

TARLEY SANTOS OLIVEIRA

**Biogel derivado de placenta para bioengenharia de *scaffolds*  
vasculares**

SÃO PAULO

2023

TARLEY SANTOS OLIVEIRA

**Biogel derivado de placenta para bioengenharia de *scaffolds* vasculares**

Tese de doutorado 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 a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento: Cirurgia

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto

SÃO PAULO

2023

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

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

4327  
FMVZ

Oliveira, Tarley Santos  
Biogel derivado de placenta para bioengenharia de *scaffolds* vasculares /  
Tarley Santos Oliveira. – 2023.  
72 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2023.

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. Matriz extracelular descelularizada. 2. Recelularização. 3. Biogel. I. Título.



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 02 de dezembro de 2022  
CEUax N [3354130120](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Rodrigo Da Silva Nunes Barreto

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Rodrigo Da Silva Nunes Barreto - (orientador); Tarley Santos Oliveira - (executante);

Título da proposta: "BIOGEL DERIVADO DE PLACENTA BOVINA PARA BIOIMPRESSÃO DE SCAFFOLDS VASCULARES".

**Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 29/04/2020, **ANALISOU e APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo





Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

São Paulo, 2<sup>nd</sup> December 2022

**CERTIFIED**

We certify that the proposal entitled: "*PLACENTA DERIVED BIOGEL FOR VASCULAR SCAFFOLDS BIOPRINT*", protocol number CEUx 3354130120 (ID 001386), under the responsibility Rodrigo Da Silva Nunes Barreto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 29, 2020.

Certificamos que a proposta intitulada: "*BIOGEL DERIVADO DE PLACENTA BOVINA PARA BIOIMPRESSÃO DE SCAFFOLDS VASCULARES*", protocolado sob o CEUx nº 3354130120, sob a responsabilidade de Rodrigo Da Silva Nunes Barreto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 29 de abril de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

OLIVEIRA, TARLEY SANTOS

Título: Biogel Derivado de Placenta Para Bioengenharia de *Scaffolds* Vasculares

Tese de Doutorado 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.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, **Eni dos Santos Oliveira** e **José Antônio Joaquim de Oliveira**, que são os meus maiores exemplos de cuidado.

## AGRADECIMENTOS

Início os meus agradecimentos às pessoas que me incentivaram durante a vida e também no processo de construção do trabalho. Foram quatro anos de experiência em uma cidade surpreendentemente intensa.

Em ordem cronológica, gostaria de agradecer meus pais, **Eni Oliveira** e **José Antônio Oliveira** que sempre me incentivaram com tudo possível para que eu tivesse o suficiente para permanecer em busca do meu sonho.

À minha irmã, **Taynara Oliveira** que sempre deixava as situações mais leves e me incentivava a buscar o que me deixava mais feliz.

Aos meus avós, **Luiza, Floriano** e **Elisabeth** que sempre me incentivaram a voltar pra casa, o que me remetia a sensação de pertencimento.

Aos meus grandes amigos **Jeanne Novais, José Edgard Novais** e família, por todo suporte educacional durante o ensino fundamental, médio e graduação.

Aos professores do ensino fundamental que me fizeram decidir ser professor: **Víctor Soares** e **Elismara**, que na sexta série do ensino fundamental, davam uma aula espetacular.

Ao meu professor de biologia de iniciação científica Júnior, **Nicolau Santiago Primola**, você me despertou curiosidade pela ciência.

Aos meus professores **Zenon Silva, Roseamely Barros** e **Eduardo Chacur**, amigos e orientadores de Iniciação científica durante a graduação. Foram anos de felicidade e de vários almoços de domingo que eu não conseguia pagar e era convidado. Uma das falas do Zenon que mais me marcaram foi: “nós dois viemos do mesmo lugar”.

Às minhas professoras de graduação, **Nunila Ferreira, Calíope Pilger, Ivania Vera, Luípa Silva, Roselma Lucchese** e **Núbia de Paula**, muito obrigado.

Ao meu orientador de doutorado **Rodrigo Barreto**, que me recebeu em 2018 durante uma jornada de anatomia. Você é muito importante para meu crescimento profissional e acadêmico. Lembro de um dos momentos mais decisivos da minha vida, ter ligado pra você para perguntar o que pensava. Além de ideias científicas que pareciam ficção, a sua tranquilidade deixava a minha ansiedade mais contida. Obrigado pela orientação e por me integrar nessa loucura.

À professora **Ana Claudia Carreira**, obrigado por todo o suporte.

À minha amiga **Kadija Santee** que conheço desde 2014, na época da graduação em Goiás. Nunca poderíamos imaginar onde chegaríamos. Eu tenho orgulho da mulher que eu vi se tornar cientista. Você é um exemplo de ser humano, obrigado por ser minha amiga.

À minha amiga **Marcella Kato**, que foi um suporte emocional e científico pra me manter sorrindo quase sempre que estávamos juntos. É sempre bom conversar com você, para perceber que tinham pessoas no mesmo barco e que ainda se mantinham estáveis. São Paulo me deu uma amiga para a vida toda.

Ao meu amigo **Igor Smirnow**, você é uma pessoa incrível, nesses quatro anos me ensinou muito sobre rotinas de laboratório. Além de toda agitação na reta final, conseguimos superar os obstáculos. Muito obrigado.

Ao meu amigo **Thalles Duarte**, você é um grande amigo, sempre estivemos juntos desde Goiás. Dois perdidos em São Paulo, comprando a comida mais barata possível para o dinheiro da bolsa não acabar, obrigado por todo o suporte e risadas durante esses anos.

À minha amiga **Bruna Pantoja**, que eu tive o prazer de conhecer semanas antes da pandemia. Até hoje me pergunto: como eu não te conheci antes. Gostaria de ter metade da sua eficiência. Você é maravilhosa.

À minha amiga **Letícia Fernandes** que sempre está de bom humor, mesmo se tudo estiver pegando fogo. Você equilibra a felicidade do departamento. Obrigado por deixar tudo mais leve e por me emprestar reagentes.

À minha amiga **Gabriela Inhauser**, que conheci no final da pós e sempre tinha algo bom para contar.

Aos meus maiores exemplos de enfermeiros, **Luciano Leonel** e **Neilene Teixeira**, muito obrigado, vocês são muito importantes pra mim.

Ao **Brayhan Caetano**, que sempre esteve me ajudando emocionalmente durante a realização deste trabalho. Muito obrigado.

Aos técnicos de laboratório **Ronaldo Agostinho** e **Rose Eli Grassi** e **Rosana Aparecida**, obrigado por todo suporte técnico e imagens.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento do projeto. Número do processo: 88887.464799/2019-00

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento do projeto. Processo número 2014/50844-3.

*“People help the people  
And if you're homesick,  
Give me your hand and I'll hold it  
People help the people  
Nothing will drag you down  
Oh, and if I had a brain  
Oh, and if I had a brain  
I'd be cold as a stone and rich as the fool  
That turned all those good hearts away”*

**People help the people - Birdy**

## RESUMO

OLIVEIRA, T.S. **Biogel derivado de placenta para bioengenharia de *scaffolds* vasculares**. 2023, 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Doenças vasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade a nível nacional e mundial, implicando na necessidade de implantes vasculares. Sendo assim, a produção de biomateriais vasculares por recelularização ou cultivo em biogel tem se mostrado alternativas promissoras às terapias empregadas em estudos relacionados à fisiologia vascular. O presente trabalho tem como objetivo produzir biogel e protótipos de vasos sanguíneos a partir da matriz extracelular de placenta bovina descelularizada. Para tanto, foram utilizados vasos da superfície corioalantoide da placenta bovina para a produção de *scaffolds* descelularizados, processo previamente estabelecido por nosso grupo. Logo após os fragmentos de vasos foram recelularizados com células caninas precursoras endoteliais (SV) ou com células caninas precursoras endoteliais com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF), em concentração de  $1,5 \times 10^4$ . Em segundo momento a recelularização das células SVVEGF também foram testadas em concentração de  $1 \times 10^5$ /ml, pela técnica de injeção no lúmen dos *scaffolds*. Os vasos sanguíneos de placenta, também passaram por um processo de digestão da sua matriz extracelular tendo como produto um biogel. Para aumento da sua viscosidade foi utilizado alginato 10%. Na avaliação da compatibilidade do biogel,  $3 \times 10^5$  células SVVEGF foram semeadas em cada placa. Após o período de maturação celular, os biomateriais descelularizados ou cultivados em biogel foram avaliados por histologia básica, microscopia eletrônica de varredura e confocal. Foi possível observar que os *scaffolds* naturais mantiveram re-endotelização satisfatória por células SVVEGF. O biogel permitiu manutenção de características estruturais importantes além da viabilidade celular, podendo ser uma alternativa para cultivo ou até mesmo para procedimentos como bioimpressão.

Palavras-chave: matriz extracelular descelularizada; recelularização; biogel

## ABSTRACT

OLIVEIRA, T.S. **Placenta derived biogel for bioengineering vascular scaffolds.** 2023, 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

Vascular diseases are the main causes of morbidity and mortality nationally and worldwide, implying the need for vascular implants. Thus, the production of vascular biomaterials by recellularization or cultivation in biogel has shown to be promising alternatives to therapies used in studies related to vascular physiology. The present work aims to produce biogel and prototypes of blood vessels from the extracellular matrix of decellularized bovine placenta. For this purpose, vessels from the chorioallantoic surface of the bovine placenta were used to produce decellularized scaffolds, a process previously established by our group. Soon after, the vessel fragments were recellularized with canine endothelial precursor cells (SV) or with canine endothelial precursor cells with overexpression of vascular endothelial growth factor (SVVEGF), at a concentration of  $1.5 \times 10^4$ . Secondly, the recellularization of SVVEGF cells was also tested at a concentration of  $1 \times 10^5$ /ml, using the technique of injection into the lumen of the scaffolds. The placental blood vessels also underwent a process of digestion of their extracellular matrix, resulting in a biogel. To increase its viscosity, 10% alginate was used. In evaluating biogel compatibility,  $3 \times 10^5$  SVVEGF cells were seeded on each plate. After the cell maturation period, the decellularized or biogel-cultured biomaterials were evaluated by basic histology, scanning electron and confocal microscopy. It was possible to observe that the natural scaffolds maintained satisfactory re-endothelialization by SVVEGF cells. The biogel allowed the maintenance of important structural characteristics in addition to cell viability, and could be an alternative for cultivation or even for procedures such as bioprinting.

Keywords: decellularized extracellular matrix; recellularization; bioink



## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

3D - Tridimensional

Cm - Centímetros

CO<sub>2</sub> - Dióxido de Carbono

*DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol*

DCNT - Doenças Crônicas Não Transmissíveis

eGFP - *Enhanced green fluorescent protein*

*gDNA - Genomic deoxyribonucleic acid*

*H&E - Hematoxylin and Eosin*

HUVECs - células endoteliais de veia de cordão umbilical humanas

MEC - Matriz extracelular

mm – milímetros

mg – miligramas

*NCDs - Non-communicable diseases*

*PFA - Paraformaldehyde*

*PBS - Phosphate buffer solution*

*SDS - Sodium dodecyl sulfate*

SNT - Sistema Nacional de Transplantes

SV - Células de saco vitelino

SVVEGF - Células de saco vitelino com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular

*UV - Ultraviolet*

*VEGF – Vascular endothelial growth factor*

*α-MEM - alpha minimum essential medium*

μm – Micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelos placentários de interface materno-fetal. ....	23
Figura 2: Esquema de vascularização da placenta bovina. ....	25
Figura 3: As túnicas da parede arterial.....	28
Figura 4: Processo de recelularização do scaffold da placenta de cão. ....	30
Figura 5: Decellularization of the bovine placenta vessels.....	44
Figura 6: Analysis of decellularized and recellularized bovine placental vessel....	45
Figura 7: Desenho experimental do artigo II .....	48
Figura 8: Anatomia vascular de placenta descelularizada e variedade de calibres. .....	50
Figura 9: Processo esterilização e injeção de células nos scaffolds vasculares...	51
Figura 10: produção do biogel.....	53
Figura 11: Avaliação da recelularização dos scaffolds vasculares .....	55
Figura 12: Avaliação da recelularização do biogel .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Visão geral sobre bioimpressão 3D e biogéis derivados de MEC descelularizada.....	31
Tabela 2: Modelos animais comumente utilizados em estudos in vivo para doenças cardiovasculares.....	32

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1.	BIOENGENHARIA DE TECIDOS .....	18
2.2.	DESCELULARIZAÇÃO E RECELULARIZAÇÃO .....	19
2.3.	SCAFFOLDS, BIOMATERIAL, BIOGEL E BIOTINTA.....	19
2.4.	IMPORTÂNCIA DAS BIOTINTAS NA BIOIMPRESSÃO .....	21
2.5.	PLACENTA COMO BIOMATERIAL .....	22
2.5.1.	VASCULARIZAÇÃO DA PLACENTA BOVINA .....	23
2.5.2.	COMPOSIÇÃO DOS VASOS DA PLACENTA BOVINA DESCELULARIZADA .....	26
2.6.	VASOS SANGUÍNEOS .....	27
2.7.	CÉLULAS DE SACO VITELINO (SV) CANINO COM SUPEREXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (SVVEGF) .....	29
2.8.	MODELOS ANIMAIS EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	30
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO II (ARTIGO I) - DECELLULARIZED VASCULAR SCAFFOLDS DERIVED FROM BOVINE PLACENTA BLOOD VESSELS</b> .....	<b>35</b>
6.1.	INTRODUCTION .....	37
6.2.	MATERIALS AND METHODS .....	38
<b>6.2.1.</b>	<b>Sample and cells</b> .....	<b>38</b>
<b>6.2.2.</b>	<b>Decellularization protocol</b> .....	<b>38</b>
<b>6.2.3.</b>	<b>Decellularization validation</b> .....	<b>39</b>
<b>6.2.4.</b>	<b>Recellularization assay</b> .....	<b>39</b>
<b>6.2.5.</b>	<b>Recellularization validation</b> .....	<b>39</b>
6.3.	RESULTS .....	40

6.4.	DISCUSSION .....	40
6.5.	CONCLUSION.....	41
6.6.	ACKNOWLEDGEMENTS.....	41
	REFERENCES .....	42
7.	<b>CAPÍTULO III (ARTIGO II) – AVALIAÇÃO DA BIOCMPATIBILIDADE DE BIOGEL E SCAFFOLDS DERIVADOS DE VASOS SANGUÍNEOS DE PLACENTA .....</b>	<b>46</b>
7.1.	INTRODUÇÃO.....	47
7.2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
7.2.1.	<b>Desenho experimental .....</b>	<b>48</b>
7.2.2.	<b>Coleta de materiais.....</b>	<b>49</b>
7.2.3.	<b>Recelularização dos <i>scaffolds</i> vasculares.....</b>	<b>49</b>
7.2.4.	<b>Avaliação da recelularização dos <i>scaffolds</i> vasculares .....</b>	<b>51</b>
7.2.5.	<b>Produção do biogel .....</b>	<b>52</b>
7.2.6.	<b>Recelularização do biogel.....</b>	<b>52</b>
7.2.7.	<b>Avaliação da recelularização do biogel.....</b>	<b>53</b>
7.3.	RESULTADOS .....	54
7.3.1.	<b>Avaliação da recelularização dos <i>scaffolds</i> vasculares .....</b>	<b>54</b>
7.3.2.	<b>Avaliação da recelularização do biogel.....</b>	<b>54</b>
7.4.	DISCUSSÃO.....	57
7.5.	CONCLUSÃO .....	60
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO A – Carta de aceite do artigo I .....</b>	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) é notável frente ao cenário de globalização e urbanização mundial. Principalmente devido ao sedentarismo, alimentação altamente calórica, consumo de álcool e tabaco. Dentre as DCNT, as que se relacionam com o aparelho circulatório são as principais causadoras de morbimortalidade a nível nacional e mundial (BRASIL, 2011; LAM et al., 2021; MALTA; SILVA JR, 2013; WHO, 2011)

A necessidade de vasos viáveis é evidente na prática da cirurgia vascular, que comumente utilizam técnicas de dissecação de um vaso periférico autólogo para a revascularização do sítio afetado. É comum que ocorram complicações infecciosas, necrose e deiscência no local da retirada do vaso no indivíduo (DEUS, 2015; IMADA; CHEN, 2022). Em alguns casos também ocorre a colocação de um estente no vaso lesionado, sendo suas possíveis complicações, as fraturas e a hiperplasia intimal (FRANÇA; PEREIRA, 2008; IMADA; CHEN, 2022).

De acordo com o Sistema Nacional de Transplantes (SNT), 38.925 pessoas esperam por um transplante no Brasil (BRASIL, 2023). Nesse sentido, avanços significativos têm sido realizados pela bioengenharia na produção de novos órgãos funcionais ou funcionalizados (OLIVEIRA et al., 2018; SOLIS; CZEKANSKI, 2022). A fabricação de vasos sanguíneos é uma prática emergente, visto que uma vascularização funcional é imprescindível na produção de um órgão com espessura maior do que 0,2 mm.

Até o momento já foram produzidos vasos em pequena escala em experimentos pontuais e a sua maioria é formada a partir de derivados de polímeros sintéticos rígidos (KOLESKY et al., 2016; MOORE et al., 2021; OH et al., 2019; SOLIS; CZEKANSKI, 2022). Neste sentido, ainda não foi produzido um vaso natural que mantenha sua função estrutural e celular por longos períodos (NOVOSEL; KLEINHANS; KLUGER, 2011b).

Assim, o desenvolvimento de biomateriais vasculares por bioengenharia, se mostra como alternativa promissora no auxílio às terapêuticas empregadas em doenças e estudos relacionados à fisiologia vascular (BERTANHA, 2016; LI; CUI, 2021; OLIVEIRA et al., 2017).

## 2. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. BIOENGENHARIA DE TECIDOS

Fisiologicamente a morte e a proliferação celular se mantem em homeostase, no entanto órgãos lesados podem perder esse equilíbrio e como consequência alterar sua funcionalidade. Para sua a refuncionalização, a medicina regenerativa lança mão de várias ferramentas, dentre elas a bioengenharia de tecidos, com objetivo de buscar alternativas de potencializar e controlar a regeneração de órgãos com o mínimo de efeitos adversos (CHEN et al., 2022; DOHMANN et al., 2007; MAO et al., 2006). Três fatores que devem ser levados em consideração na bioengenharia de tecidos são: o conteúdo celular; as características da estrutura para sustentação; e os fatores de crescimento/diferenciação presentes (BOROJEVIC, 2008; CHEN et al., 2022).

Células embrionárias ou pluripotentes induzidas podem ser utilizadas na engenharia tecidual, pelo seu potencial de se diferenciar em praticamente qualquer célula adulta, entretanto a sua obtenção implica em confrontos éticos, pois são originadas de embriões ou de engenharia gênica, respectivamente (ALISON et al., 2002; PERA; TROUNSON, 2004). Também existe a possibilidade de utilização das células tronco mesenquimais adultas, que possuem benefícios de não rejeição e podem ser obtidas em medula óssea (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006), tecido adiposo (MARX; SILVEIRA; BEYER NARDI, 2015), placenta, cordão umbilical (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007; SHAKER; RUBIN, 2010). Porém essas células possuem capacidade de diferenciação reduzidas, restringindo às linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas (PAROLINI et al., 2008).

Em outros casos, são utilizadas células diferenciadas obtidas por cultivo primário, e com mesma origem ao órgão a ser reconstruído. Independente da fonte celular, seja cultura celular primária ou na diferenciação a partir de células tronco, é necessário definir o melhor biomaterial a ser aplicado e que seja citocompatível. Além da sustentação, o biomaterial, tem a função de integração com o organismo receptor, devendo ser estruturalmente semelhante ao local de implantação. Entretanto alguns tratamentos o biomaterial pode ser aplicado isoladamente para ser repopulado naturalmente pelas próprias células do paciente (BOROJEVIC, 2008; DERUBEIS; CANCEDDA, 2004; IKADA, 2006).

## 2.2. DESCELULARIZAÇÃO E RECELULARIZAÇÃO

Dentro da engenharia de tecidos as técnicas de descclularização e recelularização são novas perspectivas para produção de órgãos ou de biomateriais funcionalizados (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; ZHANG et al., 2022).

A descclularização é a remoção das células de um tecido ou órgão por processos químicos, enzimáticos ou físicos, produzindo materiais biológicos com manutenção da composição e a estrutura da matriz extracelular (MEC) do tecido nativo (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006). Esse processo deve ser realizado com cautela, pela possibilidade de ruptura indesejada da MEC e pela necessidade da remoção do conteúdo celular (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Após a descclularização do órgão, para que adquira a funcionalidade desejada, pode ser realizada a recelularização. Ela consiste na repopulação celular do biomaterial descclularizado, visando tornar o novo órgão funcional ou funcionalizado. Para rearranjo e maturação celular podem ser aplicados fatores de crescimento, proteínas estruturais ou qualquer que seja o objetivo almejado para o tecido final (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011).

Os estudos mais recentes apontam que os enxertos vasculares produzidos por descclularização e recelularização demonstram resultados encorajadores, já que a curto e longo prazo esses vasos serão alternativos aos implantes. Alguns enxertos apresentaram adesão celular tecido específica, ou seja, células endoteliais no lúmen e células musculares na túnica média, inclusive com biossíntese de fibras colágenas (LIN et al., 2019; OLAUSSON et al., 2014). Por outro lado, implantes vasculares alogênicos, produzidos por bioengenharia, apresentaram eventos trombolíticos, instabilidade e permeabilidade desfavorável (WYSTRYCHOWSKI et al., 2014).

## 2.3. SCAFFOLDS, BIOMATERIAL, BIOGEL E BIOTINTA

Os *scaffolds* (ou arcabouços) são estruturas tridimensionais com a finalidade de proporcionar sustentação, adesão, distinção e propagação celular. Por serem



essencialmente estruturais, devem obedecer a alguns requisitos mecânicos, como o acabamento adequado, facilitar a adesão celular e a facilidade de esterilização sem que haja destruição da sua estrutura (O'BRIEN, 2011; WEISSENBRUCH et al., 2022). Ademais, devem possibilitar a correta troca de gases e nutrientes, devem ser biocompatíveis, não apresentar toxicidade nem alergenicidade, além de poderem possuir fatores de crescimento. Quando biodegradáveis, não deve produzir substratos tóxicos na reação de degradação; e a taxa de degradação deve ser controlável, onde se ajusta sua deterioração de acordo com a regeneração do tecido (IKADA, 2006; O'BRIEN, 2011).

Portanto, um órgão descelularizado pode ser classificado como um *scaffold*, sendo apenas considerado um biomaterial quando este for testado e confirmada sua biocompatibilidade, preservação estrutural e não alergenicidade. De modo geral, entende-se que o biomaterial é uma substância/material estruturalmente natural ou projetado, puro ou associado a outros elementos. Com fundamento de ser utilizado para interações com os sistemas vivos *in vitro* e/ou *in vivo*, assim, podendo ser empregado na medicina humana ou veterinária em procedimentos terapêuticos ou diagnósticos (GROLL et al., 2019; IKADA, 2006; INSUASTI-CRUZ et al., 2022; WILLIAMS, 2009). Os biomateriais podem ainda ser classificados em não-integráveis, que são aqueles que sustentam ou preenchem estruturas corpóreas; ou integráveis, que se incorporam ou são absorvidos pelo receptor (VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2005).

Um biomaterial normalmente tem estrutura sólida, porém quando adquire uma consistência mais gelificada é classificado como biogel. Este biogel pode ser utilizado para uso tópico, associado ou não à cultura celular. Ainda, quando esse biogel adquire uma consistência mais liquefeita, é classificado como hidrogel (GROLL et al., 2019; LUO; ZHANG; LIN, 2022; METHACRYLATED et al., 2022; PATI et al., 2014a).

A partir do momento em que o biomaterial, seja ele biogel ou qualquer outro componente bioativo, recebe um conteúdo de células viáveis ele é caracterizado como biotinta. A biotinta está diretamente ligada às principais tecnologias de biofabricação presentes no mercado, como exemplo podemos citar a bioimpressão 3D (GROLL et al., 2019; MAAN; MASRI; WILLERTH, 2022).

## 2.4. IMPORTÂNCIA DAS BIOTINTAS NA BIOIMPRESSÃO

A bioimpressão consiste na técnica utilizada para imprimir estruturas utilizando uma tinta de origem biológica, associando conhecimentos de robótica, tecnologia da informação e ciências biológicas (GUILLEMOT; MIRONOV; NAKAMURA, 2010; OLIVEIRA et al., 2017; XIANG et al., 2022).

Existem formas diferenciadas de impressão conforme a impressora utilizada. Elas podem ser no formato jato contínuo, em que o biogel é depositado de modo ininterrupto. Ou também no formato gota a gota, no qual a deposição é como gota, esse formato inclusive é o mais adequado por proporcionar menos injúria celular (IRVINE; VENKATRAMAN, 2016). Outra modalidade de bioimpressão que pode ser citada é a impressão por extrusão, que constrói estruturas em tempo real, bem organizadas e nesse caso utiliza uma linha ininterrupta de biotinta (IRVINE; VENKATRAMAN, 2016; TONG et al., 2012). Na impressão a laser, ocorre basicamente a vaporização da superfície da estrutura que receberá a biotinta, assim, impulsiona as células que estão no cartucho de impressão para a superfície desejada. Esse último método possui vantagens como diminuição do atrito com as células durante a impressão, possibilidade de utilização de materiais mais viscosos e a não obstrução do canhão da impressora (TONG et al., 2012).

Inúmeros estudos podem ser elencados na área da bioimpressão, como os que abordam a construção de tecidos cardíacos (LEE et al., 2020; LIU et al., 2022; YADID et al., 2021), cutâneos (MIGUEL et al., 2019), cartilagosos (GROGAN et al., 2019), produção de hidrogel ideal para a bioimpressão (CHEN et al., 2019; LIU et al., 2019; SPENCER et al., 2019) e incontáveis outras temáticas.

Alguns avanços na produção vascular e transplante *in-vivo* já são realidade, nos quais os lumens vasculares foram preenchidos completamente por células endoteliais. Em relação aos *scaffolds* bioimpressos a trama vascular apresentou anastomoses e junções celulares fortes. Ao final foi observada uma perfusão sanguínea que interagiu entre a rede vascular impressa e a rede vascular nativa do implantado (DEBBI et al., 2022).

Kolesky et al, (KOLESKY et al., 2016) conseguiram produzir por bioimpressão 3D um tecido vascularizado *in vitro* que ultrapassava 1 cm de espessura, o tecido sobreviveu por mais de 6 semanas sem alterações de sua funcionalidade até a interrupção do experimento para análise do órgão. Outro

experimento trabalhou com a bioimpressão com policaprolactona associado a miócitos derivados de aorta humana e células endoteliais derivadas de veia umbilical humana. As células apresentaram a proliferação desejável e permaneceram funcionais, sendo um estudo preliminar que mostra a possibilidade de produção de corpos com lúmen (OH et al., 2019).

A tecnologia de bioimpressão 3D utilizando biotintas derivadas de órgãos descelularizados é promissora para a produção de órgãos com células de diferentes origens. De modo geral, é evidente a necessidade de estudos que trabalhem as propriedades reológicas, velocidade de impressão, dentre outras questões mecânicas desta biotinta (MAAN; MASRI; WILLERTH, 2022). Para tanto, Kabirian e Mozafari (KABIRIAN; MOZAFARI, 2019) reuniram alguns estudos relevantes para a área, e elencam informações como as técnicas utilizadas com maior frequência, origens de órgãos descelularizados utilizados na biotinta e a finalidade principal do experimento, esses dados foram sumarizados na Tabela 1 ao final deste capítulo.

## 2.5. PLACENTA COMO BIOMATERIAL

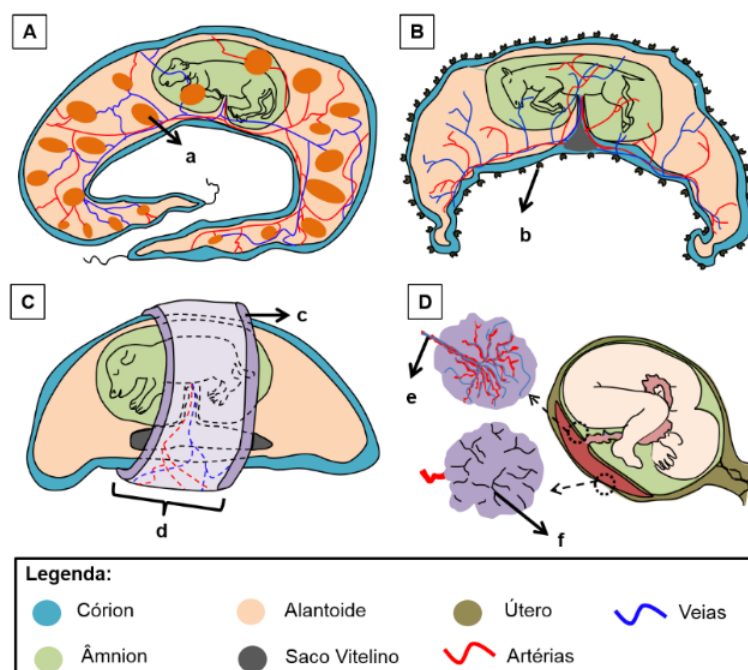
A placenta é um órgão transitório que realiza a comunicação da mãe com o feto, possui funcionalidades básicas de oferta de nutrientes, trocas de gases e do controle hormonal na gestação (FACCIOTTI, 2009; SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000). A interface materno-fetal pode variar de acordo com a espécie (FIGURA 1), nas quais podem ser classificadas em discoidal, cotiledonária, difusa e zonária (LEISER; KAUFMANN, 2009).

A placenta difusa possui comunicação com todo endométrio, como acontecem em equinos, suínos e golfinhos. A placenta cotiledonária apresenta pontos delimitados de comunicação com a parede uterina, como ocorre em ruminantes. A placenta zonária possui formato de faixa que circunda o feto e permite contato com o endométrio, predominante em carnívoros. Por último a placenta discoidal, que tem formato de disco e é encontrada em humanos, roedores e outros (LEISER; KAUFMANN, 2009).

Nesse sentido, a placenta bovina é uma fonte potencial de biomaterial para a bioengenharia de tecidos, principalmente à produção de enxertos vasculares. Isso é possível devido a rica matriz extracelular, vascularização bem desenvolvida e

disponibilidade de coleta do órgão. Ela possui a capacidade de ser perfundida por agentes descelularizantes e apresentam a característica de facilmente desenvolver anastomoses com o órgão receptor (BARRETO et al., 2018; HOPPER; WOODHOUSE; SEMPLE, 2003; KAKABADZE et al., 2014; KAKABADZE; KAKABADZE, 2015).

Figura 1: Modelos placentários de interface materno-fetal.



Fonte: (LEONEL, 2016).

Legenda: A –Placenta cotiledonária da espécie bovina e outros ruminantes; B–placenta difusa encontrada nas espécies equina e suína; C–placenta zonária de carnívoros; D–placenta discoidal da mulher com visão da parte fetal (superior à esquerda) e do cordão umbilical e outra da parte materna (inferior à esquerda) contrastando os sulcos cotiledonários; a–cotilédones; b–microcotilédones; c–hematoma marginal; d–placenta zonária da cadela; e–cordão umbilical; f–sulcos cotiledonários.

### 2.5.1. VASCULARIZAÇÃO DA PLACENTA BOVINA

Em análise macroscópica a placenta bovina é composta pelos cotilédones fetais, que se assemelham às pequenas esferas difusas e achatadas. Eles se conectam às carúnculas, que por sua vez fazem parte do endométrio uterino (FACCIOTTI, 2009; SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

Os vasos da superfície corioalantóide fazem a ligação entre a placenta e o feto (Figura 2). Eles podem ser divididos em quatro vasos sanguíneos maiores e

por um ducto alantóide envoltos por gelatina de Wharton e mais externamente pelo epitélio amniótico. Os vasos sanguíneos são fundamentalmente duas veias e duas artérias, que variam de comprimento em relação à idade gestacional do feto. Uma característica que distingue a anatomia desses vasos são principalmente a espessura da camada muscular, que é bem desenvolvida tanto na artéria quanto na veia (RIBEIRO; MIGLINO; DIDIO, 1997; STURION et al., 2013).

As artérias umbilicais têm origem nas artérias ilíacas do feto, passam pelo anel umbilical e seguem até a placenta. Cada uma delas segue para um dos polos placentários e emitem ramos por toda a superfície corioalantóide. Todo cotilédone recebe um desses ramos, que mais à frente se divide em arteríolas. Essa última emite diversos capilares, e esses por sua vez chegam até as vilosidades terminais propriamente ditas (BARRETO et al., 2019). Os capilares em seu início são bem organizados e ao passo que se aproximam dos sinusóides as redes anastomosadas promovem uma diminuição desse padrão (BARRETO et al., 2019). Todo esse arcabouço descrito tem a finalidade de levar sangue pouco oxigenado e pobre em nutrientes para a placenta (RIBEIRO; MIGLINO; DIDIO, 1997; STURION et al., 2013).

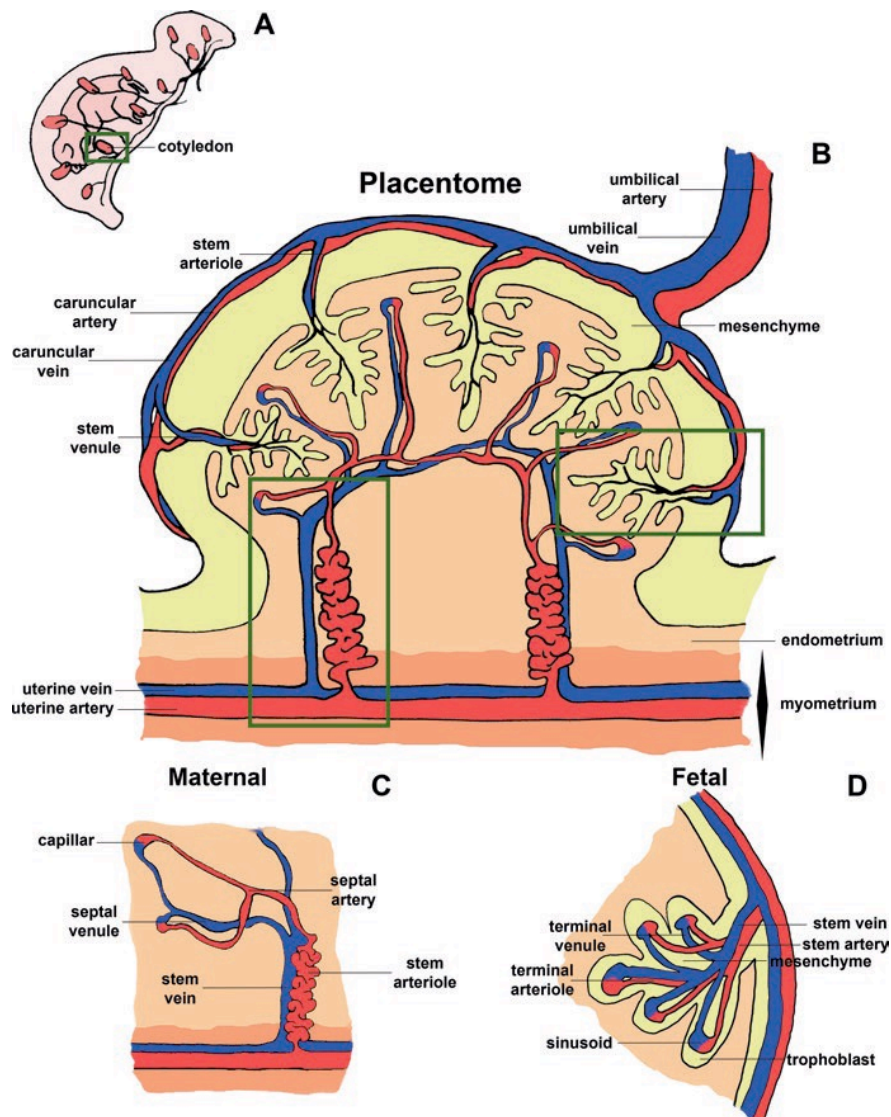
Entre as duas artérias é comum o aparecimento de uma anastomose que aparece antes que cada uma delas se separe para polos, ou na região intermediária entre o feto e a placenta. Em alguns casos a própria anastomose pode emitir ramos funiculares para placenta, que variam em comprimento e em número (RIBEIRO; MIGLINO; DIDIO, 1997; STURION et al., 2013).

As veias umbilicais são localizadas periféricamente em relação às artérias. Elas têm origem nas vilosidades terminais (sinusóides), na qual as vênulas promovem a drenagem e mais a frente se fundem e formam duas veias umbilicais provenientes de cada polo placentário. Os dois vasos a partir daí, seguem paralelos até no anel umbilical, onde se fundem e levam o sangue rico em oxigênio e minerais para o fígado fetal (BARRETO et al., 2019).

A gelatina de Wharton é um mucopolissacarídeo com a função estrutural e protetora do funículo umbilical. O ducto alantóide por sua vez está localizado medianamente no funículo umbilical e possui a função de coletar a urina produzida pelo feto durante a gestação (RIBEIRO; MIGLINO; DIDIO, 1997). Além destas estruturas, são evidentes inúmeros pequenos vasos, que são responsáveis pelo

suprimento sanguíneo dos próprios vasos existentes no funículo, assim, denominados de *vasa vasorum* (STURION et al., 2013).

Figura 2: Esquema de vascularização da placenta bovina.



Fonte: (BARRETO et al., 2019).

Legenda: Em (a), feto bovino e placenta. Em B), quadro de (a), mostrando camadas e vascularização materna e fetal dentro do placentônio. Em (c), área quadrada de (b), mostrando microvascularização materna (ou caruncular). Em (d), em quadro de (b), mostrando microvascularização fetal (ou cotiledonária).

Em análise histológica, os grandes vasos da superfície corioalantóide apresentam basicamente três camadas principais, uma túnica interna endotelial pregueada, uma túnica média muscular e espessa em relação às outras e uma túnica adventícia predominantemente colágena organizada em um tecido

conjuntivo frouxo (CAJERO-JUÁREZ et al., 2002; RIBEIRO; MIGLINO, 1997).

As artérias umbilicais possuem menor quantidade de fibras reticulares em sua parede vascular e fibras colágenas menos concentradas em relação à veia. Nesse caso foi mais evidente o colágeno do tipo I e III, também foram encontrados nas pregas endoteliais e as fibras elásticas finas foram encontradas em quantidade semelhante à veia, por toda a parede arterial (RIBEIRO; MIGLINO, 1997).

As veias umbilicais possuem em sua composição fibras reticulares em toda a parede vascular e fibras colágenas em grande quantidade na túnica externa, que por sua vez se direcionavam parcialmente até a túnica média. Colágeno do tipo I e II também foram encontrados nas pregas endoteliais, além de fibras elásticas finas em pequena quantidade por toda a parede venosa (CAJERO-JUÁREZ et al., 2002; RIBEIRO; MIGLINO, 1997).

#### 2.5.2. COMPOSIÇÃO DOS VASOS DA PLACENTA BOVINA DESCELULARIZADA

A placenta bovina após a descclularização mantém a MEC dos vasos sanguíneos da superfície corioalantoide relativamente preservada. O *scaffold* permanece com estrutura circular e permite a manutenção das fibras colágenas e proteoglicanos. O colágeno apresentou ligeira diminuição em relação às fibras espessas e praticamente ausência das fibras colágenas finas, se mostrando mais preservado na parede e epitélio dos vasos, em maior quantidade do que no restante do mesênquima (BARRETO et al., 2018).

A organização das fibras colágenas após a descclularização também apresentou alteração na avaliação histológica. Mesmo permanecendo organizadas em camadas, a estrutura demonstrou maior espaçamento entre elas. Em relação aos tipos, tanto o I quanto o III foram encontrados na mesma localização do controle, porém, em menor intensidade. O colágeno IV foi localizado em pequena quantidade na parede dos vasos, tanto em controle quanto em MEC descclularizada (BARRETO et al., 2018).

Ademais, a parede dos grandes vasos descclularizados de placenta bovina também apresentaram fibronectina e laminina preservadas (BARRETO et al., 2018). Além da manutenção de proteínas relacionadas ao modelamento de vasos sanguíneos (BARRETO et al., 2022).

## 2.6. VASOS SANGUÍNEOS

Os vasos sanguíneos são diferenciados em arteriais e venosos, e de acordo com o seu diâmetro, sendo o sistema arterial interconectado ao venoso por um meio do sistema capilar. Portanto, artérias se ramificam a arteríolas, se conectam ao sistema capilar, se confluem em vênulas, que por fim se confluem em veias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Além da diferença de diâmetro, os diferentes vasos sanguíneos diferem na constituição da sua parede, entretanto possuem em comum o revestimento do seu lúmen por células endoteliais (DYCE; WENSING; W, 2010; KONIG; LIEBICH, 2016) (FIGURA 3).

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

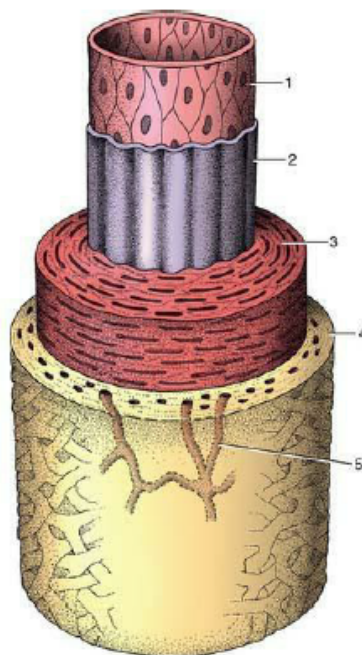
- ✓ túnica íntima: envolve a luz do vaso e é constituída por células endoteliais apoiadas sobre membrana basal e camada subendotelial constituída de lâmina elástica interna (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013);
- ✓ túnica média: constituída de células musculares lisas entremeadas por matriz extracelular rica em fibras de colágeno tipo III e IV, e proteoglicanos; é espessa em artérias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 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. Sendo a elastina uma proteína fibrosa que constitui a matriz extracelular vascular, esta confere a propriedade de elasticidade aos tecidos (DAAMEN et al., 2007; MITHIEUX; WEISS, 2005).

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. As veias também possuem proeminências na sua túnica íntima formando duas ou três válvulas cúspides em um fluxo unidirecional, com o objetivo de impedir refluxo sanguíneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Dentre as artérias pode existir



variabilidade estrutural, onde há maior quantidade de fibras elásticas na parede de grandes artérias como a Aorta e o tronco pulmonar, para suportar maior pressão sistólica (DYCE; WENSING; W, 2010).

Figura 3: As túnicas da parede arterial



Fonte:(DYCE; WENSING; W, 2010).

Legenda: 1, 2, túnica íntima (1, endotélio; 2, membrana elástica interna); 3, túnica média; 4, túnica adventícia; 5, vasa vasorum.

Na túnica adventícia de grandes vasos, estão presentes o *vasa vasorum*, que são vasos de menor calibre (arteríolas, capilares e vênulas) responsáveis pela nutrição da parede deste grande vaso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 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; SCARRITT et al., 2015; WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

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; WAGENSEIL; MECHAM, 2009; ZHANG et al., 2007).

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 (WAGENSEIL; MECHAM, 2009; ZHANG et al., 2007).

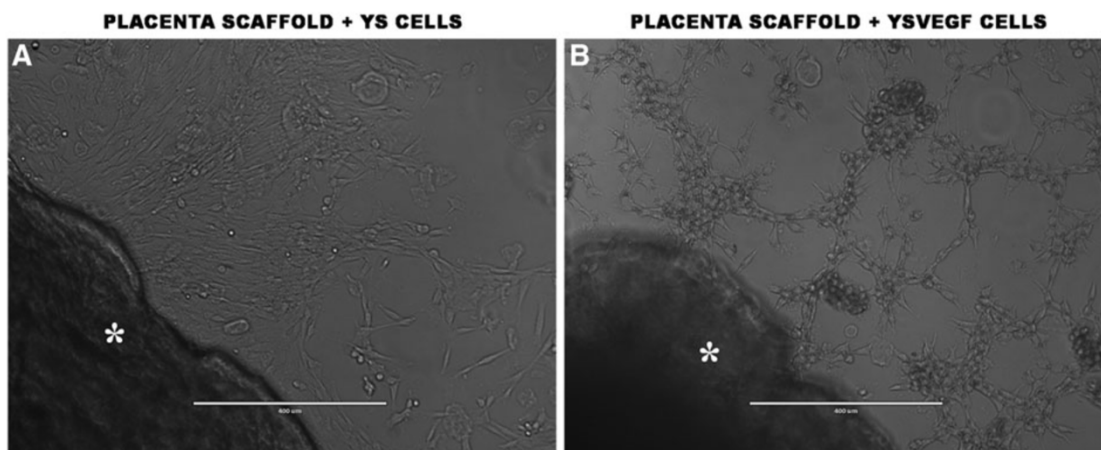
Na túnica adventícia, fibroblastos estão envolvidos na manutenção do tecido conjuntivo frouxo com a produção de colágeno. Tal conteúdo ajuda a prevenir a ruptura dos vasos (WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

## 2.7. CÉLULAS DE SACO VITELINO (SV) CANINO COM SUPEREXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (SVVEGF)

As células de saco vitelino com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF) foram utilizadas inicialmente por Fratini (FRATINI et al., 2016). Em sua composição, as células de saco vitelino (SV) de cão foram transduzidas para superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fazendo com que se comportassem como células progenitoras endoteliais e pluripotentes. As células SVVEGF também apresentaram maior taxa de crescimento em comparação com as células SV não tratadas. Nesse sentido, SVVEGF se tornam uma fonte possível e viável de células quando se busca a neovascularização (FRATINI et al., 2016).

A recelularização de *scaffolds* a partir de células SVVEGF foi testada por Fratini (FRATINI et al., 2018). Foi realizado cocultivo de placenta de cão descelularizada com as células SVVEGF, ao final, formaram estruturas similares a brotos vasculares, além de se organizarem em forma de cordão (Figura 4 B). O aumento da taxa de proliferação celular também influenciou na superexpressão de fibronectina. Nesse sentido, ocorreu adesão das células SVVEGF à placenta de cão, também construindo um biomaterial com capacidade de utilização em estudos de vasos sanguíneos (FRATINI et al., 2018).

Figura 4: Processo de recelularização do scaffold da placenta de cão.



Fonte: (FRATINI et al., 2018).

Legenda: Em **(A)**, células SV caninas na placa não aderente na presença de scaffold (asterisco). Observe a morfologia fibroblásticoide das células. Em **(B)**, células SV transduzidas com VEGF (SVVEGF) na presença de *scaffold* (asterisco), há uma mudança marcante na morfologia celular, com formação de pequenas colônias estruturadas e brotamentos. VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; SV, saco vitelino.

Tendo em vista que um dos objetivos desse trabalho é a recelularização de vasos da placenta bovina, as células SVVEGF foram selecionadas. Nesse sentido, permite a investigação da interação celular com a MEC descelularizada, proporcionando uma interação xenogênica (vasos de placenta bovina descelularizada e célula SVVEGF de cão).

## 2.8. MODELOS ANIMAIS EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Os modelos animais para estudo das doenças cardiovasculares são a base para o avanço inicial de testes *in vivo* (Tabela 2). No entanto, a escolha do animal deve ser bem caracterizada, já que deve possuir características anatômicas e fisiológicas com o organismo alvo. É importante ressaltar que muitas limitações de estudo vão ser encontradas, independente do animal, já que a tentativa é de reproduzir de forma similar, não excluindo as particularidades e alterações de resultados (ZARAGOZA et al., 2011).

Tabela 1: Visão geral sobre bioimpressão 3D e biogéis derivados de MEC descelularizada

<b>Técnica de impressão</b>	<b>Origem do biogel/biotinta</b>	<b>Finalidade principal</b>
	MEC descelularizada de músculo esquelético suíno	Desenvolvimento de músculo esquelético funcional e também como uma carne potencial de alimentação
	MEC descelularizada de coração suíno	Regeneração de tecido isquêmico
	MEC descelularizada de fígado suíno	Engenharia de tecido hepático
Extrusão pneumática	MEC descelularizada de tecido cardíaco, adiposo e cartilaginoso humano	Modelos de testagem <i>in vitro</i> de fisiologia e patologia humana
	MEC descelularizada de vaso sanguíneo suíno	Vasos sanguíneos
	MEC descelularizada de pulmão humano	Modelos <i>in vitro</i> de fígado para estudos sobre infecção
	MEC descelularizada de pâncreas suíno	Engenharia de pâncreas
	MEC descelularizada de mucosa traqueal suína	Traqueia vascularizada <i>in vitro</i>
	MEC descelularizada de coração suíno	Diversas aplicações na biologia e medicina
	MEC descelularizada de coração suíno	Reparo de miocárdio lesionado
Extrusão	Córneas bovinas descelularizadas	Doenças da córnea
	MEC descelularizada de cartilagem suína	Engenharia de cartilagem
	MEC descelularizada de tendão calcâneo bovino	Engenharia de tendão
	MEC descelularizada de pele suína	Testagem de drogas e engenharia de tecidos
Extrusão e jato de tinta	MEC descelularizada de pele suína	Engenharia de pele
Processamento digital de luz	MEC descelularizada de fígado e coração suíno	Ampla aplicação na engenharia de tecidos, principalmente hepático e cardíaco.
	MEC descelularizada de fígado suíno	Modelo de estudo de patologia renal <i>in vitro</i>

Fonte: Adaptado de Kabirian e Mozafari (KABIRIAN; MOZAFARI, 2019)

Tabela 2: Modelos animais comumente utilizados em estudos *in vivo* para doenças cardiovasculares

<b>Modelo Animal</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Local do enxerto vascular</b>	<b>Principais observações</b>
Cabra		Artéria carótida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células endoteliais na túnica íntima, células musculares lisas na túnica média e fibroblastos na adventícia.</li> <li>• Menor espessamento em porção média.</li> </ul>
Camundongo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclo reprodutivo rápido</li> <li>• Genoma bem conhecido</li> <li>• Barato</li> <li>• Estruturas facilmente visualizadas em exames de imagem</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelo elegível para aterosclerose</li> </ul>
Cão		Aorta abdominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observação de células endoteliais no lúmen e células musculares lisas na túnica média.</li> </ul>
		Artéria carótida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Scaffold não apresenta dilatação significativa, rupturas ou aneurismas</li> <li>• Observada camada de fibrina</li> <li>• Células musculares lisas repulularam em 8 semanas.</li> </ul>
Coelho	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamanho médio</li> <li>• Acessível</li> </ul>	Artéria carótida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de hiperplasia intimal</li> <li>• Endotelização entre 1 - 3 meses</li> <li>• Sem alteração significativa do diâmetro e do fluxo sanguíneo</li> <li>• Túnica média com diminuição significativa da espessura</li> </ul>
Ovelha		Aorta descendente ou artéria pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migração de células através da matriz.</li> <li>• Não ocorreu calcificação.</li> </ul>
Porco	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesões mais similares às doenças humanas</li> <li>• Modelo para prática cirúrgica</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não evidenciado hiperplasia</li> <li>• Endotelização</li> </ul>
Rato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maleável, disponibilidade em biotérios e barato</li> </ul>	Aorta abdominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microcalcificação, hiperplasia intimal local</li> <li>• Endotelização de 4-8 semanas</li> <li>• Trombose no sítio proximal; neo formação de colágeno na túnica média.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Zaragoza et al, (ZARAGOZA et al., 2011) e Lin et al, (LIN et al., 2019)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir biogel e protótipos de vasos sanguíneos a partir da matriz extracelular descelularizada de placenta bovina.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biogel estável, denso e que mantenha as células imersas e viáveis;
- Proporcionar adesão de células precursoras endoteliais nos biomateriais estruturalmente naturais;

### 4. HIPÓTESE

A matriz extracelular de vasos sanguíneos da superfície corioalantóide da placenta bovina é capaz de produzir biomateriais (*scaffold* e Biogel) aptos à adesão de células endoteliais em semelhança as condições observadas *in vivo*.

### 5. JUSTIFICATIVA

Os vasos sanguíneos da superfície corioalantóide da placenta bovina são uma fonte interessante de biomateriais, visto que são facilmente obtidos sem dano ao doador, além de possuir rede vascular com diâmetros diversos. Além disso, a produção de um biogel viável permite a otimização de técnicas inovadoras e interdisciplinares, como por exemplo a bioimpressão de novos vasos.

Ainda nesse sentido, a produção de um protótipo de vasos sanguíneos, seja arterial ou venoso, será de grande valia para iniciar o desenvolvimento de enxertos personalizáveis. Além de permitir avanços na engenharia de órgãos mais espessos e estudos em fisiopatologia vascular *in vitro*. Ademais, existe a possibilidade de investigação da interação celular com a MEC descelularizada, proporcionando uma

interação xenogênica (vasos de placenta bovina descelularizada e células SVVEGF de cão).

Por fim, tendo em vista o pequeno número de bancos de tecidos dessa natureza para procedimentos terapêuticos, a utilização destas técnicas também influenciaria reduzindo filas de espera para transplantes, complicações pós-operatórias e custos para a saúde pública.

## 6. CAPÍTULO II (ARTIGO I) - DECELLULARIZED VASCULAR SCAFFOLDS DERIVED FROM BOVINE PLACENTA BLOOD VESSELS

### SCAFFOLDS VASCULARES DESCCELULARIZADOS PROVENIENTES DE VASOS SANGUÍNEOS DE PLACENTA BOVINA

**Running title: Bovine placental vessels scaffolds**

Tarley Santos Oliveira<sup>1</sup>, Igor Smirnow Cordeiro, Kadija Mohamed Santee<sup>1</sup>, Maria Angelica Miglino<sup>1</sup>, \*Rodrigo da Silva Nunes Barreto<sup>1</sup>

Artigo aceito para publicação na revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Aceite: 05 abr. 2023 (Anexo A).

**Keywords:** Decellularized Extracellular Matrix; Bioengineering; Blood Vessels.

**Word-Count:** 2448

#### ***\*Corresponding Author***

Prof. Rodrigo da Silva Nunes Barreto - Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil / Avenue Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, Butantã - São Paulo/SP, CEP: 05508-270, Brazil. E-mail address: rodrigobarreto@usp.br

<sup>1</sup> Department of Surgery, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Ave. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87 / CEP 05508-270



## ABSTRACT

**Foundation:** Diseases associated with the circulatory system are the main causes of worldwide morbidity and mortality, implying the need for vascular implants. Thus, the production of vascular biomaterials has shown to be promising alternatives to therapies used in studies and research related to vascular physiology. **Objectives:** The present project aims at the artificial development of blood vessels through the recellularization of vascular scaffolds derived from bovine placental vessels. **Methods:** The chorioallantoic surface of the bovine placenta was used to produce decellularized biomaterials. For recellularization,  $2.5 \times 10^4$  endothelial cells were seeded above each decellularized vessel fragment during three or seven days, when culture were interrupted, and fragments fixed for cell attachment analysis. Decellularized and recellularized biomaterials were evaluated by basic histology, scanning electron microscopy and immunohistochemistry. **Results:** the decellularization process produced vessels that maintained natural structure and elastin content, also no cells and gDNA reminiscent was observed. Also, endothelial precursor cells attached to lumen and external surface of the decellularized vessel. **Conclusion:** our results show a possibility in future uses of this biomaterial in cardiovascular medicine, such as for development of engineered vessels.

## 6.1. INTRODUCTION

The chronic non-communicable diseases (NCDs) have been increased mainly due to a sedentary lifestyle, industrial food, high-calorie intake, alcohol, and tobacco consumption. Among NCDs, the ones related to the circulatory system failure are the main causes of worldwide morbidity and mortality (BRASIL, 2011; MALTA; SILVA JR, 2013; WHO, 2011). This failure is majorly treated by vascular surgery and viable vessels are need, that are generally derived from autologous peripheral vessel dissection and implantation in the affected site. However, at vessel removal site commonly infectious complications, necrosis, and dehiscence are described. In some cases, stent is placed in the injured vessel instead of peripheral vessel fragment, however possible complications are fractures and intimal hyperplasia (BERTANHA, 2016; IMADA; CHEN, 2022).

In this scenario, significant advances have been made by bioengineering in the production of new functional or functionalized organs, such as engineered blood vessels development to support functional vascularization (DEBBI et al., 2022; KOLESKY et al., 2016; MOORE et al., 2021). So far, small-scale vessels have been produced and most of them are formed from derivatives of rigid synthetic polymers (KOLESKY et al., 2016; SOLIS; CZEKANSKI, 2022). Otherwise, engineered vessels that maintains its structural and cellular function for long periods has not yet been produced.

Thus, the development of vascular biomaterials by recellularization and especially by bioprinting, are shown to be promising alternatives to support therapies used in diseases and studies related to vascular physiology (NOVOSEL; KLEINHANS; KLUGER, 2011a; SOLIS; CZEKANSKI, 2022). Herein we aimed to produce vascular biomaterials derived from decellularized bovine placental vessels that could be used as its natural tridimensional structure or as biogels.

## 6.2. MATERIALS AND METHODS

### 6.2.1. Sample and cells

To vessel isolation, bovine placenta was obtained at slaughterhouse with estimated age of 270 days of pregnancy. To cytocompatibility assays, two endothelial progenitor cells were used: canine yolk sac (SV) and canine yolk sac cells with vascular endothelial growth factor (VEGF) and enhanced green fluorescent protein (*eGFP*) *overexpression* (SV-VEGF) (FRATINI et al., 2016). All experiments were approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at the University of São Paulo, under protocol number 9715100718.

### 6.2.2. Decellularization protocol

The chorioallantoic surface of the bovine placenta was used to produce decellularized biomaterials. The chorioallantois was individualized and the umbilical arteries cannulated with #14 catheters and attached to the ORCA bioreactor (Harvard Apparatus, USA). Initially, perfusion was performed with phosphate buffer solution (PBS: 136.9 mM NaCl, 26.8 mM KCl, 14.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; pH 7.2) with constant volume of 0.5 ml/min until complete cleaning of the vascular system, approximately 24 hours. Then, a 0.01% solution of sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich 11767289001) was perfused in distilled water also under 0.5ml/min for 24 hours. Subsequently the solution was changed to 0.1% SDS for two days, to 0.25% for one day, to 0.5% for 1 day and to 1.0% for one day, respectively. The decellularized chorioallantois was then perfused with 1% Triton X-100 (#0694-1L, Amresco-Solon, USA) for three hours. Finally, it was washed with PBS for 24 hours, making a total of 10 days.

After decellularization all vascular system from allantochorionic surface was isolated from the cotyledon and membrane. Then vessels were 4% paraformaldehyde (PFA) preserved for decellularization validation or snap frozen for cytocompatibility assay and hidrogel production.

### 6.2.3. Decellularization validation

For decellularization validation by histological analysis the PFA preserved samples were routinely dehydrated, diaphanized and paraffin embedded. Then were sectioned using a manual microtome (Leica RM2125 RT) into 5  $\mu\text{m}$  thick slices and transferred to histological slides. To verify the absence of visible cell nuclei, the slides were stained in Hematoxylin and Eosin (H&E) or 4',6'-diamino-2-phenyl-indol (DAPI) stained and observed under a Nikon Eclipse 80I microscope under light or epifluorescence, respectively.

Also, decellularization validation was performed by quantification of remnant genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) that was extracted by salt precipitation, adapted from Olerup and Zetterquist 1992 (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992) as described by Barreto et al 2018 (BARRETO et al., 2018).

### 6.2.4. Recellularization assay

Firstly, decellularized vessels fragments of 4 cm were sterilized by wash with PBS supplement with 2% of antibiotics (penicillin and streptomycin), followed by 70% alcohol bath and ultraviolet (UV) light.

For recellularization,  $2.5 \times 10^4$  SV cells or  $2.5 \times 10^4$  SV-VEGF cells were seeded above each decellularized vessel fragment during three or seven days, when culture were interrupted, and fragments fixed for cell attachment analysis. Culture was performed with alpha minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) (LGC Biotechnology), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin antibiotic, under 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

### 6.2.5. Recellularization validation

To verify cell attachment, some recellularized vessel fragments were DAPI stained and observed under laser confocal microscope (Olympus Fluo View 1000 - FV1000). Other fragments were fixed in Karnovsky (4% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at pH 7.2) and then post-fixed in 1% osmium tetroxide (SEM R 148- HATFIELD, USA) for 90 minutes. They were dehydrated in an increasing series of Ethanol under agitation, then passed through an automated drying process (MSCPD 300, Leica) and metallized with gold (#K550, Emitech-Ashford, UK). Also, immunohistochemistry was performed, accordingly

(BARRETO et al., 2018), to verify elastin on vessel wall and VEGF from SV-VEGF cell line.

### 6.3. RESULTS

After decellularization, no visible nuclei were observed in the vessels fragments neither by hematoxylin and eosin (HE) nor by DAPI stains (Figure 6- D2). Also, less than 50 ng of gDNA per mg of decellularized vessel was quantified (Figure 5). Regarding conservation of the bovine placenta vessels vascular arrangement, it was observed, even in vessel up to 5 mm in diameter (Figure 5-F), by scanning electron microscopy the decellularized vessels showed structural maintenance and a porous lumen (Figure 6 – A4).

After recellularization, even on day three of culture, cells were possible to be observed on decellularized vessel surface and lumen, however, visually the number of cells were increased on day seven. Also, SV-VEGF cells were more numerous than SV cells, both on day three and seven. Those cells were observed both by HE and DAPI stains (Figure 6 – D1 and F2).

The elastin distribution pattern was similar both at native, decellularized and recellularized placental vessels (Figure 6 – A3, B3 and D3).

### 6.4. DISCUSSION

The bovine placenta is an organ that, after decellularization, can be used as a source of biomaterial, especially vascular scaffolds. Even after the decellularization process, both the cotyledons (BARRETO et al., 2018), as for the chorioallantoic membrane (BALLESTEROS et al., 2020) maintained their structure and extracellular matrix composition preserved. Herein we produced decellularized vessels with structure and elastin maintenance, even in small diameter vessels. Also, those decellularized vessels had cytocompatibility with endothelial precursor cells (SV and SV-VEGF cells) and the morphological and behavioral results of these cell lines had already been described and remain in accordance with those presented by recellularization in other biomaterials, as demonstrated by Fratini et al (FRATINI et al., 2018).

Furthermore, other alternative to use this decellularized vessel is its digestion to produce biogels that is rich in collagen, and can be used to produce bioengineered vessels with different diameters and sizes (CHOUDHURY et al., 2018; KOLESKY et al., 2016; PATI et al., 2014a).

## 6.5. CONCLUSION

The bovine placenta vessels can produce viable and cytocompatible decellularized biomaterials that can be a source structurally natural vascular biomaterials, as well as future prospects for bioengineered vessels.

## 6.6. ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by The Sao Paulo Research Foundation (FAPESP grant number 2014/50844-3) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). All microscope imaging was supported by the Advanced Center of Image Diagnosis (CADI-FMVZ-USP).

## REFERENCES

BALLESTEROS, A. C. V. et al. Membrana amniótica descelularizada bovina: matriz extracelular como andaime para a pele de mamíferos. **Polímeros**, v. 12, n. 3, mar. 2020.

BARRETO, R. DA S. N. et al. Cotilédones bovinos descelularizados podem servir como andaimes biológicos com arranjo vascular preservado. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 4, pág. e1880–e1888, abr. 2018.

BERTANHA, M. Perspectivas de uso de células-tronco em cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular**, jul. 2016.

BRASIL. **Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília Ministério da Saúde, 2011.

CHOUDHURY, D. et al. **Matriz extracelular descelularizada derivada de órgão: um divisor de águas para a fabricação de biotintas?** Tendências em Biotecnologia: Elsevier Ltd., atrás. 2018.

DEBBI, L. et al. Integração de macrovasos projetados com capilares automontados em tecido implantável 3D para promover a integração vascular in vivo. **Biomateriais**, v. 280, p. 121286, 1 jan. 2022.

FRATINI, P. et al. Diferenciação endotelial de células do saco vitelínico canino transduzidas com VEGF. **Pesquisa em ciência veterinária**, v. 104, p. 71–76, 1 fev. 2016.

FRATINI, P. et al. Placenta Canina Recelularizada Utilizando Células do Saco Vitelino com Fator de Crescimento Endotelial Vascular. **BioResearch Open Access**, 2018.

IMADA, B. C.; CHEN, S. R. Anatomia Vascular Regional. **Vascular Complications of Surgery and Intervention**, p. 3–35, 2022.

KOLESKY, D. B. et al. Bioimpressão tridimensional de tecidos vascularizados espessos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 12, pág. 3179–3184, mar. 2016.

MALTA, D.C.; SILVA JR, J. B. DA. **O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 22, n. 1, pág. 151–164, mar. 2013.

MOORE, M.J. et al. Bioengenharia de vasos sanguíneos artificiais a partir de materiais naturais. **Tendências em Biotecnologia**, 6 dez. 2021.

NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. A vascularização é o principal desafio na engenharia de tecidos. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4, pág. 300–311, 2011.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. Tipagem de HLA-DR por amplificação por PCR com primers de sequência específica (PCR-SSP) em 2 horas: Uma alternativa à tipagem sorológica de DR na prática clínica, incluindo compatibilidade doador-receptor em transplante cadavérico. **Tissue Antigens**, v. 39, n. 5, pág. 225-235, 1992.

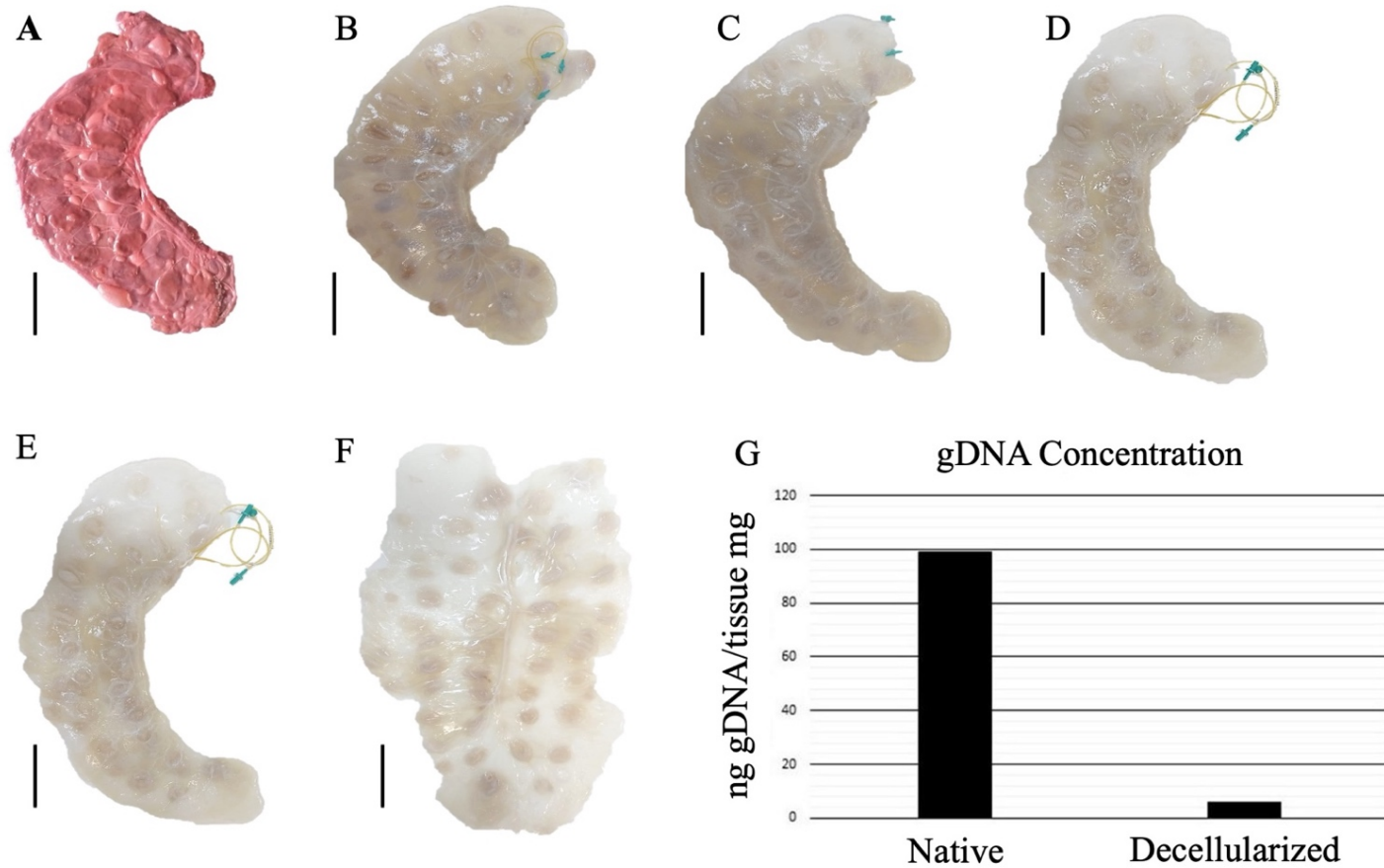
WHO. **Relatório de status global sobre doenças não transmissíveis 2010.** Genova: [s.n.]. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 5 abr. 2023.

PATI, F. et al. Imprimindo análogos de tecido tridimensionais com biotinta de matriz extracelular descelularizada. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–11, 2014.

SOLIS, D. M.; CZEKANSKI, A. Técnicas de manufatura aditiva 3D e 4D para estruturas vasculares – Uma revisão. **Bioimpressão**, v. 25, p. e00182, 1 mar. 2022.



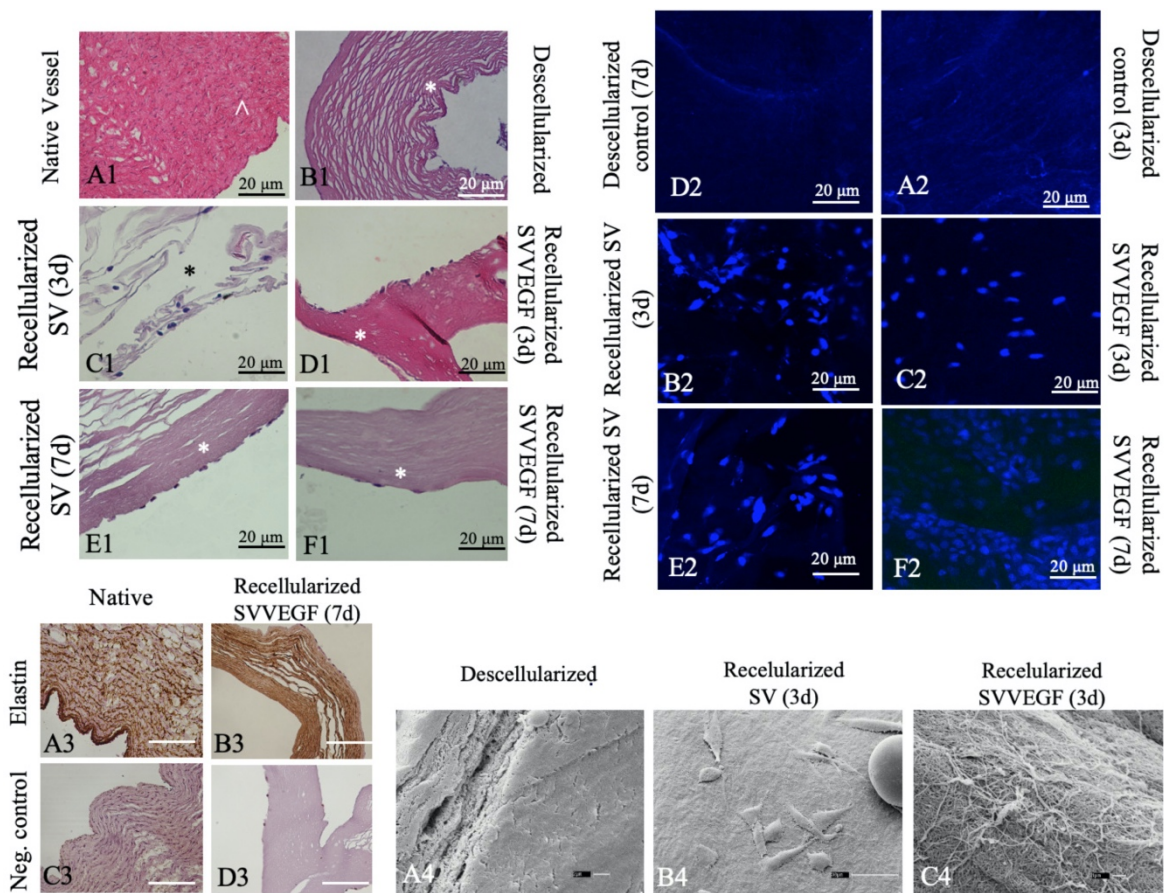
Figura 5: Decellularization of the bovine placenta vessels



Source: Oliveira, 2023.

Subtitle: A: bar = 10 cm, placenta dissected, and umbilical artery and vein cannulated. B: bar = 10 cm, beginning of the decellularization process. C-E: bar = 10 cm, progression of decellularization. F: bar = 10 cm, completion of decellularization, with maintenance of the structure. G: genomic deoxyribonucleic acid (gDNA) in the vascular scaffolds of the chorioallantoic surface of the decellularized bovine placenta.

Figura 6: Analysis of decellularized and recellularized bovine placental vessel



Source: Oliveira, 2023.

Subtitle: Hematoxylin eosin, (A1) Native vessel, Bar= 20  $\mu\text{m}$ , (^) lumen: extracellular matrix fibers stained in pink and cell nucleus in purple; (B1) Decellularized, Bar= 20  $\mu\text{m}$ , (\*) external surface: absent cell nuclei; (C-F1) Recellularized, Bar= 20  $\mu\text{m}$ , (\*) external surface: (C1), Recellularized three days (SV line), cell nuclei stained in purple adhered to the external surface of the biomaterial; (D1), Recellularized three days with canine yolk sac cells with vascular endothelial growth factor (VEGF) and *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) overexpression (SV-VEGF lineage), extracellular matrix fibers stained in pink and cell nuclei in purple adhered to the external surface of the biomaterial; (E1), Recellularized seven days canine yolk sac cells (SV-lineage), cell nuclei stained in purple adhered to the external surface of the biomaterial; (F1), Recellularized seven days with cells (SV-VEGF lineage), extracellular matrix fibers stained in pink, cell nuclei in purple adhered to the external surface of the biomaterial. (A4) bar = 2  $\mu\text{m}$ , decellularized: Observe preservation of fibers of the extracellular matrix of the vascular biomaterial; Recellularization with three days of culture (B4, C4): (B4) bar = 30  $\mu\text{m}$ , with SV cells adhered to the vascular biomaterial wall; (C4) bar = 10  $\mu\text{m}$ , SV-VEGF cells adhered to the vascular biomaterial wall. Immunohistochemistry assay: elastin expression in the vascular biomaterial of the native bovine chorioallantoic surface, and recellularized with SV-VEGF cells. Caption: Bar=20  $\mu\text{m}$ , (A3) native blood vessel of the chorioallantoic surface of the bovine placenta, observe elastin expression in the entire vascular wall; (B3) native blood vessel from the chorioallantoic surface of the bovine placenta, negative control stained with hematoxylin; (C3) 7-day recellularization of bovine placental vascular biomaterial with SV-VEGF cells, observing elastin expression in the entire vascular wall; (D3) 7-day recellularization of bovine placental vascular biomaterial with SV-VEGF cells, negative control stained with hematoxylin. Recellularization assay: Bar 20  $\mu\text{m}$ ; (A2-C2) 3 days of cultivation; (A2) decellularized control vascular biomaterial, observe absent nuclei; (B2) biomaterial recellularized with canine yolk sac endothelial progenitor cells (SV), observe nuclei stained in blue by 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); (C2) recellularized biomaterial with SV-VEGF cells, observe nuclei stained blue by DAPI, eGFP not observed; (D2-F2) 7 days of cultivation; (D2) vascular biomaterial decellularized control, observe absent nuclei; (E2) biomaterial recellularized with SV cells, observe nuclei stained in blue by DAPI; (F2) Biomaterial recellularized with SV-VEGF cells, observe nuclei stained in blue by DAPI.

## **7. CAPÍTULO III (ARTIGO II) – AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOGEL E SCAFFOLDS DERIVADOS DE VASOS SANGUÍNEOS DE PLACENTA**

Tarley Santos Oliveira<sup>1</sup>, Igor Smirnow Cordeiro<sup>1</sup>, Ana Cláudia Carreira Oliveira<sup>1,2</sup>, Maria Angelica Miglino<sup>1</sup>, Rodrigo da Silva Nunes Barreto<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87 / CEP 05508-270.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC, Santo André-SP, Brasil, Avenida dos Estados, 5001 / CEP 09210-580

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP)

### **RESUMO**

A Matriz extracelular descclularizada dos vasos da placenta bovina em avaliação macroscópica, mantém grande variedade de diâmetros. Ainda permite a manutenção de componentes estruturais importantes, como por exemplo colágenos, proteoglicanos, fibronectina e laminina. Recentemente esse órgão descclularizado vem sendo utilizado na medicina regenerativa, empregando sua estrutura para recellularização ou até mesmo para produção dos biogéis. O presente trabalho tem como objetivo produzir biogel e protótipos de vasos sanguíneos a partir da matriz extracelular de placenta bovina descclularizada. Para tanto, foram utilizados vasos da superfície corioalantoide da placenta bovina previamente descclularizados. Logo após os vasos foram recellularizados com células caninas precursoras endoteliais com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF), em concentração de  $1 \times 10^5$ /ml. Os vasos sanguíneos de placenta, também passaram por um processo de digestão da sua matriz extracelular tendo como produto um biogel. Para aumento da sua

viscosidade foi utilizado alginato 10%. Na avaliação da compatibilidade do biogel,  $3 \times 10^5$  células SVVEGF foram semeadas em cada placa. Após o período de maturação celular, os biomateriais descelularizados ou cultivados em biogel foram avaliados por histologia básica, microscopia eletrônica de varredura e confocal. Foi possível observar que os *scaffolds* naturais mantiveram re-endothelização satisfatória por células SVVEGF. O biogel permitiu manutenção de características estruturais importantes além da viabilidade celular, podendo ser uma alternativa para cultivo ou até mesmo para procedimentos como bioimpressão.

Palavras-chave: matriz extracelular descelularizada; recelularização; biogel

## 7.1. INTRODUÇÃO

A Matriz extracelular descelularizada dos vasos da placenta bovina em avaliação macroscópica, mantém grande variedade de diâmetros. Ainda permite a manutenção de componentes estruturais importantes, como por exemplo colágenos, proteoglicanos, fibronectina e laminina (BARRETO et al., 2018). Recentemente esse órgão descelularizado vem sendo utilizado na medicina regenerativa, empregando sua estrutura para recelularização (KAKABADZE et al., 2019) ou até mesmo para produção dos biogeis.

Os biogeis derivados de matriz extracelular (MEC) vem sendo utilizados pela comunidade científica para diversos fins. Tanto em formulações mais solúveis e injetáveis, quanto para fim estrutural que prevê a manutenção de porosidade e suporte celular (CHEN et al., 2019; CHOUDHURY et al., 2018; GROLL et al., 2019; JANG et al., 2016; JIA et al., 2014; KABIRIAN; MOZAFARI, 2019; LEE et al., 2020; MAAN; MASRI; WILLERTH, 2022; METHACRYLATED et al., 2022; PATI et al., 2014b). Mesmo com os avanços na criação de biogeis, um dos maiores desafios na bioengenharia de tecidos é criar uma rede vascular viável que mantenha as células em microambiente favorável (KONG; WANG, 2023).

Com base na necessidade de avaliação da integração e viabilidade celular com os *scaffolds* vasculares e biogeis, a linhagem celular utilizada deve permitir epitelização e neovascularização. Nesse sentido, as células de saco vitelino com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF) se tornam

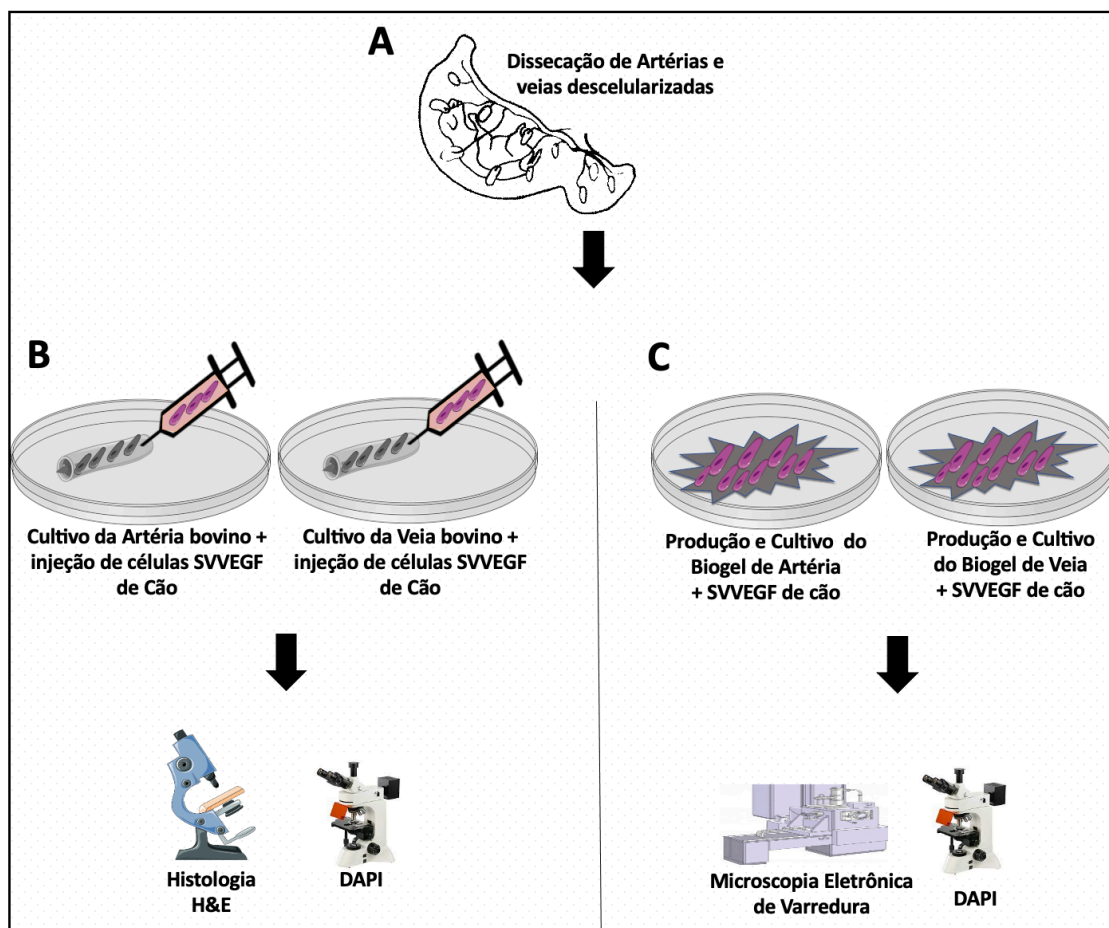
aptas por se comportarem como progenitoras endoteliais e apresentarem taxas de proliferação maiores em relação às células de saco vitelino (SV) (FRATINI et al., 2016, 2018).

Por fim, este trabalho tem como objetivo avaliação da citocompatibilidade de biogel e *scaffolds* vasculares derivados de vasos sanguíneos de placenta bovina com células SVVEGF.

## 7.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.2.1. Desenho experimental

Figura 7: Desenho experimental do artigo II



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A:** Foram utilizadas placentas bovinas remanescentes de projetos anteriores; descelularizadas; dissecados os vasos sanguíneos descelularizados da placenta; **B:** recelularizados por injeção com células SVVEGF de cão; ao final, passaram por H&E e DAPI. **C:** parte dos vasos foram digeridos utilizando pepsina e transformados em um biogel (biogel de veia e biogel de artéria); espalhado em placa de petri em cocultivo com as células SVVEGF de Cão; ao final, passaram por MEV e DAPI.

### 7.2.2. Coleta de materiais

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUAx) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, sob o número de protocolo 3354130120. Foi utilizada placenta bovina com idade estimada de 270 dias de gestação remanescentes do projeto nº 9715100718, previamente aprovado por esta CEUA. Já as células de saco vitelino de cão com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (SVVEGF), são provenientes de projeto nº 1712/2009, também aprovado por esta CEUA.

### 7.2.3. Recelularização dos *scaffolds* vasculares

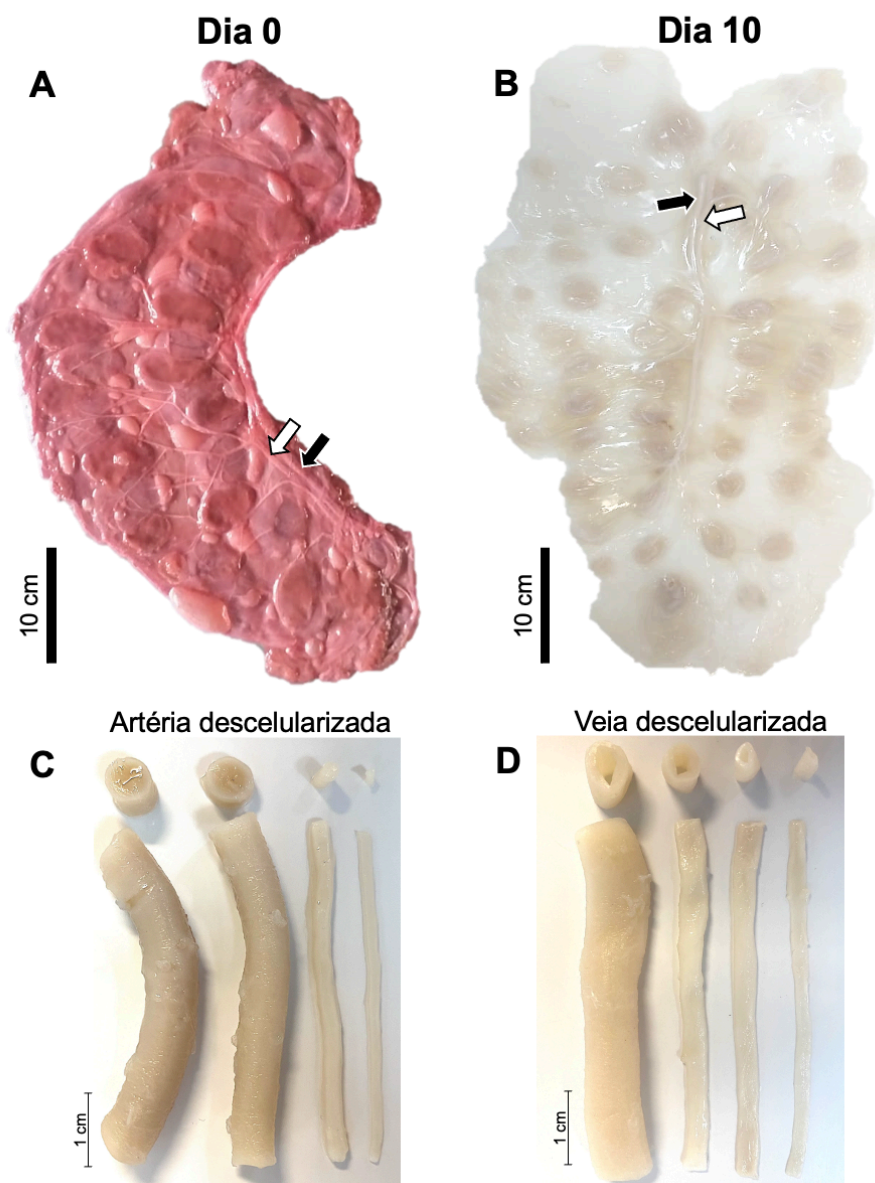
Para recelularização dos *scaffolds* vasculares, a placenta bovina previamente descelularizadas (artigo I) foi dissecada em fragmentos de artérias (figura 8 C) e veias (figura 8 D) 3 a 5 cm. Os vasos foram expostos por 15 minutos à luz ultravioleta no fluxo laminar imersos em álcool 70% e posteriormente deixados em meio completo, em estufa a 37°C e CO<sub>2</sub> a 5%. Após 3 dias sem contaminação (figura 9 A e B), as extremidades dos vasos foram coladas com super cola, e as células SVVEGF (1x10<sup>5</sup>/ml de meio) injetadas no seu lúmen com auxílio de uma seringa e agulha 40x12 estéreis. Cada vaso comportou aproximadamente 0,5 ml de solução (figura 9 C e D).

Após 24 e 48 horas de cocultivo, o conteúdo do interior dos vasos foi coletado e realizado contagem das células viáveis e não viáveis. Em fator de diluição de 1/1, foi utilizado o corante azul de tripan 0,4 (LGC Biotecnologia) e observadas em câmara de Neubauer (Olen). Nos dois momentos, logo após esta contagem, uma nova injeção de 0,5 ml de solução de células (1x10<sup>5</sup>/ml de meio) foi realizada em cada vaso.

Após 7 dias os vasos foram retirados de cultivo e conservados em paraformaldeído 4% para posterior análise histológica.



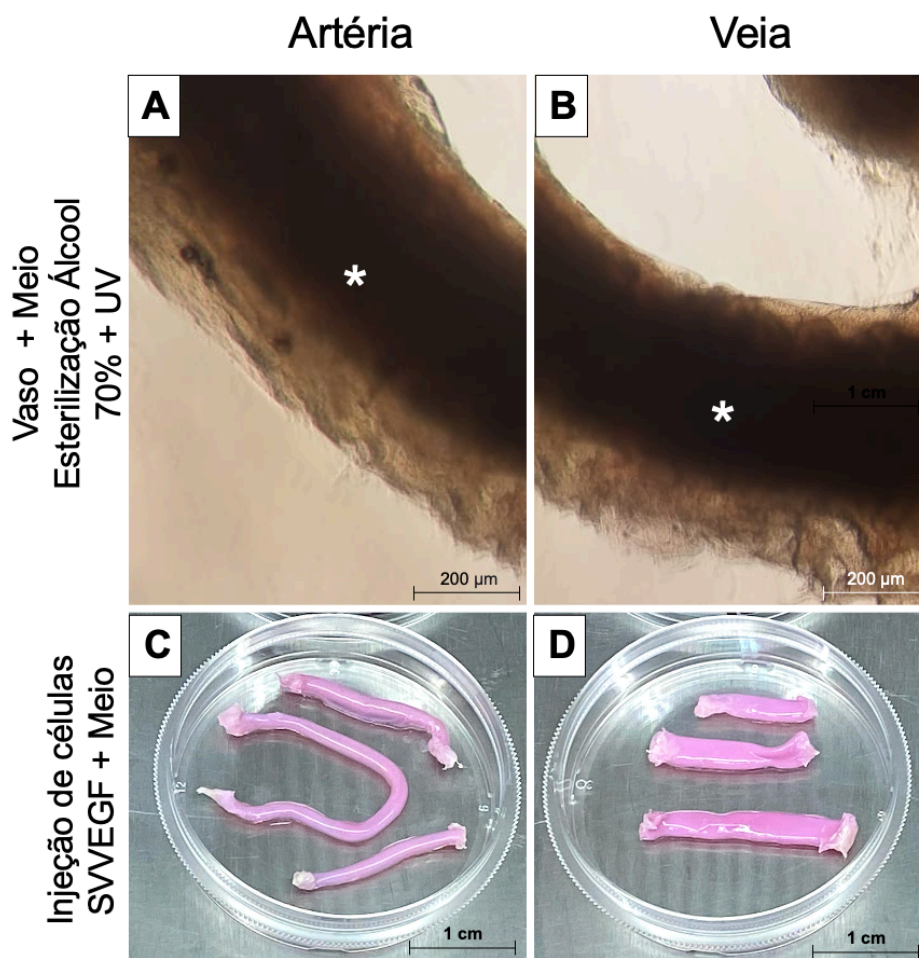
Figura 8: Anatomia vascular de placenta descelularizada e variedade de diâmetros.



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A:** Placenta bovina nativa antes da descelularização, 0 dias. **B:** Placenta bovina nativa depois da descelularização, 10 dias. **C:** variedade de diâmetros de artérias descelularizadas. **D:** variedade de diâmetros de artérias descelularizadas. Artéria (seta branca); Veia (seta preta).

Figura 9: Processo esterilização e injeção de células nos *scaffolds* vasculares.



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A:** Artéria de placenta bovina descelularizada, esterilização utilizando álcool 70% e luz UV, 3 dias, artéria (\*). **B:** Veia de placenta bovina descelularizada, esterilização utilizando álcool 70% e luz UV, 3 dias, veia (\*). **C:** as extremidades das artérias foram coladas e as células SVVEGF de cão injetadas em seu lúmen. **D:** as extremidades das veias foram coladas e as células SVVEGF de cão injetadas em seu lúmen.

#### 7.2.4. Avaliação da recelularização dos *scaffolds* vasculares

Para análise da recelularização, os vasos foram segmentados e fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 48 horas, logo após desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e inseridas em parafina. Foram realizadas secções de 5 µm em micrótomo (#RM2265, Leica - Nussloch, GE) e transferidas para lâminas de vidro coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), permitindo a visualização de núcleos celulares e matriz extracelular.

Os biomateriais, também foram incubados em DAPI (1:10000) por 10 minutos, sendo feita em seguida lavagem com PBS 1X. Por fim, foram visualizados



em Microscópio confocal a laser Olympus FluoView 1000.

#### **7.2.5. Produção do biogel**

Os vasos sanguíneos dissecados, tanto as artérias (Figura 8 C), quanto as veias (Figura 8 D) foram pesados, colocados em tubos Falcon (50 ml) e triturados em temperatura ambiente com a utilização de tesoura cirúrgica de aço inoxidável.

Em seguida foram produzidos dois modelos de biogel, um derivado das artérias (Figura 10 A) e outro derivado das veias (Figura 10 B). Para cada 1 g de MEC descelularizada foi digerida em agitação por 48 horas em 1 ml de solução de digestão (100 mg de pepsina (Sigma Aldrich, P7000) diluída em 10 mL ácido acético de 0,5 M (Sigma Aldrich, A6283)) em pH 2,0. Logo após os tubos foram mantidos em temperatura de 37°C, até a digestão total dos fragmentos dos vasos descelularizados. O gel digerido foi filtrado e o PH corrigido para 7,3 utilizando solução de NaOH a 0,1N (1/10 do volume biogel). A leitura foi realizada utilizando pHmetro (Bel Engineering PHS3BW) (PATI et al., 2014a)

Ao final, foi adicionado 10% de alginato (Sigma Aldrich, 901953), juntamente com 200 µL/mL de CaCl (p/v) então cerca de 2 mL da solução foi colocada em placa de cultura ao biogel para finalização da gelificação.

Para avaliação da sua consistência e superfície, o biogel também passou por avaliação de integração com meio completo (figura 10 C e D) e MEV de sua superfície (figura 10 E e F), conforme técnica já descrita nessa metodologia.

#### **7.2.6. Recelularização do biogel**

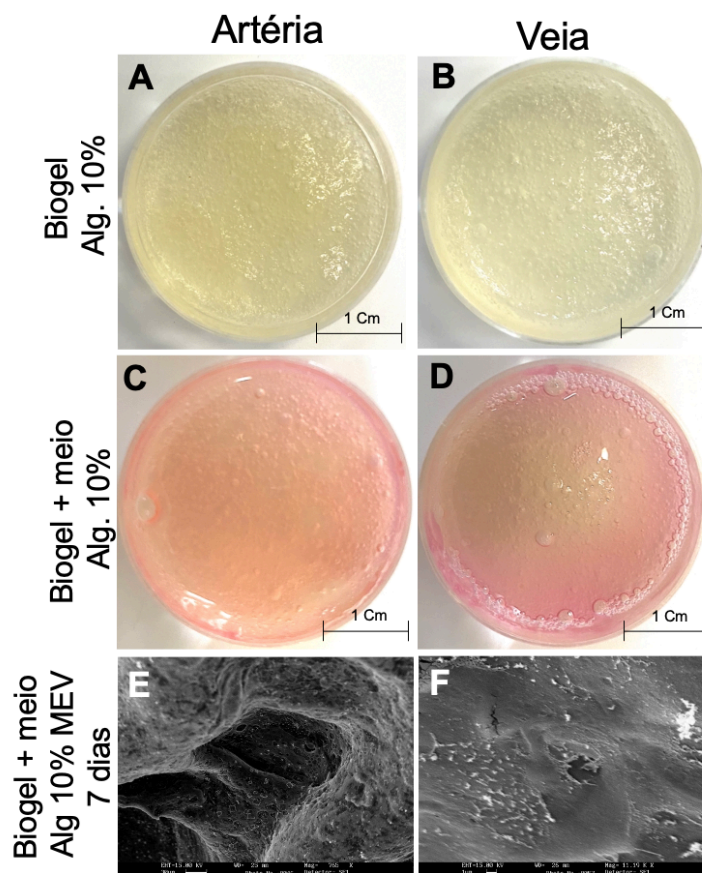
Para recelularização do biogel, inicialmente uma película de 3 mm de espessura dos biogéis 10% de alginato foram depositados sobre placa de petri e mantidos sob luz ultravioleta por 15 minutos. Posteriormente foram semeadas  $3 \times 10^5$  células SVVEGF de cão em 1 ml de meio de cultivo completo (MEM, 10% de SFB e 1 % de penicilina-estreptomicina) e incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 dias.

### 7.2.7. Avaliação da recelularização do biogel

Após 48 horas e 7 dias de cultivo, uma alíquota do gel foi colhida para análise, realizada a incubação com DAPI por 10 minutos, lavado com PBS estéril e observados microscópio de epi-fluorescência (Nikon - Eclipse 80i).

Para verificar a adesão celular ao biogel, alguns fragmentos do gel foram desidratados e fixados em Karnovsky (4% PFA e 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) e posteriormente fixados em tetróxido de ósmio 1% (SEM R 148- HATFIELD, EUA) por 90 minutos. Eles foram desidratados em uma série crescente de etanol sob agitação, depois passaram por um processo de secagem automatizado (MSCPD 300, Leica) e metalizados com ouro (#K550, Emitech-Ashford, Reino Unido).

Figura 10: produção do biogel



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A** e **B**: produção do biogel de artéria e veia, 0 dias. **C** e **D**: meio completo sobre biogel de artéria e veia, 0 dias. **E**: MEV de biogel de artéria demonstrando tunelização e porosidade, 7 dias. e **F**: MEV de biogel de veia demonstrando homogeneidade entre MEC e alginato.

### 7.3. RESULTADOS

#### 7.3.1. Avaliação da recelularização dos *scaffolds* vasculares

Após 24 horas de cocultivo do scaffold com as células SVVEGF de cão, uma soma de  $1,68 \times 10^5$  células foram identificadas como não viáveis no meio retornado do lúmen dos vasos, o que corresponde a 56% do total de células injetadas no primeiro momento. O que sugere que os 44% de células que não retornaram já estavam aderidas.

O mesmo processo foi realizado em 48 horas de cocultivo,  $8,50 \times 10^4$  células foram identificadas como não viáveis no meio retornado, o que corresponde a 28,3% do total de células injetadas no segundo momento. O que sugere que 71,7% das células estavam aderidas.

Após os 7 dias de cultivo, macroscopicamente, os vasos mantiveram sua estrutura anatômica, resistência e elasticidade esperada para o biomaterial. O meio completo de coloração rósea permeou com facilidade e a super cola conseguiu fixar as extremidades vasculares.

Em avaliação por H&E, tanto artéria quanto veia apresentaram endotelização considerável do lúmen e preenchimento da porosidade (figura 11 - C1 e C2, D, E e F) observada em controle descelularizado (figura 11 - A e B). Também ocorreu recelularização de parte da túnica média, sendo observadas distribuição de núcleos celulares pelo biomaterial.

Sob fluorescência com DAPI foi possível observar a manutenção das células SVVEGF, os núcleos marcados em azul, demonstram células entremeadas à artéria (figura 11 - G) e veia (figura 11 - H).

#### 7.3.2. Avaliação da recelularização do biogel

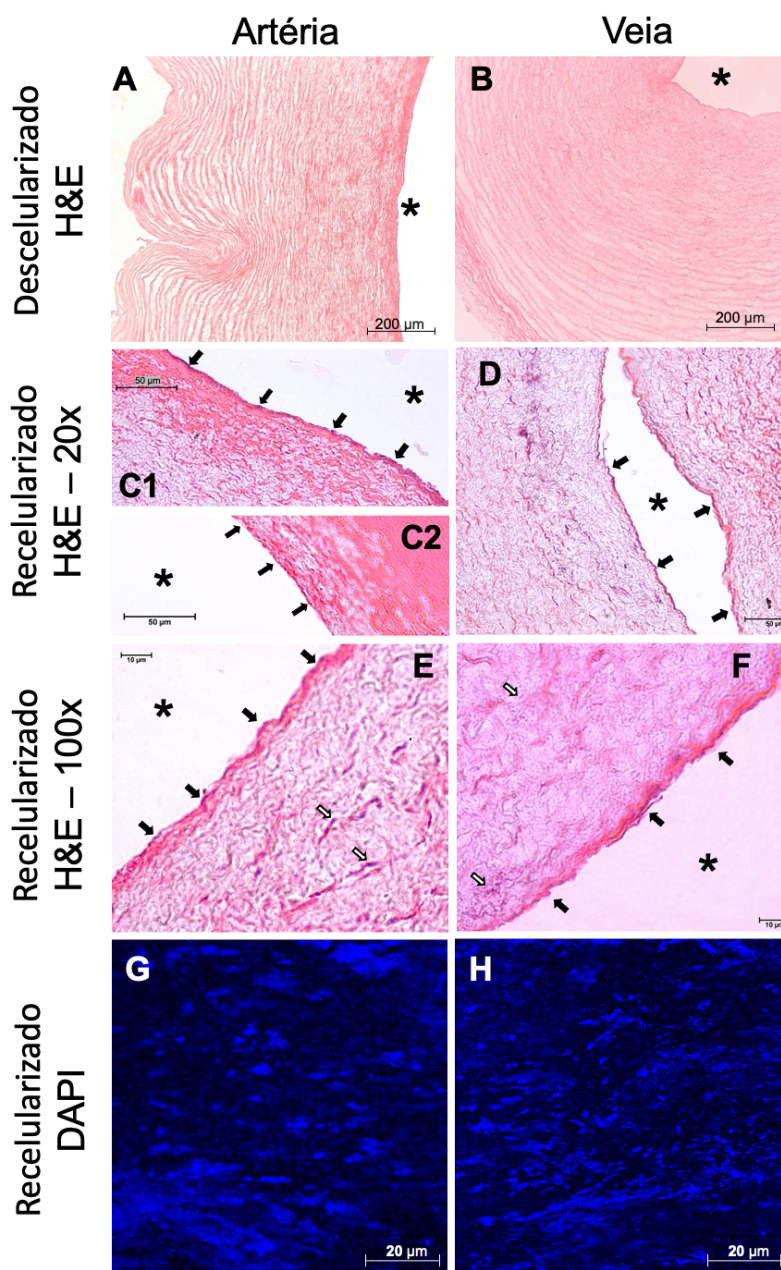
Após 7 dias de cultivo, o biogel manteve consistência, transparência, ausência de contaminação e manutenção de porosidade. O meio completo com células SVVEGF de cão semeados em sua superfície integraram o gel, conservando coloração rósea.

Sob fluorescência com DAPI, em 48 horas foi possível observar tanto no biogel de artéria quanto de veia, a manutenção de grande quantidade de núcleos

celulares marcados em azul (figura 12 – B e C). Aos 7 dias de cultivo ocorreu diminuição considerável dos núcleos celulares (figura 12 – D e E).

Em avaliação por MEV, os biogéis apresentaram algumas células em sua superfície, demonstrando adesão celular considerável (figura 12 – G e H).

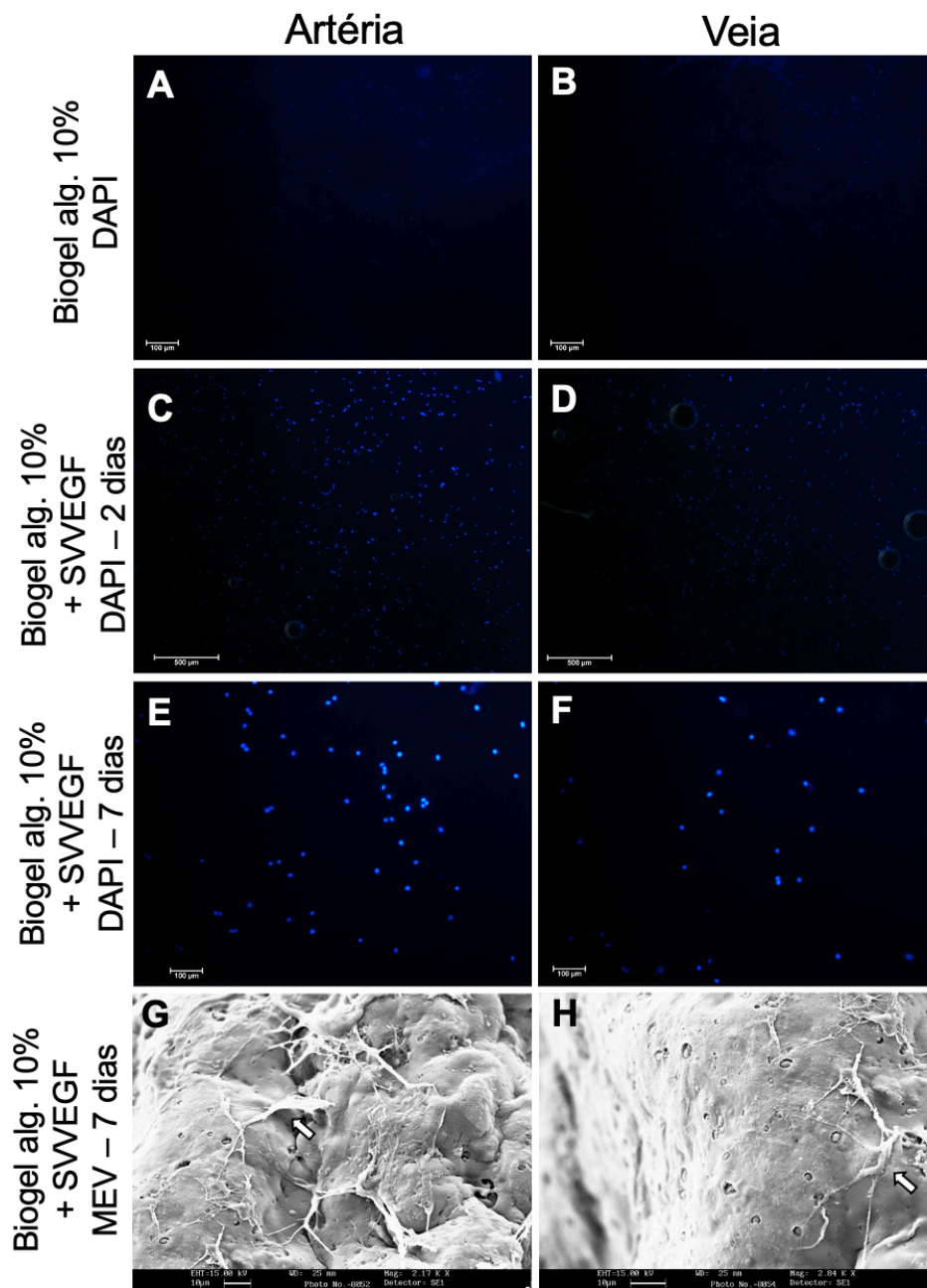
Figura 11: Avaliação da recelularização dos *scaffolds* vasculares



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A e B**: controle descelularizado 10 dias, ausência de núcleos, H&E. **C e D**: recelularização vaso com SVVEGF de cão, presença de núcleos, 7 dias, H&E 20x, mic. luz. **E e F**: recelularização vaso com SVVEGF de cão, presença de núcleos, 7 dias, H&E, 100x, mic luz. **G e H**: recelularização vaso com SVVEGF de cão, presença de núcleos em azul, 7 dias, DAPI, confocal. Lúmen do vaso (\*); Seta preta (núcleos em túnica interna); Seta branca (núcleos em túnica média).

Figura 12: Avaliação da recelularização do biogel



Fonte: Oliveira, 2023.

Legenda: **A e B**: controle biogel, ausência de núcleos, DAPI, confocal. **C e D**: recelularização do biogel com SVVEGF de cão, presença de núcleos em azul, 48 horas, DAPI, confocal. **E e F**: recelularização gel com SVVEGF de cão, presença de núcleos em azul, 7 dias, DAPI, confocal. **G e H**: recelularização gel com SVVEGF de cão, presença de células e adesão celular, MEV, 7 dias. Seta branca (células aderidas em superfície).



#### 7.4. DISCUSSÃO

A placenta bovina é um órgão que após descelularizada pode ser utilizada como uma fonte de biomaterial, principalmente quando se objetiva utilização de *scaffolds* vasculares (BARRETO et al., 2018). Foi possível produzir biomateriais vasculares em grande número e variedade de diâmetros.

A forma mais comum de esterilização das estruturas após a descelularização tem sido a utilização de agentes ácidos-básicos. O ácido peracético, se mostrou eficaz nesse processo, no entanto, a sua acidez pode causar ruptura de componentes da MEC (JANG et al., 2016; TAO et al., 2021). São observáveis alterações das capacidades mecânicas e retardo do crescimento celular após recelularização (KABIRIAN; MOZAFARI, 2019). A irradiação também é um dos métodos utilizados e apresenta vantagens como a esterilização em temperatura ambiente e ausência residual, no entanto, deve ser utilizada moderadamente já que a exposição prolongada pode causar desnaturação proteica (TAO et al., 2021). Nossos resultados de esterilização que utilizaram a luz ultravioleta e álcool 70%, também demonstraram sucesso.

A recelularização com as células SVVEGF foi realizada anteriormente utilizando placenta de cão, apresentando melhor performance de repopulação dos *scaffolds* vasculares do que as células SV (FRATINI et al., 2018). Em conformidade com nossos resultados, que demonstraram endotelização considerável do lúmen vascular, com as células SVVEGF. Outros trabalhos buscaram a recelularização com diferentes tipos celulares, como por exemplo a infusão de sangue fresco e meio de diferenciação endotelial em veia safena humana descelularizada, permitindo sucesso na construção da túnica íntima do vaso (KUNA; XU; SUMITRAN-HOLGERSSON, 2018).

Ainda como alternativas de utilização dos vasos da placenta, um biogel pode ser criado a partir da digestão da sua estrutura (KABIRIAN; MOZAFARI, 2019). Em relação a composição do biogel, o colágeno é um exemplo de componente presente em grande quantidade no biomaterial (BALLESTEROS et al., 2020), mas mesmo permitindo manutenção da estrutura, métodos como a bioimpressão podem necessitar de adjuvantes que auxiliem a sustentação do gel após colocação das células.

O biogel derivado de MEC foi capaz de manter as características e proliferação celular (JANG et al., 2016) no entanto apresenta pouca viscosidade para impressão. No que se refere ao biogel derivado de MEC e alginato, em semelhança ao utilizado neste trabalho, as células se mantiveram vivas (LEE et al., 2020). Nesta composição ocorre manutenção da consistência viscosa (CHOUDHURY et al., 2018; LEE et al., 2020), no entanto a atenção deve ser redobrada, já que o alginato em grandes concentrações pode ser prejudicial à viabilidade celular (URTAZA et al., 2022).

Outros trabalhos contestam e afirmam que a viabilidade e adesão celular é maior no biogel de ECM e alginato, o que pode estar relacionado às propriedades mecânicas de adesão celular (BRACCINI et al., 2020), já que a consistência é maior na presença de alginato. A associação do biogel com alginato permite a construção de uma estrutura citocompatível que mimetiza as condições fisiológicas, permitindo a suspensão homogênea das células, garantindo uma alta resolução de bioimpressão (JIA et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Esse dado está de acordo com nossos resultados já que as células se mantiveram vivas em biogel 10% alginato, além da manutenção da estrutura.

Como alternativa ao alginato, a gelatina também pode ser utilizada, promovendo nutrientes e estabilidade para a proliferação e agregação celular (WANG et al., 2006). Existem trabalhos que utilizam adição de colágeno (CAMPOS et al., 2015), seda (DAS et al., 2015; LAM et al., 2021), ácido hialurônico (DUAN et al., 2014), dentre outros.

Em relação a esterilização do biogel, a maioria dos trabalhos utilizaram irradiação UV por 20 (AZADBAKHT et al., 2023) ou 30 minutos (BRACCINI et al., 2020; ZHANG et al., 2015). Nossos dados demonstram que após exposição do biogel por 15 minutos em UV, não ocorreu contaminação. A diminuição desse tempo é importante para a não desnaturação de componentes da MEC (TAO et al., 2021).

Em relação à viabilidade celular, um biogel derivado de placenta humana descelularizada permitiu microambiente *in vitro* estável para manutenção das células endoteliais de veia de cordão umbilical humanas (HUVECs) (DUAN et al., 2022). Outro estudo, que também avaliou a integração de biogel de placenta humana e HUVECs, realizou a avaliação *in vivo*, com implantação subcutânea em

camundongos. Após avaliação o biomaterial apresentou integração com o modelo animal, além da estimulação da angiogênese (AZADBAKHT et al., 2023). Nossos resultados vão ao encontro dos dados apresentados acima, já que as células SVVEGF permaneceram vivas no biogel tanto em 48 horas quanto em 7 dias de cocultivo. Vale ressaltar que a quantidade de células visualizadas em 48 horas foi relativamente maior, o que sugere que a utilização da biotinta seja priorizada nessa altura de cultivo. Este dado, também pode ser um parâmetro para o momento ideal para possíveis novas injeções de células no biogel, caso o montante de células desejado seja maior.



## 7.5. CONCLUSÃO

- ✓ Por fim, podemos concluir que a utilização de placenta bovina descelularizada é uma fonte viável para produção de biomateriais vasculares estruturalmente naturais, assim como biogel.
- ✓ As células precursoras endoteliais SVVEGF tem maior taxa de proliferação celular nos *scaffolds* vasculares em relação às SV.
- ✓ Os *scaffolds* naturais mantiveram endotelização satisfatória por células SVVEGF.
- ✓ O biogel permitiu manutenção de características estruturais importantes para suporte celular, podendo ser uma alternativa para cultivo ou até mesmo para procedimentos como bioimpressão.
- ✓ O biogel não foi citotóxico e permitiu a manutenção celular.

Ao final deste estudo, o objetivo geral foi respondido, já que foi realizado produção biogel e protótipos de vasos sanguíneos a partir da matriz extracelular descelularizada de placenta bovina.

## REFERÊNCIAS

ALISON, M. R. et al. Embryonic stem cells. **The Journal of Pathology**, v. 197, n. 4, p. 424–429, 1 jul. 2002.

AZADBAKHT, A. et al. Chitosan-Placental ECM Composite Thermos-Responsive Hydrogel as a Biomimetic Wound Dressing with Angiogenic Property. **Macromolecular Bioscience**, v. 23, n. 2, p. 2200386, 8 fev. 2023.

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.

BALLESTEROS, A. C. V. et al. Bovine decellularized amniotic membrane: Extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. **Polymers**, v. 12, n. 3, mar. 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, abr. 2018.

BARRETO, R. DA S. N. et al. ECM proteins involved in cell migration and vessel formation compromise bovine cloned placentation. **Theriogenology**, v. 188, p. 156–162, ago. 2022.

BARRETO, R. S. N. et al. Pericytes in the Placenta: Role in Placental Development and Homeostasis. Em: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]. v. 1122p. 125–151.

BERTANHA, M. **Perspectivas de uso de células-tronco em cirurgia vascular. Jornal Vascular Brasileiro** Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, , jul. 2016.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 42–46, 2008.

BRACCINI, S. et al. **Adhesion of fibroblast cells on thin films representing surfaces of polymeric scaffolds of human urethra rationalized by molecular**

**models of integrin binding: cell adhesion on polymeric scaffolds for regenerative medicine.** *Journal of Biotechnology* Elsevier B.V., , dez. 2020.  
BRASIL. **Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022.** Brasília Ministério da Saúde, , 2011.

BRASIL. **Transplantes e Doação de Órgãos — Ministério da Saúde.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt>>. Acesso em: 6 abr. 2023.

CAJERO-JUÁREZ, M. et al. Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: A model for the study of vascular endothelium. **European Journal of Cell Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–8, 2002.

CAMPOS, D. F. D. et al. The stiffness and structure of three-dimensional printed hydrogels direct the differentiation of mesenchymal stromal cells toward adipogenic and osteogenic lineages. **Tissue Engineering - Part A**, v. 21, n. 3–4, p. 740–756, fev. 2015.

CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2886–2895, nov. 2007.

CHEN, N. et al. Hydrogel Bioink with Multilayered Interfaces Improves Dispersibility of Encapsulated Cells in Extrusion Bioprinting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 34, p. 30585–30595, ago. 2019.

CHEN, X. et al. Preparation and application of acellular scaffold in tissue engineering and regenerative medicine. **Chinese Journal of Tissue Engineering Research**, v. 26, n. 4, p. 591, 8 fev. 2022.

CHOUDHURY, D. et al. **Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing?** *Trends in Biotechnology* Elsevier Ltd, , ago. 2018.

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

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204–2213, jun. 2006.

DAAMEN, W. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 28, n. 30, p. 4378–4398, out. 2007.

DAS, S. et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs. **Acta Biomaterialia**, 2015.

DAVIGNON, J. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23\_suppl\_1, p. III-27- III–32, jun. 2004.

DEBBI, L. et al. Integrating engineered macro vessels with self-assembled capillaries in 3D implantable tissue for promoting vascular integration in-vivo. **Biomaterials**, v. 280, p. 121286, 1 jan. 2022.

DERUBEIS, A. R.; CANCEDDA, R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: Limitations and recent advances. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 160–165, jan. 2004.

DEUS, K. G. DE. **Estudo randomizado de dois tipos de incisão para safenectomia em pacientes submetidos a revascularização miocárdica.** [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

DOHMANN, H. F. R. et al. Bone-marrow mononuclear cell therapy of severe ischemic heart failure. **Comptes rendus biologiques**, v. 330, n. 6–7, p. 543–549, jun. 2007.

DUAN, B. et al. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 5, p. 1836–1846, 2014.

DUAN, Y. et al. Bioink derived from human placenta supporting angiogenesis. **Biomedical Materials**, v. 17, n. 5, p. 055009, 4 ago. 2022.

DYCE, K.; WENSING, C.; W, SACK. **Veterinary Anatomy.** 4<sup>a</sup> ed. [s.l.] Saunders Elsevier, 2010.

FACCIOTTI, P. R. **Influência da idade gestacional sobre as taxas de proliferação e apoptose placentária em bovinos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

FRANÇA, L. H. G.; PEREIRA, A. H. **Update on vascular endoprostheses (stents): From experimental studies to clinical practice.** *Jornal Vasculare Brasileiro* Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculare, 2008.

FRATINI, P. et al. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. **Research in veterinary science**, v. 104, p. 71–76, 1 fev. 2016.

FRATINI, P. et al. Canine Placenta Recellularized Using Yolk Sac Cells with Vascular Endothelial Growth Factor. **BioResearch Open Access**, v. 7, n. 1, 2018.

GILBERT, T.; SELLARO, T.; BADYLAK, S. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–83, mar. 2006.

GROGAN, S. P. et al. Cartilage tissue engineering combining microspheroid building blocks and microneedle arrays. **Connective Tissue Research**, p. 1–15, maio 2019.

GROLL, J. et al. A definition of biinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, 2019.

GUILLEMOT, F.; MIRONOV, V.; NAKAMURA, M. **Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09).** Biofabrication. **Anais...**Institute of Physics Publishing, 2010.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

HOPPER, R. A.; WOODHOUSE, K.; SEMPLE, J. L. Acellularization of Human Placenta With Preservation of the Basement Membrane. **Annals of Plastic Surgery**, v. 51, n. 6, p. 598–602, 2003.

IKADA, Y. **Tissue Engineering: Fundamentals and Applications.** [s.l.] Academic Press, 2006.

IMADA, B. C.; CHEN, S. R. Regional Vascular Anatomy. **Vascular Complications of Surgery and Intervention**, p. 3–35, 2022.

INSUASTI-CRUZ, E. et al. Natural Biomaterials from Biodiversity for Healthcare Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 11, n. 1, p. 2101389, 1 jan. 2022.

IRVINE, S. A.; VENKATRAMAN, S. S. **Bioprinting and differentiation of stem cells**. **Molecules** MDPI AG, , set. 2016.

JANG, J. et al. Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photo-crosslinking. **Acta Biomaterialia**, v. 33, p. 88–95, mar. 2016.

JIA, J. et al. Engineering alginate as bioink for bioprinting. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4323–4331, out. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KABIRIAN, F.; MOZAFARI, M. Decellularized ECM-derived bioinks: Prospects for the future. **Methods**, n. February, 2019.

KAKABADZE, A. et al. Anatomical Justification for the Use of Human Placenta as a Host for in Vivo Cell and Tissue Transplantation. **Asian Journal of Pharmacy, Nursing and Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 31–34, 2014.

KAKABADZE, A.; KAKABADZE, Z. Prospect of using decellularized human placenta and cow placentome for creation of new organs: targeting the liver (part I: anatomic study). **Transplantation proceedings**, v. 47, n. 4, p. 1222–7, 2015.

KAKABADZE, Z. et al. Decellularized bovine placentome for portacavally-interposed heterotopic liver transplantation in rats. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 97, p. 293, 1 abr. 2019.

KOLESKY, D. B. et al. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 12, p. 3179–3184, mar. 2016.

KONG, Z.; WANG, X. Bioprinting Technologies and Bioinks for Vascular Model Establishment. **International Journal of Molecular Sciences** 2023, Vol. 24, Page 891, v. 24, n. 1, p. 891, 3 jan. 2023.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

KUNA, V. K.; XU, B.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Decellularization and Recellularization Methodology for Human Saphenous Veins. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 2018, n. 137, 27 jul. 2018.

LAM, Y. T. et al. Bioengineering silk into blood vessels. **Biochemical Society Transactions**, v. 49, n. 5, p. 2271–2286, 1 nov. 2021.

LEE, J. et al. Bone-derived dECM/alginate bioink for fabricating a 3D cell-laden mesh structure for bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 250, p. 116914, dez. 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.

LEONEL, L. C. P. C. **Produção e caracterização de biomateriais acelulares bioativos obtidos a partir da decelularização de placentas**. [s.l.] Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, fev. 2016.

LI, C.; CUI, W. 3D bioprinting of cell-laden constructs for regenerative medicine. **Engineered Regeneration**, v. 2, p. 195–205, 1 jan. 2021.

LIN, N. Y. C. et al. Renal reabsorption in 3D vascularized proximal tubule models. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 12, p. 5399–5404, 2019.

LIU, P. et al. 3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 1026–1034, set. 2019.

LIU, Y. et al. hESCs-Derived Early Vascular Cell Spheroids for Cardiac Tissue Vascular Engineering and Myocardial Infarction Treatment. **Advanced Science**, p. 2104299, 29 jan. 2022.

LUO, Y.; ZHANG, T.; LIN, X. 3D printed hydrogel scaffolds with macro pores and interconnected microchannel networks for tissue engineering vascularization. **Chemical Engineering Journal**, v. 430, p. 132926, 15 fev. 2022.

MAAN, Z.; MASRI, N. Z.; WILLERTH, S. M. Smart Bioinks for the Printing of Human Tissue Models. **Biomolecules 2022, Vol. 12, Page 141**, v. 12, n. 1, p. 141, 15 jan. 2022.

MALTA, D. C.; SILVA JR, J. B. DA. O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil e a definição das metas globais para o enfrentamento dessas doenças até 2025: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 1, p. 151–164, mar. 2013.

MAO, J. J. et al. Craniofacial Tissue Engineering by Stem Cells. **Journal of dental research**, v. 85, n. 11, p. 966, nov. 2006.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; BEYER NARDI, N. **Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. Stem Cells and Development** Mary Ann Liebert Inc., , abr. 2015.

METHACRYLATED, D. et al. Methacrylated Cartilage ECM-Based Hydrogels as Injectables and Bioinks for Cartilage Tissue Engineering. **Biomolecules 2022, Vol. 12, Page 216**, v. 12, n. 2, p. 216, 27 jan. 2022.

MIGUEL, S. P. et al. Production and characterization of a novel asymmetric 3D printed construct aimed for skin tissue regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 994–1003, set. 2019.

MITHIEUX, S. M.; WEISS, A. S. Elastin. **Advances in protein chemistry**, v. 70, p. 437–61, 2005.

MOORE, M. J. et al. Bioengineering artificial blood vessels from natural materials. **Trends in Biotechnology**, 6 dez. 2021.

NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4, p. 300–311, 2011a.



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. 2011b.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

OH, K. J. et al. Co-culture of smooth muscle cells and endothelial cells on three-dimensional bioprinted polycaprolactone scaffolds for cavernosal tissue engineering. **Aging Male**, 2019.

OLAUSSON, M. et al. In vivo application of tissue-engineered veins using autologous peripheral whole blood: A proof of concept study. **EBioMedicine**, v. 1, n. 1, p. 72–79, 2014.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, v. 39, n. 5, p. 225–235, 1992.

OLIVEIRA, C. S. et al. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2018.

OLIVEIRA, N. A. et al. Bioimpressão e produção de mini-órgãos com células tronco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 9, p. 1032–1039, 1 set. 2017.

PAROLINI, O. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 2, p. 300–11, fev. 2008.

PATI, F. et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–11, 2014a.

PERA, M. F.; TROUNSON, A. O. **Human embryonic stem cells: Prospects for development**. **Development**, nov. 2004.

RIBEIRO, A. A. C. M.; MIGLINO, M. A. O funículo umbilical em bovinos azebuados. **Braz. J. vet. Res. anim. Sei**, v. 34, n. 5, p. 266–269, 1997.

RIBEIRO, A. A. C. M.; MIGLINO, M. A. ; DIDIO, L. J. A. Pesquisa anatômica sobre o funículo umbilical em bovinos azebuados. **Braz. J. vet. Res. anim. Sei**, v. 34, n. 6, p. 321–326, 1997.

SCARRITT, M. E. et al. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. MAR, p. 1–17, 2015.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal reproduction science**, v. 60–61, p. 145–60, 2 jul. 2000.

SHAKER, A.; RUBIN, D. C. **Intestinal stem cells and epithelial-mesenchymal interactions in the crypt and stem cell niche**. Translational Research Mosby Inc., , 2010.

SOLIS, D. M.; CZEKANSKI, A. 3D and 4D additive manufacturing techniques for vascular-like structures – A review. **Bioprinting**, v. 25, p. e00182, 1 mar. 2022.

SPENCER, A. R. et al. Bioprinting of a Cell-Laden Conductive Hydrogel Composite. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 34, p. 30518–30533, ago. 2019.

STURION, T. T. et al. Ultrasound evaluation of extra- and intra-abdominal umbilical structures involution in healthy Nelore calves products of natural conception or in vitro fertilization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1021–1032, 2013.

TAO, M. et al. Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 9, p. 2927, 1 set. 2021.

TONG, W. Y. et al. Functional replication of the tendon tissue microenvironment by a bioimprinted substrate and the support of tenocytic differentiation of mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 31, p. 7686–7698, 2012.

URTAZA, U. ; ; et al. A Study of the Printability of Alginate-Based Bioinks by 3D Bioprinting for Articular Cartilage Tissue Engineering. **Polymers** **2022**, Vol. **14**, Page **354**, v. 14, n. 2, p. 354, 17 jan. 2022.

VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. **Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology** Appl Biochem Biotechnol, , jun. 2005.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. **Physiological Reviews**, 2009.

WANG, X. et al. Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 1, p. 83–90, jan. 2006.

WEISSENBRUCH, K. et al. Micro-scaffolds as synthetic cell niches: recent advances and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 73, p. 290–299, 1 fev. 2022.

WHO. **Global status report on non communicable diseases 2010**. Genova: [s.n.]. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 5 abr. 2023.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897–5909, 2009.

WYSTRYCHOWSKI, W. et al. First human use of an allogeneic tissue-engineered vascular graft for hemodialysis access. **Journal of Vascular Surgery**, v. 60, n. 5, p. 1353–1357, 2014.

XIANG, Y. et al. 3D bioprinting of complex tissues in vitro: state-of-the-art and future perspectives. **Archives of Toxicology** **2022**, v. 1, p. 1–20, 10 jan. 2022.

YADID, M. et al. Bioengineering approaches to treat the failing heart: from cell biology to 3D printing. **Nature Reviews Cardiology** **2021** **19:2**, v. 19, n. 2, p. 83–99, 27 ago. 2021.

ZARAGOZA, C. et al. Animal models of cardiovascular diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 13, 2011.

ZHANG, W. J. et al. Tissue engineering of blood vessel. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2007.

ZHANG, X. et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 10, p. 15–31, 1 abr. 2022.

ZHANG, Y. et al. In vitro study of directly bioprinted perfusable vasculature conduits. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 1, p. 134–143, jan. 2015.

## ANEXO A – Carta de aceite do artigo I

07/04/2023, 14:49

ScholarOne Manuscripts

### Arquivos Brasileiros de Cardiologia

#### Carta de decisão (ABC-2022-0816.R1)

**De:** rochitte@cardiol.br

**Para:** rodrigobarreto@usp.br

**CC:**

**Assunto:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia - Decision on Manuscript ID/Decisão sobre ID do Manuscrito ABC-2022-0816.R1

**Corpo:** Dear Dr. Barreto:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "DECELLULARIZED VASCULAR SCAFFOLDS DERIVED FROM BOVINE PLACENTA BLOOD VESSELS" in its current form for publication in the Arquivos Brasileiros de Cardiologia. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

Send the following forms below completed and signed to revista@cardiol.br and inform the Manuscript ID:

Transfer of Author's Copyright  
Statement of Potential Conflict of Interest  
Author Contribution  
Statement of Informed Consent and Statement of Human and Animal Rights

All forms can be accessed at <https://abccardiologia.org/en/publication-forms/>

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Arquivos Brasileiros de Cardiologia, we look forward to your continued contributions to the journal.

Sincerely,  
Dr. Carlos Rochitte  
Editor-in-Chief  
rochitte@cardiol.br  
Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Associate Editor  
Comments to the Author:  
(There are no comments.)

Entire Scoresheet:

Prezado(a) Dr. Barreto:

É uma satisfação aceitar seu manuscrito intitulado "DECELLULARIZED VASCULAR SCAFFOLDS DERIVED FROM BOVINE PLACENTA BLOOD VESSELS" na sua forma atual para publicação nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Os comentários dos avaliadores que revisaram seu manuscrito estão ao fim desta carta.

Envie os seguintes formulários abaixo preenchidos e assinados para revista@cardiol.br, informando o ID do Manuscrito:

Transferência de Direitos Autorais  
Conflito de interesses  
Contribuição dos Autores  
Consentimento Livre e Esclarecido e Declaração de Direitos Humanos e Animais

Todos os formulários podem ser acessados em <https://abccardiologia.org/formularios-para-publicacao/>

Obrigado por sua excelente contribuição. Em nome dos editores dos Arquivos Brasileiros de Cardiologia, aguardamos suas novas contribuições para o periódico.

Atenciosamente,  
Dr. Carlos Rochitte  
Editor-Chefe  
rochitte@cardiol.br  
Arquivos Brasileiros de Cardiologia

Associate Editor  
Comments to the Author:  
(There are no comments.)