolds* pode contribuir para a realização de estudos posteriores clínicos. O IAM é um problema de ordem crescente e são necessários estudos a fim de desenvolver um produto seguro aplicável ao coração, com capacidade de promover regeneração tecidual ou indução de um remodelamento favorável, cuja aplicabilidade clínica seja translacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a segurança de biomateriais a base de colágeno, quitosana, fibroína de seda e polianilina aplicados como *patches* na regeneração da função do músculo cardíaco infartado.

3.2 Específicos

- Avaliar, através dos marcadores hematológicos, a segurança no uso dos biomateriais;

 Avaliar, por meio dos marcadores bioquímicos, a segurança no uso dos biomateriais;

- Avaliar, por meio de marcadores de estresse oxidativo, um possível mecanismo de ação dos *scaffolds*, bem como sua capacidade antioxidante.

- Avaliar a histologia de órgãos não-alvo (rim e fígado) para avaliação de não-toxicidade dos biomateriais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo pré-clínico, complementar a um projeto guardachuva, coordenado pelo prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, da Universidade de Sorocaba, cujo objetivo foi produzir biomateriais tais como hidrogéis termorresponsivos, *scaffold* lamelar e microparticualdo, nanocelulose cristalina com características para serem aplicados no tecido cardíaco. A figura 6 apresenta um fluxograma do desenvolvimento geral do projeto, e este estudo contempla a avaliação da segurança dos biomateriais desenvolvidos *in vivo*.

Figura 6: Fluxograma de desenvolvimento geral do projeto.



FONTE: Elaboração própria.

4.2 Composição dos scaffolds

Os *scaffolds* utilizados no estudo foram produzidos a partir de um hidrogel de colágeno-quitosana-fibroína; este hidrogel passou por um processo de compressão plástica, transformando-os em um material de matriz porosa, porém ainda com água em sua estrutura. Então, utilizando um compressor estático, a água foi removida, produzindo assim um biomaterial denso e com melhores propriedades biológicas e mecânicas (ALVES et al., 2018; ALVES et al., 2019).

A partir deste complexo, originaram-se os dois *scaffolds* que foram testados experimentalmente: o *scaffold* 1, a base de colágeno-quitosana-fibroína, e o *scaffold* 2, com a base de colágeno e fibroína, com adição de um agente condutor, a polianilina, a fim de melhorar a interação do *scaffold* com as células cardíacas. Ambos mostram segurança *in vitro*.

A figura 7 apresenta os dois scaffolds já em tamanhos padronizados:

Figura 7: Apresentação dos *scaffolds* 1 (A), a base de colágeno-quitosanafibroína, e do *scaffold* 2 (B), a base de colágeno, fibroína e polianilina, em tamanho padronizado para implante (seta preta).



FONTE: Elaboração própria.
4.3 Procedimentos in vivo

A indução do infarto do miocárdio ocorreu no Núcleo de Cirurgia e Medicina Experimental da Unicamp, sob supervisão do co-orientador prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, co-orientador da mestranda. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, sob o protocolo CEUA/UNICAMP nº 4417-1/2017 (Anexo I).

Os procedimentos experimentais *in vivo* consistiram na indução de infarto, recuperação dos animais e posterior tratamento (D'AMORE, 2016). Cada animal (rato Wistar), pesando aproximadamente 180±20g, foi anestesiado com inalação de isoflurano 1%, sendo entubado com catéter Abbocath® 16G (1,7x45mm) e ventilado mecanicamente. O isoflurano continuou sendo administrado por via inalatória, iniciado em 0,5% e sendo zerado após sutura da artéria interventricular.

Para evitar a arritmia, os animais receberam 0,1 mL de lidocaína (dose de 100 mg/mL), e foram submetidos à incisão torácica esquerda para exposição do ventrículo. Foi então realizada ligadura da artéria interventricular anterior (AIA), cerca de 3 mm abaixo de sua emergência, com sutura de polipropileno 6.0. Após a ligadura, foi realizada hemostasia e manobra de Valsalva, a fim de reexpandir áreas pulmonares com atelectasia, e síntese da ferida com sutura Vicryl® 3.0.

Os animais foram monitorados durante recuperação do ato operatório, recebendo água e comida *ad libitum*, repostas diariamente. Nos dois primeiros dias após a cirurgia, foi diluído 1 mL de dipirona em 250 mL de água (dose de 50 mg/mL) para manutenção da analgesia. Todos os processos envolvendo anestesia e analgesia seguem protocolo da Universidade Estadual de Campinas (FREITAS, ANTIORIO, SEABRA, 2017).

Duas semanas após a indução do IAM, os animais foram novamente submetidos ao mesmo procedimento anestésico, e a ecocardiografia (com equipamento Acuson (GE Vivid®) com transdutor de 10MHz foi realizada, para comprovação do IAM e aquisição de imagens em eixo paraesternal curto modo B com auxílio do modo M. Aqueles animais que tiveram IAM comprovado, foram submetidos à nova toracotomia, semelhante à anterior, e aleatorizados para serem submetidos a algum dos tratamentos (n = 10 animais por grupo). Os *scaffolds* como *patches* foram umedecidos com soro fisiológico, cortados de forma padronizada com "punch" de 6 mm e fixados com sutura de polipropileno 6.0 na zona de fronteira do tecido infartado para o tecido saudável, para que cobrissem a maior área infartada possível.

Animais que não foram infartados foram selecionados para o grupo 1 (SHAM) (n=5), sendo submetidos inicialmente apenas a toracotomia com exposição do coração sem ligadura da AIA, e duas semans após, apenas a nova toracotomia.

A figura 8 apresenta coração de rato com aspecto do *scaffold* após a sutura sobre parede infartada, no dia do implante.

Figura 8: Coração submetido a ligadura da AIA com *Scaffold* 1 suturado em sobre área infartada.



FONTE: Elaboração própria.

Assim, os grupos obtidos foram:

- Grupo 1: SHAM (simples exposição do coração);
- <u>Grupo 2:</u> Controle (infarto sem tratamento);

- <u>Grupo 3</u>: infarto + scaffold 1 sobre a região infartada extendendo-se até a borda limite da zona de infarto;
- <u>Grupo 4</u>: infarto + scaffold 2 sobre a região infartada extendendo-se até a borda limite da zona de infarto.

Nesta segunda toracotomia, foi realizada coleta de sangue em tubo com EDTA (tido como tempo 1 - T1). Após a aplicação dos tratamentos, os animais foram novamente recuperados, com os mesmos passos descritos no procedimento anterior.

Os animais foram submetidos a ecocardiografia duas e quatro semanas após a aplicação do tratamento e tiveram suas imagens registradas. Oito semanas após aplicação dos tratamentos, os animais foram anestesiados e submetidos à avaliação ecocardiográfica final, seguida da eutanásia por sobredosagem de isoflurano, retirada do fígado e rim e coleta de sangue para as análises posteriores (tempo 2 - T2). A figura 9 mostra o cronograma dos procedimentos realizados.

Figura 9: Esquema dos procedimentos realizados *in vivo*, ao longo de 10 semanas.



FONTE: Elaboração própria, criado em biorender.com.

4.3.1 Análises hematológicas

Amostras de sangue total foram analisadas utilizando equipamento automatizado Sysmex XS-1000i (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Os parâmetros contagens de células vermelhas, células brancas, plaquetas, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média foram determinados. Todas as análises seguiram protocolo do fabricante.

4.3.2 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no soro dos animais, utilizando kits comerciais da Roche Diagnóstica® e Bioclin®. Os parâmetros analisados em soro moram: albumina, alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), creatina quinase MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), troponina I, ureia e creatinina, marcadores que avaliam também função renal e hepática, importantes quando estamos tratando de avaliar a segurança de novos bioprodutos. Os testes bioquímicos seguiram as especificações do fabricante.

A albumina é um composto de caráter catiônico, assim, liga-se ao corante aniônico verde de bromocresol (BCG). Desta maneira, a intensidade da cor azul esverdeada é diretamente proporcional à concentração de albumina da amostra. Ao final, os valores das amostras foram apresentados em mg/dL.

A enzima ALT catalisa a reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato, formando piruvato. Este piruvato é reduzido pelo NADH, sendo catalisada pela enzima LDH, formando L-lactato e NAD+. A taxa de oxidação do NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica da ALT. O kit de ALT contém um reagente chamado fosfato piridoxal, cuja função é agir como coenzima e garantir a total ativação da enzima ALT. A representação da atividade da ALT foi dada em U/L.

A enzima AST catalisa reação de transferência de agrupamento amino para L-aspartato e 2-oxoglutarato, formando assim oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato então oxida o NADH por meio da enzima malato desidrogenase (MDH), formando NAD+. O kit de AST também contém um reagente chamado fosfato piridoxal, cuja função é agir como coenzima e garantir a total ativação da enzima AST. A representação da atividade da AST foi dada em U/L.

A creatinina apresenta também ensaio colorimétrico cinético baseada no método Jaffé. Assim, em uma solução alcalina, a creatinina forma um complexo amarelo alaranjado com picrato. Desta maneira, a taxa de formação deste corante é diretamente proporcional à concentração de creatinina da amostra. O kit utilizado conta com a correção de -0,2mg/dL a fim de considerar reações não específicas causadas por proteínas e cetonas. Os resultados da creatinina foram expressos em mg/dL.

A ureia é mensurada a partir de teste cinético com urease e glutamato desidrogenase. A ureia é hidrolisada pela urease, dando origem a amônia e a carbonato. Na segunda reação, o 2-oxoglutarato reage com a amônia na presença da glutamato desidrogenase (GLDH) e da coenzima NADH, dando origem a L-glutamato. Nesta reação, dois mols de NADH são oxidados a NAD por cada mol de ureia hidrolisada. A taxa de diminuição na concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra. É determinada medindo a absorvância a 340 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

A enzima CK-MB é constituída por duas subunidades, CK-M e CK-B. Utilizando anticorpos específicos anti-CK-M, sua atividade catalítica é inibida cerca de 99% na amostra sem afetar a subunidade CK-B. Assim, a atividade constante da CK-B é determinada pelo método CK total. Considerando que a atividade das subunidades pouco difere entre si, é possível calcular a atividade da CK-MB a partir da atividade da CK-B. Os resultados da CK-MB foram expressos em U/L.

A enzima LDH cataliza a conversão de L-lactato em piruvato, enquanto o NAD+ é reduzido em NADH durante este processo. A taxa inicial de formação de NADH é diretamente proporcional à atividade da enzima LDH. A atividade da LDH foi expressa em U/L.

A troponina I foi determinada por meio de teste qualitativo. O método utiliza anticorpos monoclonais de camundongo anti-cTnI, reagindo com a troponina presente na amostra. As amostras se movem através de uma membrana cromatográfica por ação capilar. Os resultados foram expressos em porcentagem de resultados positivos.

4.3.3 Marcadores de Estresse Oxidativo

Para as análises de estresse oxidativo, foram utilizados dois tipos de amostras: sangue total e tecidos. Os tecidos utilizados foram fígado e rim dos animais. O sangue total não passou por nenhum processo prévio; entretando, os tecidos foram previamente preparados. Pesou-se aproximadamente 0,25g de tecido para 1,5mL de solução de KCI a 1,15%; após isto, foram sonicados com Sonicador de Bancada Atomizador Ultrassônico Sonics Vibra-Cell® em dois ciclos de 30 segundos, a uma intensidade de 35%, formando o homogenato. Depois deste procedimento, o homogenato foi armazenado em freezer -80°C até uso.

A determinação da GSH foi realizada pela quantificação dos tióis totais, baseada no método de Ellman (1959). Para isso, 150 µL de amostra foram hemolisados com 100 µL de Triton X-100 e precipitados com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA 30%). As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram diluídos em tampão fostato de potássio 1 M pH 7,4 e reagiram com 5-5-ditio-bis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB 10 mM), formando um complexo amarelo, que foi lido em comprimento de onda de 412 nm. Uma curva de calibração com GSH foi construída, para o cálculo da concentração. Os resultados foram expressos em mM/mL sangue.

A atividade da enzima antioxidante GPx foi determinada em sangue total, baseada na oxidação do NADPH. O sangue foi diluído em uma solução contendo glutationa reduzida, glutationa redutase, NADPH, azida sódica e 70 µL de H₂O₂. A atividade da GPx foi monitorada por dois minutos, a 340 nm (PAGLIA, VALENTINE, 1967). Pela medida do decaimento da absorbância do NADPH foi possível determinar a atividade da GPx, que é proporcional ao consumo de NADPH. Os dados foram expressos em µmolNADPH/min/g Hemoglobina.

O método para avaliação da atividade da catalase (CAT) baseou-se na decomposição do H₂O₂ pela enzima, ao longo de três minutos, monitorado a 240 nm. Para tanto, uma alíquota de 20 µL de sangue total foi diluída em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e 70 µL de H₂O₂ foi adicionado,

dando início à reação. Uma constante de variação (κ), relacionada com a Hb, auxiliou na expressão dos valores da atividade no sangue (κ/g Hemoglobina) (AEBI, 1984).

A concentração de MDA, no plasma, foi avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), adaptada da metodologia de Ohkawa, Ohishi, Yagi (1979). Para tanto, 150 µL de plasma foram misturados a 50 µL de NaOH 3 M e incubados a 60 °C por trinta minutos. Após, foi acrescentado 500 µL de H₃PO₄ 6%, 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,8%) e 100 µL de lauril sulfato de sódio (SDS 10%), e as amostras levadas ao banho 80 °C por uma hora. O MDA, reagindo com o TBA forma um composto rosa, que foi lido em espectrofotômetro a 532 nm. Foi realizada uma curva de calibração, utilizando o MDA como padrão, para os cálculos da concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em µmol/mL de plasma.

4.3.4 Histologia

Para análise histológica, foram coletados porções do fígado e o rim esquerdo dos animais, após eutanásia. Os órgãos foram coletados e mantidos em formalina tamponada 10% por 24h. Ao fim deste tempo, foram colocados em recipiente com água *overnight*. E, após essa etapa, as amostras foram deixadas em etanol 70% até o momento do processamento. Finalizando a etapa de fixação, o processamento dos tecidos foi realizado no equipamento automatizado Processador Automático de Tecidos PT12 (O Patologista®), e as peças foram emblocadas em parafina histológica.

Os cortes histológicos dos fígados e rins foram realizados em micrótomo rotativo-manual (O Patologista® MR 2014) com quatro micrômetros de espessura. A seguir, as lâminas foram coradas por técnica de hematoxilina e eosina, e montadas com resina histológica (TOLOSA et al., 2003).

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico ZEISS® Axio Lab.A1, nos aumentos 50x, 100x e 200x. Para melhor avaliação, foi utilizado o programa ZEN® para fotografar e demarcar os *endpoints* de interesse. Estabeleceram-se, para os fígados, os parâmetros sendo congestão sinusoidal e integridade dos hepatócitos. E para os rins, estabeleceu-se a área do glomérulo, bem como a integridade das estruturas, como parâmetros de

análise.

4.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. O teste ANOVA uma via foi aplicado. Foi realizado um teste de seguimento (Tukey ou Duncan) para verificar diferenças entre os protocolos de tratamento. Valores de p<0.05 foram considerados significantes. Os resultados foram analisados com o auxílio dos programas Statistica[®] 8.0 e Graph Pad Prism[®] 8.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seções "Resultados" e "Discussão" encontram-se agrupadas, e apresentam o manuscrito resultante deste trabalho, seguindo as "Orientações para apresentação de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba".

O artigo está redigido na língua inglesa. O texto ainda não se encontra nas normas indicadas pela revista, mas será submetido em revista qualificada na área.

1	Biochemical and Oxidative Stress Outcomes in Infartated Rats Submitted to Novel
2	Biomaterials Implantation for Safety Profile Evaluation.
3	
4	Ou
5	
6	Safety and efficacy of novel scaffolds implanted in heart of infartated rats.
7	
8	
9	Fernanda Gomes Leite1, Juliana Fonzar Marana2, Luiza Fernandes Tavares de Sá2,
10	Daniela Diógenes de Carvalho3, Thais Francine Ribeiro Alves1, Marco Vinícius
11	Chaud1, Lindemberg da Mota Silveira Filho3, Denise Grotto1*.
12	
13	
14	
15	1 Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Pesquisa Toxicológica
16	(Lapetox), Universidade de Sorocaba, UNISO, Sorocaba, SP, Brasil.
17	2 Pontifícia Universidade Católica – PUC, Campinas, SP, Brasil.
18	3 Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	* Endereço para correspondência:
26	Denise Grotto
27	Graduate Program in Pharmaceutical Sciences
28	University of Sorocaba,
29	Rodovia Raposo Tavares Km 92.5, CEP. 18023-000, Sorocaba, SP, Brazil;
30	Tel.: +55 15 2101 7104; Fax: +55 15 2101 7000
31	denise.grotto@prof.uniso.br

32 Abstract: Ischemic heart disease is responsible for a large part of deaths worldwide. 33 Acute myocardial infarction (AMI) is a critical event for excessive generation of 34 Reactive Oxygen Species (ROSs) and Reactive Nitrogen Species (RNSs) and results in 35 oxidative stress. Treatment for AMI is based on medications and the need to quickly 36 restore blood flow. In tissue engineering, the use of scaffolds to provide cell growth 37 support presents an alternative for regeneration or improvement of myocardial 38 remodeling after AMI. However, the safety of using new products needs to be 39 investigated. The aim of the study was to evaluate the safety of implanting biomaterial 40 patches in improving the function of the infarcted cardiac muscle. Male Wistar rats (n = 41 10 per group) underwent AMI induction and two weeks later, scaffolds 1 (with 42 collagen-chitosan-fibroin) and scaffolds 2 (with collagen-fibroin + polyaniline) were 43 implanted over the epicardium and blood was collected (T1). The animals were 44 monitored for two months and euthanized, blood was collected (T2) and removal of the 45 liver and kidney. Biochemical, hematological and histological were analyzed. Among 46 the results obtained, the absence of cardiac damage associated with scaffolds stands out 47 when analyzed Creatine kinase portion (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH) and 48 Troponin I. Scaffold 2 showed an increase in liver transaminases and antioxidant 49 enzymes. Regarding the hematological profile, both scaffolds proved to be safe. Thus, it is suggested that scaffold 2 could trigger signs of hepatotoxicity and also a pro-oxidant 50 51 effect. These results underscore the importance of in vivo safety studies prior to the 52 application of these devices.

53

54 Keywords: Acute Myocardial Infarction; Scaffolds; Safety; Oxidative stress.

55 **INTRODUCTION**

56 Due to the high incidence and mortality, acute myocardial infarction (AMI) has been the 57 target of research in the identification and early diagnosis, as well as in the treatment 58 and reduction of symptoms after the event [1]. Without an early restoration of blood 59 flow, myocardial cells present injury, dysfunction and necrosis. Thus, irreversible 60 damage appears, and the myocardial contractile capacity can be permanently 61 compromised [2].

62 Free radicals (FR) and reactive oxygen species (ROSs) and nitrogen (RNSs) are 63 produced continuously by cells as a normal part of their metabolic processes. O₂ is 64 reduced and reactive intermediates are formed. However, under normal conditions, its 65 neutralization occurs quickly in the mitochondria [3]. An excessive production of ROSs 66 and ERNs, or even the depletion of the body's antioxidant defenses, results in a 67 condition called oxidative stress [4]. Cardiovascular diseases are examples of excessive 68 generation of ROSs and RNSs and AMI can be considered as the most critical 69 cardiovascular event [5, 6].

Several physiological changes can be observed in patients after the occurrence of AMI,
even with the use of specific treatments. And ventricular remodeling is the main one,
characterized by an enlarged left ventricular (LV) cavity [7].

To try to induce a mechanical and biological response that improves the myocardial remodeling process, scaffolds appear as an interesting alternative. Scaffols are threedimensional frameworks that allow cell proliferation and regeneration of injured tissue and are also biocompatible and biodegradable [8]. Acellular scaffolds used in cardiac tissue are often used as injectable hydrogels and in the form of patches [9].

The use of patches for epicardial application has been widely explored in both *in vitro* studies [8, 10, 11], showing good safety results, as well as *in vivo*, capable of inducing improvement in cardiac remodeling and in different contractility rates [12, 13, 14]. As with any treatment, the safety of using new products needs to be investigated.

82 Serum concentration of liver markers, such as alanine aminotransaminase (ALT) and 83 aspartate aminotransferase (AST), as well as urea and creatinine for kidney damage are 84 important parameters of toxicity. The isoenzyme creatinine kinase, MB portion (CK-85 MB), the enzyme lactate dehydrogenase (LDH) and Troponin I are also used as markers 86 of cardiac necrosis [15, 16]. 87 Considering the clinical applicability of a patch for myocardial application, as well asits 88 non-toxicity, the aim of the study was to experimentally evaluate the safety of a 89 collagen and fibroin scaffold with or without polyaniline in the regeneration of the 90 function of the infarcted cardiac muscle.

91

92 MATERIAL AND METHODS

93 Composition and characterization of scaffolds

94 The scaffolds used in the study were produced from a collagen-chitosan-fibroin 95 hydrogel. This hydrogel went through a plastic compression process, transforming them 96 into a porous matrix material, but still with water in its structure, having been 97 previously characterized [8, 17]. From this complex, the two scaffolds that were tested 98 experimentally originated: scaffold 1 collagen-chitosan-fibroin, and scaffold 2 collagen-99 fibroin, with the addition of a conductive agent (polyaniline) in order to improve the 100 interaction of the scaffold with cardiac cells. Both show safety in an in vitro study 101 [8,17].

102

103 Study design

104 This is a preclinical study, approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at 105 the State University of Campinas - UNICAMP, under protocol Nº 4417-1 / 2017. The 106 induction of AMI occurred at the Unit of Surgery and Experimental Medicine at 107 UNICAMP. All experiments were carried out in accordance with the international 108 animal experimentation guidelines - ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo 109 Experiments) [18]. The animals were housed in the animal testing facility at 110 UNICAMP, according to animal welfare standards, in ventilated cages and lined with 111 wood shavings. The temperature and light/dark cycles were automatically controlled at 22 ± 2 ° C and 12h, respectively. The animals received feed and water *ad libitum*. 112

For AMI induction, each animal (Wistar rat), weighing approximately 180 ± 20 g, was anesthetized with 1% isoflurane inhalation, intubated with an Abbocath® 16G catheter (1.7x45mm) and mechanically ventilated [12]. Isoflurane continued to be administered by inhalation, started at 0.5% and zeroed after suturing the interventricular artery.

117 To avoid arrhythmia, animals received 0.1 mL of lidocaine (100 mg/mL dose), and they 118 were submitted to a left thoracic incision to expose the ventricle. The anterior 119 interventricular artery (AIA) was ligated, approximately 3 mm below its emergence, with 6.0 polypropylene suture. After ligation, hemostasis and Valsalva maneuver were
performed in order to reexpand lung areas with atelectasis, and wound synthesis with
Vicryl® 3.0 suture.

Animals were monitored during the recovery of the surgery, receiving water and food *ad libitum*, replenished daily. In the first two days after surgery, 1 mL of dipyrone was diluted in 250 mL of water (50 mg/mL dose) to maintain analgesia.

- 126 Two weeks after the AMI induction, animals were again submitted to the same 127 anesthetic procedure, and the Acuson echocardiography (GE Vivid®) with a 10MHz 128 transducer was performed to prove the AMI and to acquire images in a short mode B 129 parasternal axis with assistance in the M mode. Those animals that had proven AMI 130 were submitted to a new thoracotomy, similar to the previous one, and randomized to be 131 submitted to any of the treatments (n = 10) or control (n = 10). The scaffolds as patches 132 were moistened with saline, cut in a standard way with a 6 mm punch and fixed with 6.0 133 polypropylene suture in the border area of the infarcted tissue to the healthy tissue, so 134 that they covered the largest infarcted area possible.
- 135 Animals that were not infarcted were selected for SHAM (n = 5), being initially 136 submitted only to thoracotomy with exposure of the heart without AIA ligation, and two 137 weeks later, only the new thoracotomy.

138 Study groups:

- SHAM (simple exposure of the heart);
- CONTROL (untreated infarction);
- S-CF (infarction + *scaffold* 1);
- S-CFP (infarction + *scaffold* 2).

143 In the second thoracotomy, blood was collected in an EDTA tube (T1). After the 144 application of treatments or thoracotomy only, animals were again recovered, with the 145 same steps described in the previous procedure.

146 Animals were submitted to echocardiography two and four weeks after the application

- 147 of the treatment, to monitor the evolution of the clinical condition. After eight weeks,
- 148 animals were anesthetized and euthanized with isoflurane, the organs were removed,
- 149 and a new blood collection was performed (T2).
- 150

151 Hematological parameters

Blood samples were analyzed using automated Sysmex XS-1000i equipment (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The parameters red cell counts (RBC), white cells counts (WBC), platelets (PLT), hemoglobin concentration (Hgb), hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determined. All analyzes followed the manufacturer's protocol.

158

159 Biochemical profile

Biochemical analyzes were performed on the animal's serum, using commercial kits from Roche Diagnóstica® and Bioclin®. The parameters analyzed were albumin, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), creatine kinase MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), troponin I, urea and creatinine, markers that are important when we are trying to evaluate the safety of new bioproducts. Biochemical tests followed the manufacturer's specifications.

166

167 Oxidative Stress Markers

For the analysis of oxidative stress, three types of samples were used: blood, plasma and
tissues (kidney and liver). Tissues were weighed approximately 0.25 g to 1.5 ml 1.15%
KCl solution; tissues were sonicated with Sonics Vibra-Cell® Ultrasonic Atomizer
Bench Sonicator in two cycles of 30 seconds, at 35%, intensityforming a homogenate.
After this procedure, homogenate was stored in a -80 °C freezer until use.

173 The determination of GSH was performed by quantifying the total thiols, based on the 174 Ellman method [19]. For this, 150 μ L of sample were hemolyzed with 100 μ L of Triton 175 X-100 and precipitated with 100 μ L of trichloroacetic acid (TCA 30%). Samples were 176 centrifuged, and supernatants were diluted in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 177 and reacted with 5-5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (10 mM DTNB), forming a yellow 178 complex, which was read in wavelength of 412 nm.

179 The activity of the antioxidant enzyme GPx was determined based on the oxidation of 180 NADPH. The samples were diluted in a solution containing reduced glutathione, 181 glutathione reductase, NADPH, sodium azide and 70 μ L of H2O2. GSH-Px activity was 182 monitored for two minutes, at 340 nm [20]. By measuring the NADPH absorbance 183 decay, GPx activity was determined, which is proportional to the consumption of 184 NADPH. The method for assessing catalase activity (CAT) was based on the decomposition of H₂O₂ by the enzyme, over three minutes, monitored at 240 nm. For this purpose, an aliquot of 20 μ L of samples was diluted in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 70 μ L of H₂O₂ was added, initiating the reaction. A variation constant (κ), related to Hgb, helped in the expression of activity values in the samples [21].

190 The concentration of MDA in plasma was assessed by substances reactive to 191 thiobarbituric acid (TBARS), adapted from the methodology of Ohkawa, Ohishi, Yagi 192 [22]. For this purpose, 150 μ L of plasma were mixed with 50 μ L of 3 M NaOH and 193 incubated at 60 °C for thirty minutes. Then, 500 μ L of 6% H₃PO₄, 500 μ L of 194 thiobarbituric acid (0.8% TBA) and 100 μ L of sodium lauryl sulfate 10% were added, 195 and the samples were taken to the bath at 80 °C for one hour. The MDA, reacting with 196 the TBA, forms a pink compound, which was read on a spectrophotometer at 532 nm.

197

198 Histology

For histological analysis, portions of liver and the left kidney of animals were collected after euthanasia. Organs were collected and kept in 10% buffered formalin for 24 hours, placed in a container with water overnight and left in 70% ethanol until processing. At the end of the fixation stage, the tissue processing was carried out using the automated PT12 Automatic Tissue Processor (O Pathologist®), and the pieces were embedded in histological paraffin.

Histological sections of livers and kidneys were performed in a rotary-manual microtome (O Patologista® MR 2014) with four micrometers thick. Then, slides were stained using hematoxylin and eosin, and mounted with histological resin [23].

Slides were evaluated using a ZEISS® Axio Lab.A1 optical microscope, at 50x, 100x and 200x magnifications. For a better evaluation, the ZEN® program was used to photograph and mark the endpoints of interest. For livers, parameters were established, being sinusoidal congestion and hepatocyte integrity. And for kidneys, the area of the glomerulus was established, as well as the integrity of the structures, as parameters of analysis.

214

215 Statistical analysis

216 Data were expressed as mean±standard deviation (SD). The one-way ANOVA test was

217 applied. A follow-up test (Duncan) was performed to check for differences between

treatment protocols. Values of p <0.05 were considered significant. Results were analyzed with the aid of the Statistica® 8.0 and Graph Pad Prism® 8 programs.

220

221 **RESULTS**

222 **T1 data**

At T1, only oxidative stress markers were analyzed, due to the limiting amount of sample. GSH increased significantly in all infarcted groups compared to SHAM (respectively p = 0.000063, 0.000077, 0.00017; figure 1A). For GPx, the enzyme activity was higher in S-CFP compared to SHAM (p = 0.0472; figure 1B). For CAT, there was no statistical difference between the groups (p > 0.05; figura 1C).

228

Figure 1: Box-plot showing the data obtained in T1. In A) GSH concentration, B) GPx activity and C) CAT activity. The center line of the box-plot corresponds to the median value, while the limits correspond to the 25th and 75th percentiles. The upper limit of the bar corresponds to the difference between the maximum value and the 75th percentile plus 1.5 interquartile intervals; the lowest corresponds to the highest of the lowest value and the 25th percentile minus 1.5 interquartile ranges. *Statistically different from SHAM (p <0.05).



236

237

238 T2 data

239 Hematological parameters

Red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), platelets (PLT), hemoglobin
concentration (HGB), hematocrit (HTC) and mean corpuscular hemoglobin
concentration (MCHC) did not show statistical differences between groups (p> 0.05).
The mean corpuscular volume (MCV) was lower in all infarcted groups when compared
to the SHAM group, regardless of having any of the scaffolds implanted or not. In

- association, mean corpuscular hemoglobin (MCH) was also lower in all infarctedgroups when compared to SHAM (figure 2).
- 247
- 248 Figure 2: WBC, RBC, HGB, HCT, PLT, MCV, MCH and MCHC in the SHAM groups;
- 249 CONTROL; S-CF (infarction + scaffold 1) and S-CFP (infarction + scaffold 2). Values
- 250 were presented as mean \pm SD. *Statistically different from the SHAM group (p <0.05).



- 251
- 252

253 Biochemical profile

In order to verify the safety of scaffolds in cardiac tissue, the measurement of CK-MB, LDH and Troponin I was performed only in the CONTROL, S-CF and S-CFP groups (respectively 297.5 \pm 61.1; 289.3 \pm 65.4; 285.3 \pm 67.2 U/L for CK-MB and 222.0 \pm 95.5; 223.2 \pm 73.1; 237.1 \pm 111.4 U/L for LDH). For all parameters, there was no statistical difference between the groups (p> 0.05).

Troponin I was a qualitative analysis, indicating the presence or not of the marker. The infarcted groups did not show statistical differences (p>0.05). Troponin I was positive in 20% of the animals in the CONTROL group and 0% in both groups with scaffolds.

262

263 Oxidative Stress Markers

GSH showed no difference between groups, despite p=0.084 in the S-CF group when compared to SHAM (figure 3A). The S-CFP group showed higher CAT activity when compared to SHAM (p=0.0425; figure 3B). Regarding GPx, SHAM showed significantly higher GPx activity compared to all infarcted groups (respectively p=0.000053, 0.000061, 0.000137; figure 3C), and also compared to SHAM in T1. TBARS were measured only at T2 (due to the small amount of sample available for collection at T1); the S-CF group showed a significant increase in the concentration of TBARS when compared to the SHAM (p=0.0278; figure 3D).

272

Figure 3: Box-plot showing the data of oxidative stress markers obtained in T2. In A)
GSH concentration; B) CAT activity; C) GPx activity and D) serum TBARS
concentration. *Statistically different from the SHAM group (p <0.05).



276 277

278 Liver profile

S-CFP group showed highier activity of ALT when compared to CONTROL (p=0.038)
and S-CF (p=0.0176; figure 4A). The SHAM group and the CONTROL group did not
present differences, despite p=0.059. For AST, the S-CFP group showed a difference
when compared to CONTROL (p=0.0203) and this group showed difference when
compared to SHAM (p=0.0176; figure 4B).

284 In liver, the GSH concentration in the S-CFP group was higher than in the CONTROL 285 group (p=0.0321; figure 4C). The CONTROL group showed lower GPx activity when 286 compared to SHAM (p=0.000374), S-CF (p=0.000057) and S-CFP (p=0.000065). The 287 S-CF and S-CFP groups were also different from SHAM (respectively, p=0.000138 and 288 p=0.000061; figure 4D). In liver, there was an increase in CAT enzyme activity in the 289 S-CF group when compared to SHAM (p=0.0239; figure 4E). The results of lipid 290 peroxidation (TBARS) were not different from SHAM (data not reported). 291 The histological analyze (figure 4F) hepatic congestion were identified in the infarcted

292 groups, characterized by the accumulation of blood cells inside the vessels. However,

293 congestion has also been identified in SHAM.

294

Figure 4: Box-plot showing data on liver profile markers obtained in T2. In A) ALT activity; B) AST activity; C) GSH in liver tissue; D) GPx activity in liver tissue; E) CAT activity in liver tissue and F) H&E photomicrography in the region of the hepatic portal system, branch of the central portal vein, (CV), in which a) SHAM 200x, b) CONTROL 200x, c) S-CF 200x and d) S-CFP 200x with indication of intact hepatocytes (black arrow). *Statistically different from SHAM (p<0.05). #Statistically different from CONTROL (p<0.05). @Statistically different from S-CF (p<0.05).



302303

304 **Renal profile**

Albumin in S-CFP was higher when compared to SHAM (p=0.0162) and CONTROL (p=0.0115; figure 5A). The S-CFP group also showed an increase in creatinine when compared to SHAM (p=0.0036) and CONTROL (p=0.0107; figure 5B). The S-CFP group showed a higher concentration of urea when compared to SHAM (p=0.0044) and CONTROL (p=0.0032; figure 5C).

For renal GSH, all infarcted groups had a lower concentration compared to SHAM (respectively p=0.000053, 0.000137, 0.000061; figure 5D). Renal GPx showed decreased activity in the S-CFP group when compared to CONTROL (p=0.0162) and S-CF (p=0.017), but there was no difference with the SHAM group, despite p=0.085 (figure 5E). Renal CAT activity was lower in CONTROL compared to SHAM 315 (p=0.0258; figure 5F). There were no changes in the concentration of renal TBARS316 (data not reported).

- 317 Histological sections of the kidneys were also analyzed and there was no identification
- 318 of morphological changes (figure 5G). 10 glomeruli were randomized, per slide, to
- 319 measure their area. The area was calculated using the ZEN® program. Results obtained
- 320 did not show differences between the groups (p>0.05, data not reported).
- 321

322

Figure 5: Box-plot showing data on renal profile markers obtained in T2. In A) albumin concentration; B) creatinine concentration; C) urea concentration; D) GSH in renal tissue; E) GPx activity in renal tissue; F) CAT activity in renal tissue and G) H&E photomicrography in the renal cortex region, in which a) SHAM 200x, b) CONTROL 200x, c) S-CF 200x and d) S-CFP 200x with indication of renal glomeruli (black arrow). *Statistically different from SHAM (p<0.05). #Statistically different from CONTROL (p<0.05). @Statistically different from S-CF (p<0.05).



330

331

332 **DISCUSSION**

In the first stage of this study (T1), redox status markers were assessed. GSH is the main endogenous antioxidant, responsible for regulating oxidative stress and facilitating the elimination of xenobiotics, from drugs to toxicants [24]. Thus, its measurement becomes essential when the objective is to certify a possible mechanism of action for a new product. It is known that the endogenous antioxidant information system is part of an adaptive mechanism of cells, it responds directly to the supply of FR present in the body [25].

Thus, knowing that AMI is an event that produces FR and reactive species in large quantities, the fact that all infarcted groups differed statistically from the SHAM group may be directly related to this adaptive response. The increase in this production may have induced an increase in GSH production, considering that the T1 measurementswere made 2 weeks after the infarction induction.

345 The action of GSH is catalyzed by a series of enzymes; among them, GPx is the enzyme 346 antioxidant of great relevance to assess oxidative stress [39]. Its activity can be directly 347 proportional to the supply of ROSs present in the body [26; 27]. Thus, when GPx 348 activity in the S-CFP group was higher than in the SHAM group, there is an indication 349 that, for some reason, the concentration of ROSs may be higher in that group. However, 350 the authors do not associate this phenomenon with the scaffold 2. There's anothers 351 factors that could be involved here, the anesthesia time and the proporcional GSH 352 increased. It can also be correlated with the results obtained in GSH, since in T1 the 353 concentrations were higher, indicating potential oxidative stress.

354 CAT is another antioxidant enzyme very important in the regulation of the organism's 355 redox state, being responsible for the neutralization of hydrogen peroxide (H_2O_2) 356 radicals [28]. And at T1, there was no statistical difference between the groups.

After euthanasia (T2), a sufficient amount of blood could be collected, and thus hematological, biochemical and redox findings are discussed. In hematological parameters, there was a reduction in MCV and MCH in the infarcted groups. Biochemical parameters showed an increase in Albumin, Creatinine, ALT and AST in the S-CFP group. In terms of oxidative stress parameters, the main findings involve an increase in enzymes also in the S-CFP group, and an increase in TBARS in the S-CF group. Histology showed no difference between groups.

Among the hematological parameters, the fact that the WBC count did not show statistical differences between the groups is an important data to highlight the safety of the scaffolds, with the absence of an inflammatory response.

367 MCV and MCH are parameters widely used to diagnose anemia; however, in an 368 infarcted patient, similar conditions are common. Considering that the demand for 369 oxygen in the infarcted tissue increases, the supply is not always sufficient, being 370 directly related to the reduction of MCV and MCH [29]. The reduction in MCV and 371 MCH may also be linked to abnormal blood flow and hypoxia of endothelial cells, 372 which are very present in post-infarction conditions [30]. In addition, it must be 373 considered that the FR are largely generated by ischemic cells, and can cause damage 374 and deformities in blood cells [31].

- Troponin I usually rises 6 hours after AMI, reaching its peak in about 24 hours; this parameter falls just after its peak [32; 33]. Its absence indicates that there was no cardiac injury at the time of collection. In view of the findings, both scaffolds were not associated with any other cardiac damage besides the previously established infarction, considering CK-MB, LDH and troponin I.
- GSH showed no statistical difference between groups in T2, so it can be suggested,
 once again, that the organism adjusted, and the concentration of GSH reached levels
 similar to SHAM over the 2 months of treatment.
- In T2, an opposite effect was observed in GPx when compared to T1: all infarcted groups were statistically smaller compared to SHAM. Zhang [34] also used oxidative stress parameters to assess the effect of a cardioprotective agent on AMI; amid the results, GPx enzyme was more active in SHAM group. The suggestion involves an enzymatic induction by increasing the substrate. Although the GSH at T2 did not show statistical difference between the groups, its concentration almost doubled from T1 to T2.
- Considering that we have a pre-established AMI, high oxygen demand due to AMI in combination with the high production of ROS by ischemic tissue, we can speculate that this is the mechanism behind the oscillatory enzyme activity of GPx, in addition to GSH levels in T2. We can also suggest that these results may indicated an adaptive response [25; 35; 36].
- In T2, the S-CFP group showed higher CAT activity when compared to SHAM. Taking into account that the activity of some enzymes is reduced by the impairment caused by AMI [34; 37], it may be that CAT has not been directly affected. CAT activity may be more related to the supply of H_2O_2 [38], suggesting that there was an overproduction of this reactive species in the S-CFP group, which may be related to the scaffold 2.
- 400 Among other markers of lipid peroxidation, MDA (measured by TBARS) plays an 401 important role in cardiac damage, since it may be associated with a decrease in 402 antioxidant enzymes [39]. The S-CF group showed a significant increase in TBARS 403 compared to SHAM. Despite the compensatory mechanism suggested earlier, this 404 parameter found an increase in lipid peroxidation.
- To assess the liver profile, the following parameters were used: liver transaminases
 (ALT and AST), oxidative stress markers and histology. Liver transaminases (ALT and
 AST) are important markers for verified the safety of a product; its elevation is directly

408 related to liver damage [40]. Liver enzymes tend to increase their activity in case of 409 AMI; however, exposure to anesthetics is also possibly responsible for increasing the 410 activity of these enzymes [41]. The results suggest that scaffold 2, produced with the 411 conducting agent polyaniline, may possibly be related to some hepatotoxic mechanism, 412 still unclear.

413 On the other hand, the same group that received scaffold 2 showed an increase in GPx 414 and GSH, important endogenous antioxidants. This increase in GSH in the S-CFP group 415 suggests that this scaffold may be involved in some antioxidant mechanism. The 416 CONTROL group had less GPx activity. Knowing that the balance of the redox system 417 in the liver depends on the integrity of antioxidant enzymes [37], and that AMI may be 418 responsible for inhibiting these enzymes [27], the result of the CONTROL group is as 419 expected.

Polyaniline was the differential compound of the S-CFP group. Polyaniline is a watersoluble biomaterial rich in hydrogen, known for having antioxidant activity related to hydrogen ion donation [42]. It is an agent that still presents few studies of safety profile, especially in *in vivo* models, making it difficult to evaluate and associate some outcomes [25;36]. The analysis may suggest that polyaniline is involved in some antioxidant or even pro-oxidant mechanism.

There was also an increase in CAT activity in the S-CF group. Shin et al. (2019) [43] describe that the CAT antioxidant activity is dependent on the tissue in which it is found, being higher in the liver. The production of ROS and RNSs involved in AMI does not seem to have affected liver CAT, since the CONTROL group had activity similar to SHAM. Zhao [38] describe that the enzyme not yet inactivated, can appear with increased activity, being related to the supply of H₂O₂, to neutralize these reactive species. It is assumed that this was the case for the S-CF group.

The non-target organs chosen for histological safety analysis were the liver and kidney, considering their importance in metabolism and excretion, as well as the consequences suffered in a post-AMI setting [41]. Hepatic congestion was observed in all infarcted and SHAM groups. The anesthetic used in the study (isoflorane) has low hepatic biotransformation and cytoxicity; even so, isoflurane may be related to some mild to moderate liver injuries [44]. Therefore, the appearance of hepatic congestion in the noninfarcted group is possibly related to the use of anesthesia. Despite congestion, liver structures were healthy in all groups. As described in the literature [8], scaffolds can beconsidered safe when thinking in a liver context.

442 To evaluate the renal profile, some biochemical parameters (albumin, creatinine and 443 urea), oxidative stress markers and histology were used. Considering the events related 444 to the occurrence of AMI, the metabolism of albumin is directly affected. Among all the 445 consequences, inflammation from AMI reduces synthesis and increases albumin 446 catabolism, inducing hypervolemia [45]. Although this case was not observed in the 447 study, it is known that some diseases and inflammatory conditions can alter the albumin 448 metabolism, inducing a decrease in fluid retention [30]. It can be speculated that the 449 treatment time had an opposite effect on the groups, especially in the S-CFP group. 450 Also considering reduced GSH in the kidney in the same group, scaffold 2 may be 451 related to some oxidative mechanism, inducing hypovolemia.

452 Creatinine is another important parameter when assessing kidney function. is. AMI may 453 be related to impaired renal function, raising creatinine levels in acute moments [46]. 454 However, Chalikias [47] in a cohort study describe that two thirds of patients after AMI 455 returned to normal creatinine levels while one third progressed to Chronic Kidney 456 Disease. Thus, for this paramether, scaffold 2 may be in mechanisms of renal damage, 457 since it was the only group to increase creatinine levels.

In cases of AMI, serum urea levels rise; this elevation is caused by decreased blood
flow to the kidneys due to dehydration or even heart failure [48]. The elevation of urea
in the S-CFP group also corroborates the findings of albumin and creatinine.

AMI directly affects the balance between GSH/GSSG, which may be related to the depletion of GSH and the establishment of oxidative stress [5]. The concentration of GSH has not been restored in the kidney, despite the treatment time; therefore, all infarcted groups were statistically different from the SHAM group, contrary to what was observed in serum T2 levels.

Analyzing the renal results of GPx, S-CFP showed less activity. In cases of ischemia,
the enzymatic potential may be limited [27; 34], suggesting scaffold 2 may have
worsened this condition.

AMI is a process that can trigger the production of ROSs and RNSs; considering that CONTROL showed less CAT activity compared to SHAM, it is suggested that overproduction of ROSs depleted or inhibited CAT in the kidney. The presence of ions can also trigger the production of FR, such as the hydroxyl radical (•OH), and even 473 aggravate oxidative stress [34]. Knowing that some transition metals can convert H_2O_2 474 to •OH (Fenton's reaction), and that the kidney is an organ with a high concentration of 475 ions, the absence of the reactive H_2O_2 species may be directly related to the reduction of 476 CAT activity in CONTROL, considering the direct relationship between CAT and 477 H_2O_2 .

478 Kidney also plays a role in the detoxification of the body, being subject to different 479 consequences in heart failure (HF). HF can increase sodium reabsorption in the 480 proximal tubules, also increasing its concentration in the renal corpuscle. This 481 hyperfiltration of salts is directly related to the increase in the area of the glomeruli [49]. 482 Histological analysis was performed in order to visualize this increase. However, 483 considering the time of the experiment, the animals may not have developed the renal 484 syndrome related to HF; it must also be taken into account that there was no worsening 485 in the renal scope that may be related to any of the scaffolds.

486

487 CONCLUSION

Acording to the findings, safety studies *in vivo* are important and crucial for a new
product. Animals that were implanted with the scaffolds did not show any cardiac
damage beyond the AMI already established, considering the cardiac markers.

The group that received the scaffold 2, with polyaniline, showed changes in several enzymes, mainly liver transaminases and antioxidant enzymes. It is suggested that the components of this scaffold could be related to some hepatotoxic mechanism and FR precursor, considering that the increase in enzymes may be related to some adaptive mechanism. The scaffold 1, without polyaniline, did not show any physiological changes, suggesting it is safe and perhaps the ideal device to continue this line of research.

498 Despite some limitations of a small rodent *in vivo* study, the eventual effect of 499 anesthetic drugs and even systematic errors, the results corroborate data already found 500 in the literature and enrich the knowledge already existing in the area. However, as 501 expected from a preclinical study, more studies should be done in order to advance in 502 the area.

503

504 **REFERENCES**

505

1. WANG, X. Y. et al. The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure.

506		BioMed Research International, 2020, p. 2018035, 2020.
507	2.	NAGASAWA, A. et al. Basic fibroblast growth factor attenuates left-ventricular
508		remodeling following surgical ventricular restoration in a rat ischemic cardiomyopathy
509		model. General Thoracic and Cardiovascular Surgery, v. 68, p. 311-318, 2020.
510	3.	VAN DER POL, A. et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and
511		future. European Journal of Heart Failure, p. 1-11, 2018.
512	4.	POLUEKTOV, Y. M. et al. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte
513		contractile function in hypoxic conditions. Scientific Reports, v. 9, p. 4872, 2019.
514	5.	ORTIZ, V. D. et al. Carvedilol and thyroid hormones co-administration mitigates
515		oxidative stress and improves cardiac function after acute myocardial infarction.
516		European Journal of Pharmacology, v. 854, p, 159-166, 2019.
517	6.	GARCIA, S. C. et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and
518		physiological conditions. Drug and Chemical Toxicology. v. 36, n. 3, p. 306-312,
519		2013.
520	7.	AZEVEDO, P. S. et al . Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact,
521		Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. Brazilian Archives of
522		Cardiology, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2016.
523	8.	ALVES, T. F. R. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse
524		Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical
525		Properties. Journal of Material Sciences & Engineering. v. 7, n. 5, p. 1-9, 2018.
526	9.	ROSELLINI, E. et al. Development and characterization of a suturable biomimetic
527		patch for cardiac applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine,
528		v. 30, n. 129, 2019.
529	10.	BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk
530		fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. Carbohydrate Polymers. v. 128, n. 5,
531		p. 41-51, 2015.
532	11.	DU, J. et al. Potential applications of three-dimensional structure of silk
533		fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering.
534		Applied Surface Science. v. 447, n. 31, p. 269-278, 2018.
535	12.	D'AMORE, A. et al. Bi-layered polyurethane e Extracellular matrix cardiac patch
536		improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. Biomaterials. v. 107, p.
537		1-14, 2016.
538	13.	TALEBI, A.; LABBAF, S.; KARIMZADEH, F. A conductive film of chitosan-
539		polycaprolcatone-polypyrrole with potential in heart patch application. Polymer
540		Testing , v. 75, p. 254-261, 2019.
541	14.	ZHU, W; PRETORIUS, D; ZHANG, J. Cardiac Patch-Based Therapies of Ischemic

542 Heart Injuries. Cardiovascular Regenerative Medicine, p. 141-171, 2019. 543 15. RAMÍREZ, R. et al. Nanotecnología aplicada a conservar la matriz extracelular como 544 herramienta teranóstica en el infarto agudo de miocardio. Revista Española de 545 Cardiología, v. 72, n. 2, p. 171-174, 2019. 546 16. RAHNAVARD, M. et al. Curcumin ameliorated myocardial infarction by inhibition of 547 cardiotoxicity in the rat model. Journal of Cellular Biochemestry, v. 120, n. 7, p. 548 11965-11972, 2019. 549 17. ALVES, T. F. R. et al. Biomimetic dense lamellar scaffold based on a colloidal 550 complex of the polyaniline (PANi) and biopolymers for electroactive and 551 physiomechanical stimulation of the myocardial. Colloids and Surfaces A: 552 Physicochemical and Engineering Aspects, v. 579, p. 123650, 2019. 553 18. SERT, N. P. et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting 554 animal research. PLOS Biology, p. 1-12, 2020. 555 19. ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 556 v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959. 557 20. PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative 558 characterization of erythrocyte glutathione peroxide. Journal of Laboratory and 559 Clinical Medicine, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967. 560 21. AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. v.105, p.121-126, 1984. 561 22. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by 562 Thiobarbituric Acid reaction. Analytical Biochemistry, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979. 563 23. TOLOSA, E. M et al. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2° ed. 564 São Paulo: Manole, 2003. 565 24. TSUGAWA, S. et al. Glutathione levels and activities of glutathione metabolism 566 enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. 567 Journal of Psychopharmacology, v. 33n. 20, 2019. 568 25. CARRETERO, A. et al. Early reductive stress and late onset overexpression of 569 antioxidant enzymes in experimental myocardial infarction. Journal Free Radical 570 Research, v. 54, n. 2, p. 173-184, 2020. 571 26. JAFRI, S. A. A.; HYDER, M. A.; MAHOOD, S. The Study of Oxidents and 572 Antioxidents in Patients of Accute Myocardial Infarction. International Journal of 573 Scientific Research, v. 8, n. 11, p. 32-33, 2019. 574 27. OLIVEIRA-SILVA, J. A. et al. Oxidative stress assessment by glutathione peroxidase 575 activity and glutathione levels in response to selenium supplementation in patients with 576 Mucopolysaccharidosis I, II and VI. Genetics and Molecular Biology, v. 42, n. 1, p. 1-577 8, 2019.

- 578 28. REN, L. et al. Glutathione Might Attenuate Cadmium-Induced Liver Oxidative Stress
 579 and Hepatic Stellate Cell Activation. Biological Trace Element Research, v. 191, p.
 580 443-452, 2019.
- 581 29. KANIC, V. et al. Age-Specific Sex-Based Differences in Anemia in Patients with
 582 Myocardial Infarction. Journal of Women's Health, v. 28, n. 7, p. 1004-1010, 2019.
- 583 30. KHONGKHATITHUM, C. et al. Abnormal red blood cell indices increase the risk of
 arterial ischemic stroke in children. Journal of Clinical Neuroscience, v. 62, p. 117585 120, 2019.
- 586 31. SOLTANIAN, A. et al. Comparative evaluation of therapeutic effects of silymarin and
 587 hydrocortisone on clinical and hematological alterations, and organ injury (liver and
 588 heart) in a low-dose canine lipopolysaccharide-induced sepsis model. Veterinary
 589 Research Forum, v. 11, n. 3, p. 235-241, 2020.
- 32. ATERE, M.; GALLIGAN, S. Unusual Troponin Level in Atrioventricular Nodal
 Reentrant Tachycardia Despite Normal Coronary Arteries. American Journal of Case
 Reports, v. 21, p. e922831-1–e922831-3, 2020.
- 33. WEI, J. et al. False decrease of high-sensitivity cardiac troponin T assay in pneumatic
 tube system samples. Clinica Chimica Acta, v. 495, p. 507-511, 2019.
- 34. ZHANG, X. et al. Ameliorative effect of ferruginol on isoprenaline hydrochloride induced myocardial infarction in rats. Environmental Toxicology, p. 1-8, 2020.
- 597 35. TSUGAWA, S. et al. Glutathione levels and activities of glutathione metabolism
 598 enzymes in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis.
 599 Journal of Psychopharmacology, v. 33n. 20, 2019.
- 600 36. KULIKOVA, T. N. et al. Discrimination of Tea by the Electrochemical Determination
 601 of its Antioxidant Properties by a Polyaniline DNA Polyphenazine Dye Modified
 602 Glassy Carbon Electrode. Analytical Letters, v. 52, n. 16, 2019.
- 603 37. PARK, W. S. et al. Hesperidin Shows Protective Effects on Renal Function in
 604 Ischemia-induced Acute Kidney Injury (Sprague-Dawley Rats). Transplantation
 605 Proceedings, v. 51, p. 2838-2841, 2019.
- 38. ZHAO, M. X. et al. Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates
 the resistance of cells to reactive oxygen species. Cell Stress and Chaperones, v. 24, p.
 608 609-619, 2019.
- 39. ANSARIA, M. A. et al. Effects of nimodipine, vinpocetine and their combination on
 isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Biomedicine &
 Pharmacotherapy, v. 109, p. 1372-1380, 2019.
- 40. MOGHIMIAN, M. et al. The Effects of Omega-3 on Liver Damage after Acute
 Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Clinical Trial. Internacional

614	Cardiovascular Research Jounal, v. 13, n. 1, p. 5-10, 2019.
615	41. ZARE, E. N. et al. Progress in Conductive Polyaniline-Based Nanocomposites for
616	Biomedical Applications: A Review. Journal of Medicinal Chemistry, v. 63, n. 1, p.
617	1-22, 2020.
618	42. NEGHAB, M. et al. Toxic responses of the liver and kidneys following occupational
619	exposure to anesthetic gases. EXCLI Journal, v. 19, p. 418-429, 2020.
620	43. SHIN, S. K. et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative
621	stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice. European Journal of
622	Physiology , v. 471, p. 829-843, 2019.
623	44. ZHU, Y. et al. Isoflurane anesthesia induces liver injury by regulating the expression of
624	insulin-like growth factor 1. Experimental and Therapeutic Medicine, v. 13, n. 4, p.
625	1608-1613, 2017.
626	45. ÇINAR, T. et al. Prognostic efficacy of C-reactive protein/albumin ratio in ST
627	elevation myocardial infarction. Scandinavian Cardiovascular Journal, v. 53, n. 2, p.
628	83-90, 2019.
629	46. COIRO, S. et al. Association of diabetes and kidney function according to age and
630	systolic function with the incidence of sudden cardiac death and non-sudden cardiac
631	death in myocardial infarction survivors with heart failure. European Journal of Heart
632	Failure, v. 21, n. 10, p. 1248-1258, 2019.
633	47. CHALIKIAS, G. et al. Long-term impact of acute kidney injury on prognosis in
634	patients with acute myocardial infarction. International Journal of Cardiology, v.
635	283, n. 15, p. 48-54, 2019.
636	48. SINGH, S. K. et al. Impact of blood urea and serum creatinine level on ejection
637	fraction in acute myocardial infarction patient. Indian Journal of Basic and
638	Applied Medical Research, v. 9, n. 1, p. 225-231, 2019.
639	49. KUNO, A. et al. Empaglifozin attenuates acute kidney injury after myocardial
640	infarction in diabetic rats. Scientific Reports, v. 10, p. 7238, 2020.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em conta as informações, deve-se considerar que os estudos de segurança *in vivo* são de extrema importância. O *scaffold* 1 não apresentou alterações fisiológicas evidentes, sugerindo ser seguro e talvez o dispositivo ideal para dar seguimento nesta linha de pesquisa.

O scaffold 2 pode estar envolvido em algum mecanismo de hepatoxicidade, considerando a elevação das transaminases hepáticas. Entretanto, nenhum dos dois *scaffolds* foi relacionado a um possível dano cardíaco. Esta conclusão é reafirmada com base nos resultados hematológicos, que não sugeriram outras injúrias além do que já havia se estabelecido. O *scaffold* 2 chama a atenção mais uma vez com o aumento de enzimas antioxidantes (CAT e GPx), sugerindo um possível efeito antioxidante. Mas não se pode descartar a hipótese de que os resultados obtidos tenham sido fruto de uma resposta adaptativa do organismo, levando em consideração a elevação da atividade das transaminases.

A histologia não apresentou alterações morfológicas condizente com qualquer dano que possa ter sido resultado dos *scaffolds* nos órgãos não-alvo estabelecidos. Assim, podemos levar em consideração que o dano hepático ainda seja apenas molecular.

Apesar de algumas limitações do estudo inerentes ao próprio modelo *in vivo*, como a eventual interferência do método anestésico ou erros sistemáticos, os resultados corroboram dados já encontrados na literatura e enriquecem o conhecimento já existente na área. Entretanto, como se espera de um estudo pré-clínico, mais estudos aprofundados devem ser feitos com a finalidade de avançar na área.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. v.105, p.121-126, 1984.

ALVES, T. F. R. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Sciences & Engineering**. v. 7, n. 5, p. 1-9, 2018.

ALVES, T. F. R. et al. Biomimetic dense lamellar scaffold based on a colloidal complex of the polyaniline (PANi) and biopolymers for electroactive and physiomechanical stimulation of the myocardial. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 579, p. 123650, 2019.

AZEVEDO, P. S. et al . Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. **Brazilian Archives of Cardiology**, v. 106, n. 1, p. 62-69, 2016.

BARBOSA, F. M.; MARTINS, A. R. Effect of Preparation Method in the Properties of Iron Oxide Catalysts for Fenton Reaction. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 5, p. 607-616, 2020.

BARUD, H. G. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**. v. 128, n. 5, p. 41-51, 2015.

BEREZIN, A. E.; BEREZIN, A. A. Adverse Cardiac Remodelling after Acute Myocardial Infarction: Old and New Biomarkers. **Disease Markers**, p. 1-21, 2020.

BRADU, C. et al. Reactive nitrogen species in plasma-activated water: generation, chemistry and application in agriculture. **Journal of Physics D: Applied Physics**, 53, p. 223001, 2020.

CAETANO, J. A.; SOARES, E. Qualidade de Vida de Clientes Pós-Infarto Agudo do Miocárdio. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**, v. 11, n. 1, p. 30-37, 2007.

CHENG, G. et al. Advanced Silk Fibroin Biomaterials for Cartilage Regeneration. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, p. 2704-2715, 2018.

D'AMORE, A. et al. Bi-layered polyurethane e Extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. **Biomaterials**. v. 107, p. 1-14, 2016.

DU, J. et al. Potential applications of three-dimensional structure of silk fibroin/poly(ester-urethane) urea nanofibrous scaffold in heart valve tissue engineering. **Applied Surface Science**. v. 447, n. 31, p. 269-278, 2018.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.

FALUDI, A. A., et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipideias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 2, p. 1-92, 2017.

FARRINELLI, G. et al. Natural iron ligands promote a metal-based oxidation mechanism for the Fenton reaction in water environments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, p. 12241, 2020.3

FREITAS, A. P.; ANTIORIO, A. T. B.; SEABRA, D. I. **Anestesia e Analgesia em Animais de Laboratório** - Universidade Estadual de Campinas, 2017. Disponível em:

https://w2.fop.unicamp.br/bioterio2/anestesiaanalgesia2017.pdf Acesso em 24 de Agosto de 2020.

GABRIEL-COSTA, D. The pathophysiology of myocardial infarction-induced heart failure. **Pathophysiology**, v. 25, p. 277-284, 2018.

GARCIA, S. C. et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 36, n. 3, p. 306-312, 2013.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. v. 35, n. 5, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine, 4 ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HARASH, G. et al. Heart ventricular histology and microvasculature together with aortic histology and elastic lamellar structure: A comparison of a novel dual-purpose to a broiler chicken line. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0214158, 2019.

HAZINI, A. et al. Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction. **Postepy w Kardiologii Interwencyjnej**. v. 4, n. 42, p. 298-303, 2015.

HE, S. et al. The conductive function of biopolymer corrects myocardial scar conduction blockage and resynchronizes contraction to prevent heart failure. **Biomaterials**, v. 258, p. 120285, 2020.

INGLES, D. P. et al. Supplemental Vitamins and Minerals for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment. **Current Cardiology Reports**, 22, n. 4, p. 22, 2020.

JAFRI, S. A. A.; HYDER, M. A.; MAHOOD, S. The Study of Oxidents and Antioxidents in Patients of Accute Myocardial Infarction. **International Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 11, p. 32-33, 2019.

JAKUBCZYK, K. et al. Reactive Oxygen Species - Sources, Functions, Oxidative Damage. **Polish Medical Journal**, v. 48, n. 284, p. 124-127, 2020.

JAMSHIDI-KIA, F. et al. Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. **Journal of Herbmed Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 191-19, 2020.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 12^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIM, S. H. et al. 4D-bioprinted silk hydrogels for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 260, p. 120281, 2020.

KISHIMOTO, Y.; YOSHIDA, H.; KONDO, K. Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. **Marine Drugs**, v. 14, n. 35, p. 1-13, 2016.

KOTECHA, D. et al. Impact of Renal Impairment on Beta-Blocker Efficacy in Patients With Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 23, p. 2893-2904, 2019.

MARTINS, S. M. Death from Cancer and Cardiovascular Disease between Two Brazils. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 114, n. 2, p. 207-208, 2020.

MELKE, J. et al. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. Acta Biomaterialia. v. 31, p. 1-16, 2016.

MUKOSERA, G. T. et al. Nitric oxide metabolism in the human placenta during aberrant maternal inflammation. **Journal of Physiology**, v. 598, n. 11, p. 2223-2241, 2020.

NAGASAWA, A. et al. Basic fibroblast growth factor attenuates left-ventricular remodeling following surgical ventricular restoration in a rat ischemic cardiomyopathy model. **General Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 68, p. 311-318, 2020.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PACIFICO, S. et al. Biomaterials Containing the Natural Antioxidant Quercetin: Synthesis and Health Benefits. **Macromolecular Symposia**. v. 389, n. 1, p. 1900060, 2020.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxide. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine,** v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PASSINHO, R. S. et al. Sinais, Sintomas e Complicações do Infarto Agudo do Miocárdio. **Reuol - Revista de Enfermagem**, 12, n. 1, p. 247-264, 2018.

POLUEKTOV, Y. M. et al. Glutathione-related substances maintain cardiomyocyte contractile function in hypoxic conditions. **Scientific Reports**, v. 9, p. 4872, 2019.

RAMÍREZ, R. et al. Nanotecnología aplicada a conservar la matriz extracelular como herramienta teranóstica en el infarto agudo de miocardio. **Revista** Española de Cardiología, v. 72, n. 2, p. 171-174, 2019.

RAHNAVARD, M. et al. Curcumin ameliorated myocardial infarction by inhibition of cardiotoxicity in the rat model. **Journal of Cellular Biochemestry**, v. 120, n. 7, p. 11965-11972, 2019.

RODRIGUES, I. C. P. et al. Engenharia de Tecidos Cardíacos: Atual Estado da Arte a Respeito de Materiais, Células e Formação Tecidual. **einstein**. v. 16, n. 3, p. 1-9, 2018.

ROSELLINI, E. et al. Development and characterization of a suturable biomimetic patch for cardiac applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 129, 2019.

RUOCCO, G.; PALAZZUOLI, A.; MAATEN, J. M. The role of the kidney in acute and chronic heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 25, p. 107-118, 2020.

SMIT, M. et al. The Pathophysiology of Myocardial Ischemia and Perioperative Myocardial Infarction. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, p. 1-12, 2019.

TALEBI, A.; LABBAF, S.; KARIMZADEH, F. A conductive film of chitosanpolycaprolcatone-polypyrrole with potential in heart patch application. **Polymer Testing**, v. 75, p. 254-261, 2019.

TOLOSA, E. M et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2° ed. São Paulo: Manole, 2003.

URSO, M. L.; CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supple¬mentation. **Toxicology**. v. 189, n. 1-2, p. 41-54, 2003.

VAN DER POL, A. et al. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, p. 1-11, 2018.
WANG, X. Y. et al. The Biomarkers for Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. **BioMed Research International**, 2020, p. 2018035, 2020.

WEIL, B. R.; NEELAMEGHAM, S. Selectins and Immune Cells in Acute Myocardial Infarction and Post-infarction Ventricular Remodeling: Pathophysiology and Novel Treatments. **Frontiers in Immunology**, 10, n. 300, p. 1-15, 2019.

WENDLAND, A. E.; FARIAS, M. G.; MANFROI, W. C. Volume Plaquetário Médio e Doença Cardiovascular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, p. 5, p. 371-378, 2009.

WU, L. et al. Targeting Oxidative Stress and Inflammation to Prevent Ischemia-Reperfusion Injury. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, p. 1-13, 2020.

XANTHOPOULOS, A. et al. Heart Failure and Liver Disease. Jacc: Heart Failure, v. 7 n. 2, p. 87-97, 2019.

YAO, Y. et al. Reactive oxygen species (ROS)-responsive biomaterials mediate tissue microenvironments and tissue regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 5019-5037, 2019.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 92, n. 2, p. 157-164, 2009.

ZHOU, H; TOAN, S. Pathological Roles of Mitochondrial Oxidative Stress and Mitochondrial Dynamics in Cardiac Microvascular Ischemia/Reperfusion Injury. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 85, 2020.

ZHU, W; PRETORIUS, D; ZHANG, J. Cardiac Patch-Based Therapies of Ischemic Heart Injuries. **Cardiovascular Regenerative Medicine**, p. 141-171, 2019.

ZIEGLER, T. et al. Atherosclerosis and the Capillary Network; Pathophysiology and Potential Therapeutic Strategies. **Cells**, v. 9, n. 50, p. 1-13, 2020.

ZWEIER, J. L.; ILANGOVAN, G. Regulation of Nitric Oxide Metabolism and Vascular Tone by Cytoglobin. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 32, n. 16, p. 1172-1187, 2020.

ANEXO I



CEUAUnicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado <u>ANÁLISE DA APLICAÇÃO DE</u> <u>MATERIAIS BIODEGRADÁVEIS PARA AVALIAÇÃO DE REMODELAMENTO E</u> <u>CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA EM MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA</u> <u>MIOCÁRDICA</u> (protocolo CEUA/UNICAMP nº <u>4417-1/2017</u>), de responsabilidade do <u>Prof. Dr. Lindemberg da Mota Silveira Filho</u>, teve a solicitação de prorrogação de término do projeto em 31/12/2020 aprovada pela CEUA/UNICAMP.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 29/11/2016.

Campinas, 13 de novembro de 2018.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro Coordenador

Fátima Alonso Secretária Executiva