AMANDA SARAGÓ

**Recelularização de biomateriais derivados de vasos sanguíneos da
superfície alantocoriônica da placenta bovina**

São Paulo

2020

AMANDA SARAGÓ

**Recelularização de biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície
alantocoriônica da placenta bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Silva Nunes Barreto

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3887
FMVZ

Saragó, Amanda
Recelularização de biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície
alantocorônica da placenta bovina / Amanda Saragó. – 2020.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto.

1. Bioengenharia tecidual. 2. Células progenitoras endoteliais. 3. Recelularização. I.
Título.

São Paulo, 30 de outubro de 2019
CEUA N 9715100718

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Rodrigo Da Silva Nunes Barreto

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "RECELULARIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS DERIVADOS DE VASOS SANGÜÍNEOS DA SUPERFÍCIE ALANTOCORIÔNICA DA PLACENTA BOVINA".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 005322)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 07/outubro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: " Para fins de publicação o termo "scaffold" contido no título e texto foi alterado para "biomaterial". ".

Comentário da CEUA: "Solicitação de troca de título".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SARAGÓ, Amanda

Título: **Recelularização de biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família por seu apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) pela bolsa concedida Código de Financiamento 001.

A minha família Ricardo Jorge Saragó, Sandra Maria Matias Saragó e Alessandra Saragó pelo apoio incondicional.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Barreto pela paciência, compreensão e ajuda essencial.

A Dra. Nathia Nathaly Rigoglio por toda colaboração no cultivo celular e processo de recelularização.

Ao meu aluno de iniciação científica Ricardo Tonetto Florit por todo auxílio durante o processamento histológico.

Aos funcionários Daura Vaz, Paulinha, Ronaldo e a todos Professores do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Dos Animais Domésticos e Silvestres por terem proporcionado auxílio a minha permanência diária.

A professora Dr. Maria Angélica Miglino pelo auxílio e atenção.

A Dra. Thaís Girão da Silva, Dra. Paula Fratini e Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira Nishiyama pelas contribuições na banca de qualificação e no projeto.

Aos colegas de mestrado Gustavo de Sá Schiavo Matias, Jessica Borghesi, Ana Carolina Rabelo, pelos ensinamentos e treinamento no cultivo celular.

Aos colegas de mestrado Igor Smirnow, Lucas Luiz Rocha Rosestolato, Tarley Santos de Oliveira, Kadja, Rafael Rodrigues Daniel, Antônio Alexandre Speri Alves por todo auxílio e apoio essencial durante o projeto e na finalização do mesmo.

Aos colegas, Henrique Inhauser Riceti Magalhães, Dara Rúbia Souza Silva, Mônica Duarte da Silva, Cristiano Ribas por todo auxílio, apoio essencial e revisões do exame de qualificação.

As amigas Adriana Raquel, Cátia Helena de Almeida Lima Massari, Carla M^a Figueiredo de Carvalho Miranda, Poliana Garcia Corrêa pelos conselhos, apoio e amizade.

Ao amigo Doutorando Marcos Paulo Batista Assunção por todo apoio nas correções e amizade.

A amiga Alessandra Cristina Sousa pelo apoio e correções de português.

Ao amigo Marco Antônio de Melo pelo apoio e sugestões de texto.

As colegas Ana Lídia Jacinto, Ana Clara Bastos, Luana Félix, Anaelise Turqueti por todo auxílio e amizade. Meu muito obrigada!

Ao amigo Doutorando Túlio Teruo Yoshinaga por todo apoio e amizade.

Diga assim minha filha: “Já deu certo!”

Maria do Carmo Matias, avó amada Carminha

RESUMO

SARAGÓ, A. **Recelularização de biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina.** 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Com o aumento de doenças vasculares e necessidade de substituição de vasos sanguíneos danificados são crescentes os avanços na bioengenharia de vasos sanguíneos. Embora vasos autólogos sejam a principal opção de uso, muitas vezes podem estar com acesso limitado. Enxertos sintéticos seriam uma alternativa para a substituição. Entretanto, para enxertos de diâmetro menor que 6 mm, a taxa de insucesso a longo prazo é alta, devido a trombo, infecção ou estenose. Atualmente buscam-se alternativas na bioengenharia de tecidos, e dentre os biomateriais de origem animal, temos os derivados de tecidos descelularizados, resultando em arcabouços de matriz extracelular. Assim, biomateriais derivados de órgãos com abundante rede vascular mantida após a descelularização seriam fontes favoráveis para produção de biomateriais vascularizados e/ou enxertos vasculares. Diante disto, a placenta bovina além de possuir abundante sistema vascular, que se assemelha a vasos humanos de pequeno e médio diâmetro. Ela ainda pode ser coletada sem prejuízo ao doador e manter a estrutura e composição da matriz extracelular (MEC) mesmo após a descelularização. Para a recelularização desse biomaterial, células progenitoras endoteliais são necessárias para reconstituição do endotélio, portanto a eleição de uma linhagem progenitora endotelial com superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular teria uma maior utilidade para tal finalidade. O presente estudo tem como objetivo geral promover a recelularização em biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina com uso de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e com superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF). Para tanto, a placenta bovina foi descelularizada por perfusão com solução SDS, em concentrações crescentes (0,01 a 1 %), e seus vasos sanguíneos derivados da superfície alantocoriônica foram isolados e seccionados para validação da descelularização. O procedimento foi validado por quantificação de gDNA genômico, histologia básica, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Outros fragmentos foram esterilizados sob ponto crítico LEICA EM

CPD 300 (-5°C a 40°C), e submetidos à recelularização em cultivo celular estático em placa de 24 poços, com $2,5 \times 10^4$ células por poço para ambas as linhagens (SV-VEGF e SV) durante 7 dias. Por último a recelularização foi validada por meio marcação nuclear por DAPI em microscopia confocal, imunohistoquímica, histologia básica e microscopia eletrônica de varredura MEV. Os resultados iniciais demonstraram preservação da matriz extracelular após a descelularização e adesão celular inicialmente aos três dias de cultivo para ambas as linhagens de células originárias de fonte xenogênica ao modelo bovino.

Palavras-chave: Bioengenharia tecidual. Células progenitoras endoteliais. Recelularização.

ABSTRACT

SARAGÓ, A. **Recellularization of blood vessel-derived biomaterials from the allantoichorionic surface of the bovine placenta.** 2020. 60 f. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

With the increase in vascular diseases and the need to replace damaged blood vessels, advances in blood vessel bioengineering are intensive. Although autologous vessels are the main use option, they can often have limited access. Synthetic grafts would be an alternative option for replacement. However, for grafts with a diameter of less than 6 mm, in the long run, the failure rate is high due to thrombus, infection or stenosis. Thus, alternatives are sought in tissue bioengineering. Among the biomaterials of animal origin, we currently have those derived from decellularized tissues, resulting in extracellular matrix frameworks. Thus, biomaterials derived from organs with an abundant vascular network maintained after decellularization would be favorable sources for the production of vascularized biomaterials and / or vascular grafts. In view of this, the bovine placenta, in addition to having an abundant vascular system, resembles human vessels of small and medium diameter. It can still be collected without prejudice to the donor and maintain the structure and composition of the extracellular matrix (MEC) even after decellularization. To recellularize this biomaterial, endothelial progenitor cells are necessary for endothelial reconstitution, therefore the choice of an endothelial progenitor line with overexpression of the vascular endothelial growth factor would be more useful for this purpose. The present study has the general objective of promoting recellularization using endothelial progenitor cells of the canine yolk sac (strain SV) and endothelial progenitor cells of the canine yolk sac transduced with VEGF and with overexpression of eGFP (strain SV-VEGF) in biomaterials derived from blood vessels of the allantoic chorionic surface of the bovine placenta. For this purpose, the bovine placenta was decellularized by perfusion with SDS, in increasing concentrations (0.01 to 1 %), and its blood vessels derived from the allantoic chorionic surface were isolated and sectioned for validation of decellularization. We validated this procedure by quantifying the remaining gDNA; absence of nuclei and composition of MEC by basic histology, immunohistochemistry, and its structure by scanning electron microscopy (SEM). Other fragments were sterilized at a critical point LEICA EM CPD 300 (-5°C to 40°C) and submitted to recellularization in static cell culture in a 24-well plate, with

2.5,10⁴ cells per well for both strains (SV-VEGF and SV) for 7 days. Finally, recellularization was validated by visualizing cell adhesion by DAPI using confocal microscopy, immunohistochemistry, basic histology, and SEM scanning electron microscopy. The initial results demonstrated preservation of the extracellular matrix after decellularization and cell adhesion initially at three days of culture for both cell lines originating from a xenogenic source to the bovine model.

Keywords: Tissue bioengineering. Endothelial progenitor cells. Recellularization.

SUMÁRIO

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	BIOENGENHARIA DE TECIDOS.....	16
2.2	PLACENTA BOVINA.....	18
2.3	COMPONENTES DOS VASOS SANGUÍNEOS.....	19
2.4	CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS DO SACO VITELINO	21
2.5	RECELULARIZAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS.....	22
3	HIPÓTESE.....	26
4	JUSTIFICATIVA	27
5	OBJETIVO GERAL	28
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6	MATERIAL E MÉTODOS	29
6.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
6.2	DESCELULARIZAÇÃO.....	30
6.2.1	Dissecação Dos Arcabouços Vasculares	30
6.2.2	Quantificação de DNA Remanescente nos Arcabouços Vasculares.....	31
6.2.3	Análise Histológica	31
6.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura	32
6.2.5	Imunohistoquímica.....	32
6.3	RECELULARIZAÇÃO	33
6.3.1	Cultivo Celular	33
6.3.2	Esterilização do biomaterial vascular para Recelularização	33
6.3.3	Recelularização por Cultivo Estático.....	34
6.4	VALIDAÇÃO DA RECELULARIZAÇÃO.....	35
6.4.1	Fluorescência	35
6.4.2	Imunohistoquímica.....	35
7	RESULTADOS	37
8	DISCUSSÃO.....	46
9	CONCLUSÃO	51
10	REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia de tecidos, ao menos parcialmente, tenta suprir a crescente demanda por enxertos vasculares devido ao aumento do número de doenças vasculares e por sua vez devido à necessidade de substituição de vasos sanguíneos danificados (DAVIGNON, 2004; MALLIS et al., 2019). Apesar de vasos autólogos serem uma opção comumente utilizada, muitas vezes estes podem estar indisponíveis, e neste caso, vasos cadavéricos ou mesmo enxertos xenogênicos podem ser uma opção de uso (HARSKAMP et al., 2013; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016).

Por décadas vem-se utilizando enxertos sintéticos, onde a substituição de artérias de maior diâmetro (>8 mm) apresentam sucesso quanto a perfusão sanguínea (BIANCARI et al., 2001; STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007; KOOBATIAN et al., 2016). Entretanto, há maior possibilidade de ocorrência de trombose e alterações de fluxo sanguíneo a longo prazo nos enxertos de menor diâmetro (VERTREES et al., 2009; KUMAR et al., 2011; HARSKAMP et al., 2013). Devido à ausência de endotélio íntegro e, portanto, com menores propriedades anti-trombogênicas e/ou de estrutura passível de suportar pressão sanguínea arterial (ZHOU et al., 2009; SHIRAKIGAWA; TAKEI; IJIMA, 2013; KOOBATIAN et al., 2016; DAHAN et al., 2017).

Sendo assim, enxertos vasculares produzidos por descélularização de vasos sanguíneos, vem sendo desenvolvidos, pois apresentam maior biocompatibilidade ao hospedeiro, quando comparado aos enxertos de material sintético, tornando-os mais vantajosos. Para a produção de tais enxertos por descélularização tem-se buscado fontes diferentes daquelas de eleição (ZHANG et al., 2007; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016). Diante disto, vasos placentários principalmente de origem bovina, se tornam uma interessante fonte, visto que: podem ser obtidos sem danos ao doador, são abundantes na placenta, e mantêm sua estrutura após descélularização. Por conseguinte, há a necessidade de associar estes enxertos a fontes celulares capazes de reconstituir o endotélio e sua função anti-trombogênica, ou seja, utilizar células progenitoras endoteliais. Portanto, o objetivo deste projeto é recelularizar biomaterial de vasos sanguíneos derivados da superfície

alantocoriônica da placenta bovina com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e com superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A bioengenharia de tecidos é um segmento da medicina regenerativa e um de seus objetivos é suprir com os biomateriais produzidos a partir dos processos de descelularização e recelularização a demanda crescente por órgãos ou tecidos nas filas de transplante. Após a remoção celular durante o processo de descelularização, o arcabouço tecidual resultante deve ter preservada sua estrutura anatômica bem como a constituição e a arquitetura da sua matriz extracelular (MEC) (UYGUN et al., 2010; KAKABADZE et al., 2018). Pois a MEC é uma estrutura de suporte que fornece microambiente para as diversas funções celulares, tais como: interação, migração e proliferação celular (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011). Atualmente, diversos órgãos e tecidos têm sido submetidos ao processo de descelularização, tais como órgãos ricamente vascularizados como: fígado, coração, pulmão, placenta ou mesmo parte deles, como vasos sanguíneos, pele, traquéia (GRIFFITH; NAUGHTON, 2002; BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; KAKABADZE et al., 2018; LIN et al., 2018).

Após a produção do arcabouço tecidual muitas vezes há a necessidade de igualar este ao tecido nativo, portanto realiza-se a sua recelularização (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016). Nesse procedimento é ideal que a fonte celular não cause reação imunológica contra o organismo hospedeiro após o transplante, além de conferir funcionalidade ao órgão ou tecido (STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007; ZHANG et al., 2007; SCARRITT et al., 2015).

Para a durabilidade do órgão (ou parte dele) e sua integração com o organismo é essencial a presença de vascularização íntegra (RADISIC et al., 2004; NOVOSEL; KLEINHANS; KLUGER, 2011; MILLER et al., 2012; BENRASHID et al., 2016); uma vez que há a exigência de perfusão sanguínea com transporte de gases e nutrientes para o organismo (BERSINI et al., 2016).

Associada a este fator tem-se, em paralelo, a demanda crescente por reparos a vasos sanguíneos danificados e revascularização do miocárdio ampliando assim a busca por enxertos vasculares que propiciem permeabilidade e funcionalidade em longo prazo (HARSKAMP et al., 2013; BENRASHID et al., 2016; MCKAVANAGH et al., 2017; MALLIS et al., 2019).

O uso de enxertos vasculares de grande diâmetro (> 8 milímetros) constituídos de polímeros apresentam resultados satisfatórios na perfusão sanguínea (BREWSTER, 1997; BIANCARI et al., 2001; STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007). Quando em menor diâmetro (< 6 milímetros), enxertos autólogos apresentam melhor biocompatibilidade, pois são relatadas complicações nesses enxertos de origem sintética como formação de trombo e estenose. Estes são relacionados à ausência de suporte a diferentes níveis de pressão sanguínea ou quanto a falta de permeabilidade do enxerto em longo prazo (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004; BENRASHID et al., 2016; MALLIS et al., 2019). Para a escolha de vasos autólogos utiliza-se comumente a veia safena em humanos, porém muitas vezes esta pode apresentar acesso limitado (KLINKERT et al., 2004; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016; MCKAVANAGH et al., 2017).

Diante dessa situação, nas últimas duas décadas, diversos estudos com vasos sanguíneos descelularizados vêm sendo desenvolvidos para a produção de biomaterial vascular, entre eles: artéria carótida, artéria pulmonar, aorta, artéria ilíaca, veias safena e ilíaca; tanto de modelos animais como humanos (NIKLASON et al., 1999; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016; LIN et al., 2018). Uma vez descelularizado, para melhor integração ao hospedeiro e realização da função vascular, esse biomaterial precisa ser recelularizado. Porém, a recelularização de forma ordenada e que permita a funcionalidade vascular (principalmente anti-trombogênese e manutenção do tônus) ainda estão em desenvolvimento (STEGEMANN; KASZUBA; ROWE, 2007; ZHANG et al., 2007; SHIRAKIGAWA; TAKEI; IJIMA, 2013; SCARRITT et al., 2015).

2.2 PLACENTA BOVINA

A placenta é o órgão responsável pela nutrição, respiração, excreção e produção de hormônios durante a gestação, auxiliando também no desenvolvimento e proteção do conceito (LEISER, R.; KAUFMANN, 1994; JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2013). Morfologicamente, nos ruminantes, a placenta é do tipo cotiledonária, zonária e vilosa devido à presença de vilos coriônicos. Esta se integra aos tecidos endometriais através da interdigitação entre o tecido fetal (cotilédone) e o tecido materno (carúncula) formando então na região de integração estruturas denominadas de placentônios (LEISER, R.; KAUFMANN, 1994; ASSIS NETO et al., 2009; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). Nestas estruturas ocorrem as trocas materno fetal de gases e nutrientes (MIGLINO; DIDIO, 1992).

Vacas gestantes podem ter de 70 a 142 placentônios, separados por áreas intercotiledonárias de cório liso. Além disso, seu número e tamanho aumentam com o desenvolvimento e a vascularização de ambos os seus constituintes (LEISER, R.; KAUFMANN, 1994; ASSIS NETO et al., 2009; FURUKAWA; KURODA; SUGIYAMA, 2014). Quanto a interação materno fetal, a placenta bovina é classificada como sinepteliocorial, pois há migração e fusão das células binucleadas do trofoblasto com as células do epitélio uterino (LEISER, R.; KAUFMANN, 1994). Na gestação, a membrana coriônica se funde com o alantoide formando a superfície alantocoriônica que é densamente vascularizada (MOSSMAN; STRAUSS, 1963; LEISER, R.; KAUFMANN, 1994). O potencial de anastomose dessa rede vascular, num transplante, pode ser superior ao da placenta humana (KAKABADZE et al., 2019).

Na placenta bovina as artérias umbilicais se ramificam compondo o sistema vascular da superfície alantocoriônica. Dessa forma os cotilédones são irrigados promovendo o fluxo sanguíneo materno-fetal, e após a capilarização forma-se o sistema venoso que retornará para os vasos umbilicais (LEISER et al., 1997).

De acordo com Kakabadze et al. (2019), a placenta bovina descelularizada mantém preservada sua rede vascular, que supera em quantidade e volume os vasos na placenta humana. Portanto, a placenta bovina mostra-se uma interessante fonte para obtenção de vasos para fins de bioengenharia de tecidos (SANTOS; SILVA; BELETTI, 2017; BARRETO et al., 2018).

Com relação aos componentes da matriz extracelular placentária, esta é constituída de forma geral, por proteínas fibrosas (colágenos e elastina), glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina), além de proteoglicanos e glicosaminoglicanos que formam a parte amorfa da matriz extracelular (PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016; BARRETO et al., 2018; KAKABADZE et al., 2018).

2.3 COMPONENTES DOS VASOS SANGUÍNEOS

Os vasos sanguíneos, de forma geral, possuem características estruturais em comum e são compostos basicamente por três camadas:

- ✓ túnica íntima: envolve a luz do vaso e é constituída por células endoteliais apoiadas sobre membrana basal e camada subendotelial constituída de lâmina elástica interna (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2013).
- ✓ túnica média: constituída de células musculares lisas entremeadas por matriz extracelular rica em fibras de colágeno tipo III e IV, e proteoglicanos; é espessa em artérias (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2013).
- ✓ túnica adventícia: camada mais externa, é composta por colágeno do tipo I e III, fibras elásticas e fibroblastos. É descrito que os colágenos I e III, em associação com a elastina, são os principais responsáveis pela resistência mecânica da parede vascular (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Sendo a elastina uma proteína fibrosa que constitui a matriz extracelular vascular, esta confere a propriedade de elasticidade aos tecidos (DAAMEN et al., 2007; WAGENSEIL; MECHAM, 2009; ALMINE et al., 2010).

Algumas particularidades fogem à regra geral de composição dos vasos: em capilares sanguíneos estão presentes apenas a túnica íntima formada por endotélio fenestrado (que permite troca mútua de diferentes substâncias) apoiado sobre a membrana basal. As veias diferem das artérias por possuírem membrana basal fina ou ausente; túnica média menos espessa, e adventícia mais desenvolvida (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2013).

Na túnica adventícia de grandes vasos, estão presentes o *vaso vasorum*, que são vasos de menor calibre (arteríolas, capilares e vênulas) responsáveis pela nutrição da parede deste grande vaso (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, 2013). As células que compõem cada uma destas três camadas possuem propriedades específicas. Na túnica íntima, o endotélio possui propriedades anti-trombogênicas, que facilitam o fluxo laminar sanguíneo através do vaso, além de estar envolvido no processo de regulação do tônus vascular por liberação de óxido nítrico, sendo este um vasodilatador endógeno (DAVIGNON, 2004; WAGENSEIL; MECHAM, 2009; SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

A túnica íntima está particularmente envolvida no processo de aterosclerose, pois o endotélio íntegro impede a adesão de plaquetas e leucócitos, bem como a proliferação de células musculares lisas da túnica média, a qual levaria à hiperplasia da parede e formação de trombo (HELENA et al., 2001; ZHANG et al., 2007; WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

Na túnica média, as células musculares estão envolvidas com a manutenção da integridade dos vasos e propriedades mecânicas, importante para a manutenção da pressão arterial e o fluxo sanguíneo (ZHANG et al., 2007; WAGENSEIL; MECHAM, 2009;).

Na túnica adventícia, fibroblastos estão envolvidos na manutenção do tecido conjuntivo frouxo com a produção de colágeno. Tal conteúdo ajuda a prevenir a ruptura dos vasos (WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

2.4 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS DO SACO VITELINO

O saco vitelino é uma estrutura formada pelo endoderma e o mesoderma vascularizado, encontrado na maioria dos animais vertebrados. Tal estrutura expressa numerosos fatores de crescimento, proteínas e receptores associados que controlam sua diferenciação e função, incluindo a angiogênese, caracterizada por brotamento de novos vasos a partir de células endoteliais diferenciadas (LEE et al., 1983; AUERBACH; HUANG; LU, 1996; FREYER; RENFREE, 2009; ANDERSON et al., 2011; REN et al., 2015). Este anexo embrionário tem a função de nutrir o embrião, e é considerado o primeiro local de desenvolvimento do sistema vascular, devido às suas células terem a capacidade de se diferenciar em eritrócitos, leucócitos e endotélio (AUERBACH; HUANG; LU, 1996; SCHNEIDER et al., 2016).

As células progenitoras endoteliais podem ser encontradas no saco vitelino durante a embriogênese, como também no cordão umbilical e medula óssea (ASAHARA et al., 1997, 1999; INGRAM et al., 2004; WILLIAMS, 2005; OLIVEIRA et al., 2010; MEDINA et al., 2017). Conforme anteriormente mencionado estas células que têm capacidade de diferenciar em células endoteliais podem ser caracterizadas pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular (WIJELATH et al., 2004; MEDINA et al., 2017).

O fator de crescimento endotelial vascular VEGF está envolvido na vasculogênese e angiogênese nas primeiras etapas da diferenciação dos hemangioblastos e por consequência na formação vascular. Assim, devido ao potencial angiogênico do VEGF sugere-se que células progenitoras endoteliais estejam envolvidas no reparo vascular *in vivo*, processo baseado na migração, proliferação e formação de células endoteliais (NEUFELD et al., 1999; PATAN, 2000; LIU et al., 2010; MEDINA et al., 2017).

Fratini et al. (2016) obtiveram 9 embriões caninos no 20º dia de gestação de campanhas de castração e caracterizaram células do saco vitelino canino como células progenitoras endoteliais (SV) a partir da expressão de marcadores de pluripotência e fatores angiogênicos (NANOG, OCT-4, PCNA, VEGF), e também produziram a linhagem de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com o fator de crescimento

endotelial vascular (VEGF) com controle positivo (superexpressão) para eGFP denominada (linhagem SV-VEGF). Esta, demonstrou seu potencial progenitor endotelial aumentado e com capacidade de fluorescer em verde diante de uma análise em microscopia confocal. Sendo esta capacidade de fluorescência em verde útil para monitorar a neovascularização (FRATINI et al., 2016, 2018). Também de acordo com Fratini et al. (2018) células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e com superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF) demonstraram adesão celular em placentas caninas anteriormente descelularizadas e esterilizadas por ponto crítico, além de terem formado “cordões” em direção ao biomaterial vascular similar a formação de endotélio. Neste estudo, também foi observado em análise imunocitoquímica que houve a superexpressão de fibronectina, sugerindo a interação das células SV-VEGF com a matriz extracelular canina.

2.5 RECELULARIZAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS

Enxertos descelularizados com posterior procedimento de recelularização têm sido amplamente estudados nas últimas décadas devido à maior biocompatibilidade no hospedeiro conforme mencionado anteriormente na literatura (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; DAHAN et al., 2011; LIN et al., 2018). Matrizes descelularizadas, as quais possuem constituintes como colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina e glicoproteínas adesivas permitem diferenciação e sinalização celular como também elasticidade para suportar diferentes níveis de pressão sanguínea (SCHMIDT; BAIER, 2000; PAWLOWSKI et al., 2004). Ressalta-se que fibras elásticas, colágenos e proteoglicanos são as principais proteínas estruturais da matriz extracelular que compõem a parede do vaso sanguíneo (SCHMIDT; BAIER, 2000; WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

Para o processo de recelularização necessário para enxertos descelularizados são discutidos diversos parâmetros quanto à fonte celular, número de células e métodos de cultivo (LIN et al., 2018; SCARRIT, 2015). Quanto à fonte celular estas podem ser autólogas (originárias do próprio indivíduo doador do biomaterial descelularizado), alogênicas (originárias de

indivíduo de mesma espécie que o doador) ou xenogênicas (originárias de indivíduos de espécie diferente do doador do biomaterial). Ainda quanto ao tipo celular podem ser indiferenciadas ou completamente diferenciadas (OLIVEIRA et al., 2010; NATASHA G ,et al., 2015).

Entretanto, a concentração ideal de células ainda não está bem estabelecida (LIN et al., 2018; SCHMIDT; BAIER, 2000). Por fim, os métodos de cultivo mais utilizados para recelularização de vasos sanguíneos têm sido estático e dinâmico (NIKLASON et al., 1999; MIRENSKY et al., 2010), sendo que no método estático as células// são pipetadas diretamente no biomaterial e no método de cultivo dinâmico as células entram em contato com o fragmento vascular através de vazão ou perfusão contínua em biorreator(VILLALONA et al., 2010; DAHAN et al., 2012, 2017).

Devido à importância das células endoteliais quanto à sua atividade antitrombogênica e à manutenção do tônus vascular, são realizados diversos métodos para recelularização com as referidas células, a fim de se obter retorno da funcionalidade do enxerto vascular (WAGENSEIL; MECHAM, 2009; HUANG; NIKLASON, 2014; LIN et al., 2018). Citamos a seguir métodos que obtiveram adesão celular e formação de camada endotelial durante o processo de reendotelização.

Dahan et al. (2012) ao reendotelizar o arcabouço de artéria carótida suína utilizou células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Neste trabalho foram comparados dois métodos de cultivo na matriz extracelular: cultivo estático e cultivo dinâmico. Para o cultivo estático foram pipetadas 2×10^4 células HUVEC no lúmen. Permitiu-se adesão por 2 horas para posterior incubação por 35 dias. O protocolo de cultivo dinâmico foi realizado em biorreator desenvolvido em laboratório. Foram inseridas 1×10^5 células HUVEC no lúmen a 50 ml por minuto, com perfusão contínua. Além disso, para mimetizar a pressão sanguínea humana no biorreator, perfundiu-se as células em meio de cultivo sob a pressão de 80 mmHg. Ao comparar os dois métodos no mesmo tempo de cultivo de 30 dias, concluiu-se que sob condições de perfusão contínua houve formação morfológicamente uniforme das células endoteliais em relação ao cultivo estático indicado por expressão de GFP.

Recentemente em estudo pré-clínico Dahan et al. (2017) analisaram a permeabilidade do biomaterial vascular de artéria carótida, in vivo, em modelo suíno. A permeabilidade e biocompatibilidade do enxerto foram analisadas por angiografias e análises anátomo patológica após seis semanas de implantação. Foi concluído que a reendotelização, com células autólogas, realizada por perfusão contínua proporcionou atividade antitrombogênica comprovando assim a utilidade de enxertos descelularizados reendotelizados.

Para Robertson et al. (2014) a perfusão contínua sentido retrógrado e anterógrado foi um fator importante para reendotelizar os arcabouços vasculares da matriz cardíaca de ratos com 2×10^7 células endoteliais alogênicas durante 7 dias de cultivo.

Além dos diferentes métodos, também são inseridos no processo de recelularização de enxertos vasculares fatores de crescimento como VEGF 165 (165 aminoácidos) com biomoléculas de heparina. Pois a isoforma VEGF 165 que possui potencial angiogênico, sofre degradação por proteólise in vivo em 10 a 20 minutos (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; ZHOU et al., 2009). Uma vez associada à heparina tal fator de crescimento permanece com maior estabilidade (tempo de vida). Assim, permite-se o maior número de ligações de células endoteliais com a matriz extracelular quando tratada com tais fatores (ZHOU et al., 2009; SHIRAKIGAWA; TAKEI; IJIMA, 2013; KOOBATIAN et al., 2016). A utilização de fatores de crescimento e biomoléculas têm melhorado processos de reendotelização de acordo com LIN et al. (2018).

Com relação ao uso de fatores de crescimento e biomoléculas podemos também citar o estudo de Koobatian et al. (2016) que utilizou um vaso manipulado a partir da submucosa intestinal de suínos, a qual foi tratada com VEGF 165 e heparina na concentração de 8000 U/mL. Independente da concentração utilizada de heparina, esta demonstrou estabilizar a ação do VEGF 165 na matriz descelularizada. Após um mês de implantação do biomaterial, este demonstrou endotelização funcional por células autólogas.

Recentemente, Mallis et al. (2019) analisaram a adesão celular em arcabouços vasculares de pequeno diâmetro originários de artérias umbilicais humanas descelularizadas e estudaram duas formas de recelularização: por agitação e em biorreator. Foi adicionada a concentração de 2×10^5 células

estromais mesenquimais *Wharton's jelly* (células tronco do cordão umbilical) para ambos protocolos de cultivo. No cultivo por agitação em seis dias as células aderiram apenas na túnica adventícia. E no cultivo em biorreator por perfusão durante cinco dias os fragmentos passaram inicialmente por cultivo estático durante um dia, para serem então colocados em biorreator desenvolvido em seu laboratório. Com este protocolo foram visualizadas células aderidas em lúmen formando uma camada fina de morfologia similar a um endotélio. Diante da vasta quantidade de métodos e fonte celular, há a necessidade de mais estudos para a padronização da reendotelização de vasos sanguíneos descelularizados.

3 HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho constitui-se no fato de que a adesão de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF) seja permitida por biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina.

4 JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade da obtenção de enxertos vasculares por meio da bioengenharia de vasos sanguíneos, placentas bovinas poderiam ser tecidos vantajosos, uma vez que podem ser obtidas sem prejuízo ao doador, além de possuírem um abundante sistema vascular semelhante a vasos humanos, em diâmetro e volume. Ainda para a recelularização desse biomaterial, células progenitoras endoteliais são necessárias para a reconstituição do endotélio, portanto a eleição de linhagem progenitora endotelial de espécie canina pode ser útil, além disso a referida linhagem celular poderá demonstrar ou não adesão de células de origem xenogênica ao modelo bovino.

5 OBJETIVO GERAL

Recelularizar biomaterial derivado de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF).

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar a descelularização de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina através de microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura, imunohistoquímica e quantificação de DNA;
- Analisar, após recelularização, a adesão celular de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV), e analisar a adesão de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF) ambas através de microscopia confocal e imuno-histoquímica.
- Analisar a interação bem como o potencial progenitor endotelial das células SV e SV-VEGF na matriz extracelular posterior a recelularização por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 9715100718).

6.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 1: Desenho Experimental

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: São apresentados: a descелularização e dissecção de arcabouços de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina descелularizada; cultivo celular de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF); preparo do biomaterial vascular e por fim procedimento de recelularização do mesmo com as células cultivadas.

6.2. DESCELULARIZAÇÃO

Foi utilizada uma placenta bovina obtida em abatedouro frigorífico com idade estimada (método “crown-rump”) de 270 dias de gestação. Após incisão na linha anti-mesometrial no terço médio do corno uterino gestante, se expôs as membranas fetais, endométrio e o feto. O saco alantocoriônico foi individualizado e as artérias umbilicais canuladas com cateteres nº 14 acopladas ao biorreator ORCA (Harvard Apparatus, EUA). Inicialmente foi realizada a perfusão com solução tampão fosfato (PBS: 136,9 mL de NaCl, 26,8 mL de KCl, 14,7mL de KH_2PO_4 e 8,1 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2) com volume constante de 0,5 mL/min até completar a limpeza do sistema vascular. Foi realizada a perfusão com solução de 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em água destilada (1mL/min) por 24 horas. Subsequentemente a solução foi alterada para 0,1% de SDS durante 48 horas, depois foi feita a alteração para 0,25% (1mL/min) por mais 48 horas, 0,5% (1mL/min) por 72 horas e por fim 1% (1mL/min) por 72 horas. O saco alantocoriônica descelularizado foi então perfundido com 1% de Triton X-100 (# 0694-1L, Amresco-Solon, EUA) durante três horas. Por fim, foram lavados com PBS durante 24 horas.

6.2.1 Dissecção Dos Arcabouços Vasculares

Após a finalização do processo de descelularização da placenta bovina os arcabouços vasculares umbilicais (artérias e veias descelularizadas) da superfície alantocoriônica foram isolados por dissecção com auxílio de bisturi lâmina 22 e pinça anatômica. Parte dos arcabouços vasculares dissecados da superfície alantocoriônica da placenta bovina foram então fragmentados em segmentos de 4 cm de comprimento (resultando num total de 11 fragmentos), lavados manualmente em solução salina (PBS) com 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina (três vezes de 15 minutos) e imersos em meio básico de cultivo (α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB e 0,5 % de antibiótico penicilina/estreptomicina). Após exposição durante 30 minutos sob luz ultravioleta, para esterilização, os fragmentos foram congelados para

posterior recelularização. Três fragmentos foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado para posterior validação do processo de descelularização.

6.2.2 Quantificação de DNA Remanescente nos Arcabouços Vasculares

Foram coletados 4 fragmentos de arcabouço vascular de aproximadamente 1cm a partir de vasos sanguíneos descelularizados da superfície alantocoriônica da placenta bovina. Após 48 horas em estufa, obtivemos $1,0058 \times 10^3$ mg de peso seco para quantificação de DNA genômico (gDNA). Foi realizada a maceração e digestão da amostra com 80 µl de Proteinase Tampão K (0,375 M de NaCl e 0,12 M de EDTA), 10 µl de SDS 20%, 8 µl de proteinase K (25 mg / mL) e 280 µl de água ultrapura durante 3 horas a 56 ° C. Em seguida, foi resfriada e adicionado 120 µl de NaCl 5 M e centrifugado à temperatura ambiente por 10 minutos a 13.000 rpm. Os sobrenadantes foram recuperados e a eles adicionou-se 1 mL de etanol a 100%, incubado a -80°C por 15 min. A seguir foram centrifugados a 4°C por 10 min a 14.000 rpm e mantidos a - 80°C por mais 20 minutos. Os sobrenadantes foram removidos novamente, 1 mL foi adicionado etanol a 70% e foram realizadas centrifugações. Os sobrenadantes foram removidos mais uma vez e as amostras foram secas a temperatura ambiente e diluído em 20 µl de água ultrapura. Em seguida o DNA genômico foi quantificado usando um reagente Quant - iT™ DNA PicoGreen® dsDNA (# P7581, Invitrogen - Eugene, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

6.2.3 Análise Histológica

A fim de validar a descelularização bem como analisar a estrutura e preservação da matriz extracelular tanto de vasos sanguíneos controle quanto de vasos descelularizados, previamente foram fixados em paraformaldeído 4% passaram pelos processos de diafanização e desidratação. Em seguida em triplicatas, os fragmentos dos vasos foram incluídos em parafina e realizadas microsecções de 5 µm de espessura em micrótomo manual (RM2265, Leica).

As microsecções foram transferidas para lâminas de vidro para posterior coloração Hematoxilina-Eosina.

6.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a análise estrutural do arcabouço vascular, em triplicatas, fragmentos de vasos sanguíneos controle e descelularizado da superfície alantocoriônica da placenta bovina foram fixados com etanol 70% durante 48 horas, lavados em banho ultra-sônico, e desidratados em uma série crescente de etanol (concentrações 70%,80%,90%,100%) sob agitação vigorosa. Após, foram refixados em tetróxido de ósmio a 1% (SEM R 148- HATFIELD, EUA) por 90 minutos, então foram secas por processo automatizado ponto crítico LEICA EM CPD 300 (-5°C- 40°C) e metalizadas com ouro (#K550, Emitech- Ashford, Reino Unido). As amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Leo 435VP.

6.2.5 Imunohistoquímica

As mesmas amostras, vasos controle e descelularizados foram processadas para histologia sendo novamente seccionadas e transferidas para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (Sigma- Saint, EUA). Assim, estas lâminas foram reidratadas e o passo de recuperação do antígeno realizado em micro-ondas. As lâminas ficaram em alta potência por 4x durante 5 minutos com tampão citrato (1,83 mm de ácido cítrico monohidratado e 8.9 mm de citrato de sódio desidratado trifásico, pH 6.0). A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada durante 30 minutos no escuro. A interação proteica inespecífica foi bloqueada com 2% de albumina de soro bovino (BSA) em solução de tampão fosfato durante 30 minutos. As lâminas foram então incubadas com anticorpos primários: anti elastina (®abcam) durante a noite em uma câmara úmida sob 4° C. Para os controles negativos da reação foram utilizados IgG anti-camundongo irrelevante (#M5284, Sigma) ou IgG anti-coelho (#Ab 27478, abcam-Cambridge, Reino Unido) nas mesmas condições para substituir o anticorpo

primário. A reação foi detectada por Dako Kit Advance HRP, que inclui com anticorpo secundário (#K3468, Dako). As lâminas foram ligeiramente contrastadas com hematoxilina. Entre cada passo, após a incubação do anticorpo, as lâminas foram enxaguadas em PBS contendo BSA a 0,2%. Finalmente, as lâminas foram montadas e visualizadas em um microscópio Nikon Eclipse 80I, e analisadas.

6.3 RECELULARIZAÇÃO

6.3.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas uma alíquota (número de passagens não descrito) de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e uma alíquota (número de passagens não descrito) de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF) provenientes do banco de células do laboratório de Anatomia, Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP. As células foram descongeladas em temperatura ambiente, ressuspensas em meio de cultivo e plaqueadas em garrafas 25 cm² previamente preenchidos em 5 mL de α -MEM (LGC Biotechnology), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico estreptomicina/penicilina sendo incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Ao atingir confluência de 70% (48 horas) foram realizadas novas passagens. Para novas passagens as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo para serem semeadas em novo meio de cultivo (FRATINI et al., 2016).

6.3.2 Esterilização do biomaterial vascular para Recelularização

Para a esterilização, três fragmentos de biomaterial vascular derivados da superfície alantocoriônica da placenta bovina, com aproximadamente 4 cm cada, foram descongelados em estufa por 10 minutos. Cada biomaterial foi segmentado com lâmina de bisturi, em fluxo laminar, em fragmentos de

aproximadamente 0,5 cm cada. Todo o biomaterial vascular fragmentado foi seco em ponto crítico LEICA EM CPD 300 (-5°C- 40°C).

6.3.3 Recelularização por Cultivo Estático

Vinte fragmentos de biomaterial vascular que passaram pelo ponto crítico LEICA EM CPD 300 foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) com antibiótico a 2% (penicilina-estreptomicina) e deixados em placa de petri com meio de cultivo essencial (alfa-MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubados a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas para teste de contaminação.

Passadas essas 24 horas do teste de contaminação, sob ambiente estéril, na placa de 24 poços foram distribuídos fragmentos do biomaterial vascular da seguinte forma: em um único poço, foram colocados dois fragmentos para controle do biomaterial descelularizado. Para a recelularização com células (linhagem SV), foram distribuídos oito fragmentos do biomaterial vascular (sendo dois em cada poço). Estes foram cultivados com $2,5 \times 10^4$ células (linhagem SV) para cada poço (número de passagens não descrito). Mesmo padrão de distribuição dos fragmentos se repetiu para a recelularização com células (linhagem SV-VEGF): Foram distribuídos oito fragmentos, do biomaterial vascular (sendo dois em cada poço), e estes foram cultivados com $2,5 \times 10^4$ células (linhagem SV-VEGF) para cada poço (número de passagens não descrito). Também foram montados poços para controle das células na mesma concentração ($2,5 \times 10^4$) de ambas linhagens (conforme desenho experimental – item 6.1). Fragmentos foram retirados para análises com três e sete dias de cultivo. No terceiro dia de recelularização foram fixados em paraformaldeído 4% para posterior análise: um fragmento descelularizado, quatro recelularizados com células (linhagem SV) e quatro recelularizados com células (linhagem SV-VEGF). O processo de recelularização em placa de 24 poços foi documentado aos cinco dias de cultivo com imagens obtidas em microscopia óptico invertido. E no sétimo dia de recelularização foram fixados em paraformaldeído 4% para posterior análise um fragmento descelularizado,

quatro recelularizados com células (linhagem SV) e quatro recelularizados com células (linhagem SV-VEGF).

6.4 VALIDAÇÃO DA RECELULARIZAÇÃO

A fim de validar a presença de células, bem como a preservação da matriz extracelular do biomaterial após a recelularização, as amostras recelularizadas dos vasos sanguíneos foram processadas (em triplicatas) de forma semelhante ao descrito nos itens 6.2.3 e 6.2.4.

6.4.1 Fluorescência

Essa técnica foi realizada para validar a recelularização e demonstrar a adesão de células (linhagem SV) e (linhagem SV-VEGF) na matriz extracelular do biomaterial vascular. Os biomateriais derivados do item 6.3.3 fixados em paraformaldeído 4%, foram lavados repetidas vezes em solução PBS. Em seguida, os biomateriais foram incubados com DAPI para marcação nuclear (FRATINI et al., 2018) foram analisadas em microscópio Confocal - Olympus Fluo View 1000 (FV1000) e foi observada por fluorescência direta para ambas as linhagens das células. A fluorescência das células em cultivo montadas nos poços controle de ambas as linhagens (SV, SV-VEGF) também foram analisadas durante o experimento e fotografadas aos 5 dias de cultivo. em microscópio Confocal - Olympus Fluo View 1000 (FV1000).

6.4.2 Imunohistoquímica

As mesmas amostras recelularizadas processadas para histologia, em triplicatas, foram novamente seccionadas e transferidas para lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina (Sigma- Saint, EUA). Assim, essas lâminas foram reidratadas e o passo de recuperação do antígeno foi realizado em micro-ondas. As lâminas ficaram em alta potência por 4x durante 5 minutos com tampão citrato (1,83 mm de ácido cítrico monohidratado e 8.9 mm de citrato de

sódio desidratado trifásico, pH 6.0). A peroxidase endógena foi bloqueada com 3% de peróxido de hidrogênio em água destilada durante 30 minutos no escuro. A interação proteica não específica foi bloqueada com 2% de BSA em solução de tampão fosfato durante 30 minutos. As lâminas foram então incubadas com anticorpos primários anti-Elastin (@abcam) e permaneceram durante a noite em uma câmara úmida sob 4° C. Para os controles negativos da reação, foram utilizados IgG anti-camundongo irrelevante (#M5284, Sigma) ou IgG anti-coelho (#Ab 27478, abcam-Cambridge, Reino Unido) nas mesmas condições para substituir o anticorpo primário. A reação foi detectada por Dako Kit Advance HRP, que inclui com anticorpo secundário (#K3468, Dako). As lâminas foram ligeiramente contrastadas com hematoxilina. A cada passo, após a incubação do anticorpo, as lâminas foram enxaguadas em PBS contendo BSA a 0,2%. Finalmente, as lâminas foram montadas e visualizadas em um microscópio Nikon Eclipse 80I, e analisadas.

7 RESULTADOS

Inicialmente pôde ser visualizada a alteração da coloração rósea-avermelhada da placenta bovina controle bem como de sua rede vascular (Figura 2A) para coloração branco translúcida de todo o tecido (Figura 2B) após a descelularização. Foi possível observar, macroscopicamente, a manutenção da organização e integridade da rede vascular da placenta bovina e estes vasos variaram entre 2 a 5 mm de diâmetro.

Figura 2- Anatomia macroscópica da placenta bovina nativa e descelularizada

Fonte: ALVES, A.A.S. (2019).

Legenda: Em (A), observar grandes vasos umbilicais (seta vazia) e ramificações vasculares na superfície alantocoriônica (seta cheia) na placenta bovina nativa; Em (B), mesma placenta após descelularização, observar a manutenção da arquitetura dos grandes vasos (seta amarela) e ramificações vasculares na superfície alantocoriônica da placenta bovina (círculo amarelo)

Na quantificação de DNA genômico dos arcabouços vasculares derivados da superfície alantocoriônica da placenta bovina descelularizada foi confirmado valores abaixo de 50 ng de DNA por mg de peso seco do arcabouço descelularizado (Figura 3).

Figura 3 – Gráfico demonstra a quantificação de DNA genômico nos Arcabouços Vasculares da superfície alantocoriônica da placenta bovina descelularizada

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Observar quantificação de DNA em ng de vaso sanguíneo nativo e de arcabouços vasculares derivados da superfície alantocoriônica da placenta bovina.

Sob microscopia de luz nos vasos sanguíneos derivados da superfície alantocoriônica da placenta na coloração de hematoxilina e eosina (H/E) foi possível observar no vaso sanguíneo nativo, os núcleos corados em roxo (Figura 4A). Paralelamente, nos arcabouços vasculares, houve a ausência de núcleos e preservação das fibras colágenas (Figura 4B).

Ainda na coloração de H/E, após a recelularização em cultivo estático por três e sete dias, em placa de 24 poços, foram observados poucos núcleos celulares corados em roxo, com morfologia similar às células pavimentosas aderidas de forma dispersa nas fibras da matriz extracelular em superfície externa do biomaterial vascular (Figura 4C-4F respectivamente).

Figura 4 - Análise histológica de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica de placenta bovina Nativa, descelularizada e recelularizada

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Hematoxilina eosina, (A) Vaso Nativo, Barra= 20 µm, (^) lúmen: fibras da matriz extracelular coradas em rosa e núcleo celular em roxo; (B) Descelularizada, Barra= 20 µm, (*) superfície externa: núcleos celulares ausentes; (C- F) Recelularizado, Barra= 40 µm, (*) superfície externa: (C), Recelularizada três dias (linhagem SV), núcleos celulares corado em roxo aderidos em superfície externa do biomaterial; (D), Recelularizada três dias com células (linhagem SV-VEGF), fibras da matriz extracelular coradas em rosa e núcleos celulares em roxo aderidos em superfície externa do biomaterial; (E), Recelularizada sete dias (linhagem SV), núcleos celulares corado em roxo aderidos em superfície externa do biomaterial; (F), Recelularizada sete dias com células (linhagem SV-VEGF), fibras da matriz extracelular coradas em rosa núcleos celulares em roxo aderidas em superfície externa do biomaterial.

Ainda sob microscopia de luz nos vasos sanguíneos derivados da superfície alantocoriônica da placenta na coloração de hematoxilina e eosina (H/E) foi possível observar no vaso sanguíneo nativo, os núcleos corados em roxo (Figura 5) visualizados em todas túnica íntima, média e adventícia. Paralelamente, nos arcabouços vasculares, houve a ausência de núcleos e preservação das fibras colágenas em toda estrutura (Figura 6).

Figura 5 - Análise histológica de vaso sanguíneo em cotilédone e superfície alantocoriônica de placenta bovina nativa

FONTE: ALVES, A. A. S. (2019).

Legenda: Hematoxilina eosina, (A) Vaso Nativo, Barra= 100 µm, observar lúmen, túnica íntima, média e adventícia com núcleos celulares corados em roxo e fibras da matriz extracelular coradas em rosa.

Figura 6 - Análise histológica de vaso sanguíneo dissecado da superfície alantocoriônica da placenta bovina descélularizada

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Hematoxilina-eosina, Barra= 10 µm, observar região luminal (*) e preservação de fibras colágenas da matriz extracelular coradas em rosa em toda estrutura do arcabouço vascular da superfície alantocoriônica da placenta bovina descélularizada.

Em relação à microscopia eletrônica de varredura (MEV), no biomaterial vascular houve manutenção das camadas de fibras da matriz extracelular, com espaçamento entre elas além da presença de poros no lúmen (Figura 7A). Após a recelularização de três dias do biomaterial vascular, foi possível observar estruturas aderidas, em maior quantidade na superfície externa do vaso. Foi observada morfologia fibroblastóide, similar às células utilizadas (SV) e (SV-VEGF) (Figura 7B,7C).

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de vasos sanguíneos descelularizados e recelularizados da superfície alantocoriônica da placenta bovina

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: **(A)** barra = 2 μm , descelularizado: Observar preservação de fibras da matriz extracelular do biomaterial vascular e poros no lúmen(seta); Recelularização com três dias de cultivo (B,C): **(B)** barra = 30 μm , células (linhagem SV) em formato pavimentoso aderidas na matriz extra celular do biomaterial vascular; **(C)** barra = 10 μm , células (linhagem SV-VEGF) em formato pavimentoso com formação de cordões aderidas na matriz extra celular do biomaterial vascular.

Com a técnica de imunohistoquímica nas amostras vaso nativo e recelularizadas de sete dias observamos a expressão de elastina no controle nativo e no biomaterial recelularizado com células (SV-VEGF) (Figura 8A-8D). O biomaterial vascular recelularizado de sete dias com células SV também demonstrou expressão positiva para elastina (imagens não obtidas).

Figura 8 – Ensaio de Imunohistoquímica: expressão de elastina no biomaterial vascular da superfície alantocoriônico bovina nativo, e recelularizado com células SV-VEGF

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Barra= 20 μ m, (A) vaso sanguíneo nativo da superfície alantocoriônica da placenta bovina, observar expressão de elastina em toda parede vascular; (B) vaso sanguíneo nativo da superfície alantocoriônica da placenta bovina, controle negativo corado com hematoxilina; (C) biomaterial vascular da placenta bovina recelularização de 7 dias com células (linhagem SV-VEGF), observar expressão de elastina em toda parede vascular; (D) biomaterial vascular da placenta bovina recelularização de 7 dias com células (linhagem SV-VEGF) controle negativo corado com hematoxilina.

No processo de recelularização do biomaterial vascular, em placa de 24 poços, verificamos a proliferação celular da linhagem de células (SV), caracterizadas pela morfologia fibroblastóide, próximo ao biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina aos cinco dias de

cultivo (Figura 9A). Ainda aos cinco dias de cultivo, também para recelularização do biomaterial vascular, com células da linhagem (SV-VEGF), foi observada a proliferação das células com morfologia fibroblastóide e com discreta formação de colônias dispostas em cordões (Figura 9B);

Aos sete dias de cultivo, durante o processo de recelularização com as respectivas linhagens das células (SV) e (SV-VEGF), foi observada alteração morfológica das células para formato tendendo a circular (imagens não obtidas).

Figura 9- Processo de recelularização *in vitro* do biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF)

Vascular biomaterial -Cells (SV)

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Barra: 400µm, (*) biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina; (A, B): Observar migração de células da linhagem (SV e SV-VEGF), respectivamente, ambas com morfologia fibroblastóide e em direção ao biomaterial vascular; no processo de recelularização aos 5 dias de cultivo

Na análise da recelularização do biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina em técnica de Fluorescência por DAPI foi observado no controle descelularizado de três dias a ausência de núcleos aparentes (Figura 9A). O mesmo padrão se repetiu para o controle descelularizado de sete dias (Figura 10D).

Para o fragmento recelularizado com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV), com três dias de cultivo foram observados núcleos corados em azul (Figura 10B). O mesmo padrão se repetiu com três dias de cultivo de células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF)

onde foram observados núcleos corados em azul (DAPI) dispersos por todo biomaterial (Figura 9C).

Aos sete dias de cultivo tanto na recelularização com as células da linhagem (SV), bem como para células da linhagem (SV-VEGF) foram observados núcleos corados em azul (DAPI) aderidos ao biomaterial vascular (Figura 10E,10F respectivamente). Ainda para recelularização com células linhagem (SV-VEGF) eGFP não foi detectado (Figuras10C-10F).

Figura 10- Fluorescência por DAPI sob microscopia confocal do biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina recelularizado com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (SV) e com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP linhagem (SV-VEGF).

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Barra 20 µm ; (A-C) 3 dias de cultivo; (A) biomaterial vascular controle descclularizado, observar núcleos ausentes; (B) biomaterial recelularizado com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (SV), observar núcleos corados em azul por DAPI; (C) biomaterial recelularizado com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e superexpressão de eGFP (SV-VEGF), observar núcleos corados em azul por DAPI, eGFP não observado; (D-F) 7 dias de cultivo; (D) biomaterial vascular controle descclularizado, observar núcleos ausentes; (E) biomaterial recelularizado com células (SV), observar núcleos corados em azul por DAPI; (F) biomaterial recelularizado com células (SV-VEGF), observar núcleos corados em azul por DAPI, eGFP não observado.

O controle para ambas linhagens celulares foram analisados sob microscopia confocal durante todo o período do processo de recelularização. Sendo esta

análise documentado aos 5 dias de cultivo, para as células (linhagem SV) foi demonstrada a marcação nuclear por DAPI coloração em azul (Figura 11A), eGFP ausente (Figura 11B). Merge não detectado (Figura 11C) E ainda para as células (linhagem SV-VEGF) foi demonstrada marcação nuclear por DAPI coloração em azul (Figura 11D) a superexpressão de eGFP coloração em verde (Figura 11F) Observa-se marcação nuclear com DAPI e expressão de e GFP para células controle SVVEGF (Figura. 11F).

Figura 11. Fluorescência direta por DAPI para células (SV) e células (SV-VEGF) e superexpressão de eGFP para células (SV-VEGF)

Fonte: SARAGÓ, A. (2020).

Legenda: Barra: 20µm. (A) observar fluorescência por DAPI para células (SV). (B) observar eGFP ausente para células SV. (C) Merge ausente. (D) Observar fluorescência por DAPI para células (SV-VEGF) (E) Observar superexpressão de eGFP para células (SV-VEGF). (F) Observar merge fluorescência por DAPI e superexpressão de eGFP para células (SV-VEGF).

8 DISCUSSÃO

Em nosso estudo observamos macroscopicamente a manutenção da organização e integridade da rede vascular da placenta bovina após a descelularização realizada por concentrações crescentes de SDS e Triton-X. Barreto et al. (2018) também observou a preservação da arquitetura vascular da placenta bovina descelularizada, após a perfusão vascular com látex. A microscopia eletrônica de varredura mostrou densa rede de fibras da matriz extracelular organizadas em camadas, embora com espaçamento entre as fibras e com presença de poros no lúmen.

Validamos a produção de biomaterial vascular por quantificação de DNA genômico, atingindo os parâmetros estabelecidos Crapo; Gilbert; Badylak, (2011). Também identificamos ausência de núcleos celulares nos fragmentos de biomaterial vascular em coloração por DAPI com análise sob microscopia confocal anterior ao procedimento de recelularização. Além disso, foi possível observar, por meio de histologia e imunohistoquímica, a preservação da matriz extracelular (fibras elásticas) dos biomateriais derivados de vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina. De acordo com Barreto et al., (2018) foi observada a preservação da matriz extracelular de placentas bovinas descelularizadas, por meio da análise mais pormenorizada de seus constituintes, tais como alguns tipos de colágeno (I, III e IV) como glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) por análise de imunohistoquímica Barreto et al. (2018) também observou na luz polarizada através da coloração de picrosírius a presença de colágenos I e III na parede dos vasos placentários. E de acordo com Wagenseil; Mecham,(2009) o colágeno é um dos principais constituintes responsáveis por manter as propriedades biomecânicas de um vaso sanguíneo. Logo esse componente é buscado para proposta de bioengenharia de enxerto vascular conforme Burrows et al. (2012).

A análise imunohistoquímica através de marcadores para elastina no biomaterial nativo e recelularizado com ambas as linhagens de células (SV e SV-VEGF) confirmou a preservação da elastina a qual também é

essencialmente envolvida na elasticidade dos vasos assim como as proteínas fibrosas conforme anteriormente mencionado (NIKLASON et al., 1999; WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

Assim em nossos estudos evidenciamos que vasos sanguíneos descelularizados, extraídos da superfície alantocoriônica da placenta bovina, são biomateriais com potencial promissor para enxertos vasculares uma vez que sua morfologia vascular e constituição de matriz extracelular foi mantida após o processo de descelularização e demonstra constituição da matriz extracelular inerente aos vasos sanguíneos.

De acordo com Dahan et al. (2017) enxertos vasculares reendotelizados proporcionaram ótima atividade antitrombogênica, e para sua funcionalidade é necessária tal recelularização (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011; PASHNEH-TALA; MACNEIL; CLAEYSSSENS, 2016). Ainda, a manutenção da matriz extracelular é requerida na bioengenharia de vasos sanguíneos para que forneça substrato para a adesão e o desenvolvimento de células vasculares, além de possibilitar manutenção da integridade dos vasos diante de diferentes níveis de pressão sanguínea conforme mencionado por outros autores (NIKLASON, L. E. LANGER, R. S., 1997; WAGENSEIL; MECHAM, 2009; ZHOU et al., 2009).

Visto a importância das células endoteliais num enxerto vascular, foram utilizadas neste trabalho, para recelularização, células que possuem grande potencial para formação de endotélio. E ainda tais células demonstraram-se altamente aderentes em biomateriais derivados de placenta canina em sete dias de cultivo. Além disso a escolha de uma linhagem progenitora endotelial canina neste estudo permitiu verificar a adesão de células de fonte xenogênica ao modelo bovino.

Embora outros estudos comprovem que a melhor forma de endotelização seja por perfusão contínua em biorreator (DAHAN et al., 2012, 2017; MALLIS et al., 2019). Neste trabalho optou-se por realizar o protocolo de cultivo estático, invés do cultivo dinâmico em biorreator, pois tivemos como objetivo principal comprovar a adesão celular. Em placa de 24 poços, onde foi feito o processo de recelularização, foram observadas células caninas da linhagem (SV), com morfologia fibroblastóide, próxima ao biomaterial vascular derivado da

superfície alantocoriônica da placenta bovina no processo de recelularização. Conclui-se assim que a presença do biomaterial não inibiu a expansão e proliferação de tais células.

E ainda aos cinco dias de cultivo também para recelularização do biomaterial vascular com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino da linhagem SV-VEGF foram observadas células com morfologia fibroblastóide próximas do biomaterial vascular com discreta formação de colônias dispostas em cordões. De acordo com Fratini et al. (2018) as células SV-VEGF demonstraram, próximo ao biomaterial vascular, a formação de colônias dispostas em cordões similar a um endotélio, sugerindo seu potencial de neovascularização.

Aos sete dias de cultivo, durante o processo de recelularização com respectivas linhagens das células (SV) e (SV-VEGF), observa-se alteração morfológica das células para formato circular em placa de 24 poços, sugerindo perda da aderência de tais células em placa de cultivo.

Em nosso experimento os resultados da recelularização demonstraram-se satisfatórios inicialmente com adesão celular aos três dias de cultivo no biomaterial vascular, as quais permaneceram aderidas, no biomaterial, aos sete dias de cultivo. Foi observada adesão celular tanto de células progenitoras endoteliais caninas do saco vitelino (linhagem SV) quanto de células progenitoras endoteliais caninas transduzidas com VEGF e com superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF). Com a formação de cordões similar a capilares as células SV-VEGF demonstraram maior potencial de neovascularização em relação as células SV nesse estudo conforme Fratini et al. (2016, 2018).

Para demonstrar a presença de células aderidas no biomaterial vascular foram realizadas análises em microscopia confocal, onde verificamos a presença de núcleos corados em azul por DAPI para ambas as linhagens celulares. Além disso, foi observada ausência de expressão para eGFP (coloração verde) em nosso biomaterial vascular recelularizado por células SV-VEGF. Segundo Tsien (1998), diversos fatores podem afetar a detecção de eGFP como a perda da expressão, degradação da proteína, entre outros fatores. Sendo então necessário mais estudos para compreensão dessa

ausência de expressão da eGFP de células SV-VEGF no biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica da placenta bovina.

Conforme a literatura é ideal que a camada endotelial seja formada em superfície luminal do enxerto vascular (DAHAN et al., 2017). No entanto foi observado na análise histológica do biomaterial vascular recelularizado de três e sete dias com células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino (linhagem SV) e com as células progenitoras endoteliais do saco vitelino canino transduzidas com VEGF e com superexpressão de eGFP (linhagem SV-VEGF) poucos núcleos corados em roxo pela coloração de hematoxilina e eosina aderidos na superfície externa do biomaterial contrário a localização anatômica para células endoteliais.

O fato de terem sido observados poucos núcleos no procedimento histológico do biomaterial recelularizado pode estar relacionado com a perda das células no processamento. Durante a técnica muitos fatores podem gerar resultados insatisfatórios. Dahan et al. (2012) utilizou corte congelado em seu biomaterial vascular recelularizado obtendo bons resultados na visualização dos núcleos aderidos a matriz extracelular vascular.

Na microscopia eletrônica de varredura a morfologia das estruturas aderidas ao biomaterial, após o período de cultivo no biomaterial vascular, são compatíveis àquelas apresentadas para a mesma célula em outros biomateriais (FRATINI et al., 2018). E foi observado a preservação de fibras colágenas no biomaterial.

Ao comparar o tempo de cultivo no biomaterial vascular com outros autores, podemos sugerir o alto potencial de adesão e proliferação celular em nosso experimento, uma vez que com três dias de cultivo, a adesão celular no biomaterial vascular tenha ocorrido e estas permaneceram em proliferação no biomaterial até sete dias de cultivo. De acordo com Mallis et al., (2019) a adesão celular de células tronco do cordão umbilical humano ocorreu no enxerto de artérias descelularizadas, também do cordão umbilical humano aos seis dias de cultivo.

E ainda de acordo com Fratini et al. (2018), a adesão de células (linhagem SV-VEGF) ocorreu com sete dias de cultivo. E ainda Dahan et al. (2012) observou que 23 dias de cultivo foram necessários para reendotelização

completa de o arcabouço de artéria carótida suína com células endoteliais extraídas de tecido umbilical humano (HUVEC), tanto em cultivo estático quando dinâmico. Embora o cultivo por perfusão em biorreator demonstre a formação de camada endotelial uniforme na maior parte dos estudos aqui abordados, o cultivo estático foi satisfatório para nossa proposta.

9. CONCLUSÃO

- ✓ Vasos sanguíneos da superfície alantocoriônica da placenta bovina podem ser utilizados como biomateriais após descelularização.
- ✓ Quanto a recelularização foram obtidos resultados satisfatórios, uma vez que nosso biomaterial permitiu adesão e migração de células progenitoras endoteliais.
- ✓ Este estudo demonstra que o biomaterial vascular derivado da superfície alantocoriônica bovina poderia ser outra opção para o desenvolvimento de enxertos vasculares e contribui para seu conhecimento na engenharia de tecidos
- ✓ Com relação às perspectivas futuras, seria útil promover estudos para a padronização da endotelização no biomaterial do estudo, a fim de formar uma fina camada endotelial na superfície luminal.

10 REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. et al. Comparative placentation--a workshop report. **Placenta**, v. 24 Suppl A, p. S100-3, abr. 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-78797-6>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- ALMINE, J. F. et al. Elastin-based materials. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 9, p. 3371, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=b919452p>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- ALVES, A. A. S. **Placenta bovina de clones descelularizada como fonte de “scaffolds” biológicos**. 2019. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-08012020-131800/publico/Antonio_Alexandre_Speri_Alves_original.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964–966, 14 fev. 1997. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.275.5302.964>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- ASAHARA, T. et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 14, p. 3964–3972, 15 jul. 1999. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/18.14.3964>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- ASSIS NETO, A. et al. Morpho-physical recording of Bovine Conceptus (*Bos indicus*) and placenta from days 20 to 70 of pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 760–772, fev. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2009.01345.x>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- AUERBACH, R.; HUANG, H.; LU, L. Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. **Stem Cells**, v. 14, n. 3, p. 269–280, maio 1996. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.140269>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- BADYLAK, S. F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 13, n. 1, p. 27–53, 15 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417722>>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- BARRETO, R. da S. N. et al. Decellularized bovine cotyledons may serve as biological scaffolds with preserved vascular arrangement. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 4, p. e1880–e1888, 13 abr. 2018. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2618>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BENRASHID, E. et al. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application. **Methods**, San Diego, CA, v. 99, n. 6, p. 13–9, 15 abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046202315300335>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BIANCARI, F. et al. Redo Bypass Surgery to the Infrapopliteal Arteries for Critical Leg Ischaemia. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 21, n. 2, p. 137–142, fev. 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078588400912905>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BREWSTER, D. C. Current controversies in the management of aortoiliac occlusive disease. **Journal of Vascular Surgery**, v. 25, n. 2, p. 365–379, fev. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521497703598>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BURROWS, M. C. et al. Hybrid Scaffolds Built From PET and Collagen as a Model For Vascular Graft Architecture. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 12, p. 1660–1670, dez. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201200154>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–43, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296410>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DAAMEN, W. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4378–4398, out. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961207005030>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DAHAN, N. et al. Porcine Small Diameter Arterial Extracellular Matrix Supports Endothelium Formation and Media Remodeling Forming a Promising Vascular Engineered Biograft. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, n. 3–4, p. 411–422, fev. 2012. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2011.0173>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DAHAN, N. et al. Dynamic Autologous Reendothelialization of Small-Caliber Arterial Extracellular Matrix: A Preclinical Large Animal Study. **Tissue Engineering. Part A**, v. 23, n. 1–2, p. 69–79, jan. 2017. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2016.0126>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

DAVIGNON, J. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**,

v. 109, n. 23_suppl_1, p. III-27-III-32, 15 jun. 2004. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–676, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm0603-669>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FRATINI, P. et al. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 71–6, fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26850540>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FRATINI, P. et al. Canine Placenta Recellularized Using Yolk Sac Cells with Vascular Endothelial Growth Factor. **BioResearch Open Access**, v. 7, n. 1, p. 101–106, 2018. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/biores.2018.0014>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FREYER, C.; RENFREE, M. B. The mammalian yolk sac placenta. **Journal of Experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution**, v. 312, n. 6, p. 545–54, 15 set. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985616>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FURUKAWA, S.; KURODA, Y.; SUGIYAMA, A. A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, n. 1, p. 11–18, 2014. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/tox/27/1/27_2013-0060/_article>. Acesso em: 10 jul. 2020.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science**, New York, NY, v. 295, n. 5557, p. 1009–14, 8 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834815>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

HARSKAMP, R. E. et al. Saphenous Vein graft failure after coronary artery bypass surgery. **Annals of Surgery**, v. 257, n. 5, p. 824–833, maio 2013. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-201305000-00007>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-1/009.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

HUANG, A. H.; NIKLASON, L. E. Engineering of arteries *in vitro*. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 71, n. 11, p. 2103–18, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-013-1546-3>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

INGRAM, D. A. et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood**, v. 104, n. 9, p. 2752–2760, 1 nov. 2004. Disponível em:

<<https://ashpublications.org/blood/article/104/9/2752/19414/Identification-of-a-novel-hierarchy-of-endothelial>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. Sistema circulatório. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (Ed.). **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 11, p. 122–134.

KAKABADZE, Z. et al. Decellularized human placenta supports hepatic tissue and allows rescue in acute liver failure. **Hepatology**, v. 67, n. 5, p. 1956–1969, May 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/hep.29713>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

KAKABADZE, Z. et al. Decellularized bovine placentome for portacavally-interposed heterotopic liver transplantation in rats. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, n. December 2018, p. 293–301, Apr. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.025>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

KLINKERT, P. et al. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass: a review of the literature. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 27, n. 4, p. 357–362, abr. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1078588403006063>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

KOUBATIAN, M. T. et al. Successful endothelialization and remodeling of a cell-free small-diameter arterial graft in a large animal model. **Biomaterials**, v. 76, p. 344–358, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215008248>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

KUMAR, V. A. et al. Tissue engineering of blood vessels: functional requirements, progress, and future challenges. **Cardiovascular Engineering and Technology**, v. 2, n. 3, p. 137–148, 2 set. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13239-011-0049-3>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LEE, S. Y. et al. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog: II. The yolk sac. **American Journal of Anatomy**, v. 166, n. 3, p. 313–327, mar. 1983a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001660306>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LEE, S. Y. et al. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog: II. The yolk sac. **The American Journal of Anatomy**, v. 166, n. 3, p. 313–27, 15 mar. 1983b. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1211275>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 102, n. 03, p. 122–134, 15 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1211275>>

LEISER, R. et al. Placental vascular corrosion cast studies: a comparison between ruminants and humans. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 1–2, p. 76–87, 1 jul. 1997. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0029%2819970701/15%2938%3A1%2%3C76%3A%3AAID-JEMT9%3E3.0.CO%3B2-S](http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0029%2819970701%2938%3A1%2%3C76%3A%3AAID-JEMT9%3E3.0.CO%3B2-S)>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LIN, C.-H. et al. *In vivo* performance of decellularized vascular grafts: a review article. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 2101, 19 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/7/2101>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

LIU, Y. et al. An engineered transcription factor which activates VEGF-A enhances recovery after spinal cord injury. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 2, p. 384–393, fev. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996109003040>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MALLIS, P. et al. Recellularization potential of small diameter vascular grafts derived from human umbilical artery. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 30, n. 1, p. 61–71, 24 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/BME-181033>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MCKAVANAGH, P. et al. Management and prevention of saphenous vein graft failure: a review. **Cardiology and Therapy**, v. 6, n. 2, p. 203–223, 26 dez. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40119-017-0094-6>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MEDINA, R. J. et al. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1316–1320, maio 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/sctm.16-0360>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MIGLINO, M. A.; DIDIO, L. J. Vasculature of bovine placentas studied by scanning electron microscopy of corrosion casts. **Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia**, v. 97, n. 1, p. 23–35, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1288445>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MILLER, J. S. et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. **Nature Materials**, v. 11, n. 9, p. 768–774, 1 set. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nmat3357>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MIRENSKY, T. L. et al. Tissue-engineered vascular grafts: does cell seeding matter? **Journal of Pediatric Surgery**, v. 45, n. 6, p. 1299–1305, jun. 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346810002216>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Elastin. **Advances in protein chemistry**, v. 70, p. 437–61, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065323305700139>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

MOSSMAN, H. W.; STRAUSS, F. The fetal membranes of the pocket gopher illustrating an intermediate type of rodent membrane formation. II. From the beginning of the allantois to term. **American Journal of Anatomy**, v. 113, n. 3, p. 447–477, nov. 1963. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aja.1001130307>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NATASHA G , AARON TAN, BUKET GUNDOGAN, YASMIN FARHATNIA, LEILA NAYYER, SARA MAHDIBEIRAGHDAR, JAYAKUMAR RAJADAS, PAOLO DE COPPI, ALUN H DAVIES, A. M. S. Tissue engineering vascular grafts a fortiori: looking back and going forward. **Expert opinion on biological therapy**, v. 15, n. 2, p. 231–44, 27 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2015.980234>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 1, p. 9–22, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872925>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NIKLASON, L. E.; LANGER, R. S. Advances in tissue engineering of blood vessels and other tissues. **Transplant Immunology**, v. 5, n. 4, p. 303–306, dez. 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966327497800135>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NIKLASON, L. E. et al. Functional arteries grown *in vitro*. **Science**, v. 284, n. 5413, p. 489–493, 16 abr. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5413.489>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4–5, p. 300–311, abr. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X11000470>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 28, 18 nov. 2010.

Disponível em: <<https://portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4729>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 767–801, jul. 2004. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00041.2003>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

PASHNEH-TALA, S.; MACNEIL, S.; CLAEYSSSENS, F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 22, n. 1, p. 68–100, fev. 2016b. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2015.0100>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

PATAN, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 50, n. 1–2, p. 1–15, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245270>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

PAWLOWSKI, K. J. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, n. 1–3, p. 1412–21, 1 maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977556>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

RADISIC, M. et al. Medium perfusion enables engineering of compact and contractile cardiac tissue. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 2, p. H507–H516, fev. 2004. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00171.2003>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

REN, X. et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. **Chemical Society reviews**, v. 44, n. 15, p. 5680–742, 7 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26023741>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ROBERTSON, M. J. et al. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e90406, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24587354/>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SANTOS, R. B.; SILVA, J. M.; BELETTI, M. E. Ultrastructure of bovine placenta during all gestational period. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1376–1384, nov. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352017000601376&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SCARRITT, M. E.; PASHOS, N. C.; BUNNELL, B. A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. MAR, p. 43, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00043/abstract>>.

Acesso em: 10 jul. 2020.

SCHMIDT, C. E.; BAIER, J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 22, p. 2215–31, 2000. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961200001484>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SCHNEIDER, K. H. et al. Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 29, n. 5, p. 125–134, jan. 2016. Disponível em:

<[https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1016/S0195-668X\(02\)00633-4](https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1016/S0195-668X(02)00633-4)>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SHIRAKIGAWA, N.; TAKEI, T.; IJIMA, H. Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 740–745, dez. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172313002028>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

STEGEMANN, J. P.; KASZUBA, S. N.; ROWE, S. L. Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 11, p. 2601–13, nov. 2007. Disponível em:

<<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.2007.0196>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. Properties of AdeABC and AdeIJK Efflux Systems of *Acinetobacter baumannii* Compared with Those of the AcrAB-TolC System of *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7250–7257, dez. 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

TSIEN, R. Y. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 509–544, jun. 1998. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

UYGUN, B. E. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. **Nature Medicine**, v. 16, n. 7, p. 814–820, 13 jul. 2010. Disponível em:

<<http://www.doi.org/10.1038/nm.2170>>. Acesso em: 11 dez. 2019.

VERTREES, A. et al. The use of prosthetic grafts in complex military vascular trauma: a limb salvage strategy for patients with severely limited autologous conduit. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 66, n. 4, p. 980–983, abr. 2009. Disponível em:

<<https://insights.ovid.com/crossref?an=00005373-200904000-00003>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

VILLALONA, G. A. et al. Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 16, n. 3, p. 341–50, jun. 2010.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2946885&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 3, p. 957–989, jul. 2009.

Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00041.2008>>.

Acesso em: 10 jul. 2020.

WIJELATH, E. S. et al. Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells. **Journal of Vascular Surgery**, v. 39, n. 3, p. 655–660, mar. 2004. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0741521403015647>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZHANG, W. J. et al. Tissue engineering of blood vessel. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 5, p. 945–957, 2007a. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2007.00099.x>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZHANG, W. J. et al. Tissue engineering of blood vessel. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 5, p. 945–957, set. 2007b. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2007.00099.x>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZHOU, M. et al. Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor. **Artificial Organs**, v. 33, n. 3, p. 230–239, mar. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-1594.2009.00713.x>>. Acesso em: 10 jul. 2020.