



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA THAIS SILVA SECONDO

**AVALIAÇÃO DE BIOINTEGRAÇÃO E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA A VASOS SANGUÍNEOS
PRODUZIDOS POR ENGENHARIA DE TECIDOS –
MODELO EXPERIMENTAL EM COELHO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título
de Mestra em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Coorientador: Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

**Botucatu
2021**

Mariana Thais Silva Secondo

Avaliação de biointegração e resposta inflamatória a vasos sanguíneos produzidos por engenharia de tecidos – Modelo experimental em coelho.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Cirurgia e Medicina Translacional

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Coorientador: Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE -CRB 8/5651

Secondo, Mariana Thais Silva.
Avaliação de biointegração e resposta inflamatória a vasos
sanguíneos produzidos por engenharia de tecidos : modelo experimental
em coelho / Mariana Thais Silva Secondo. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Matheus Bertanha
Coorientador: Marccone Lima Sobreira
Capes: 40102041

1. Doença arterial periférica. 2. Engenharia de tecidos.
3. Células-tronco Mesenquimais. 4. Endotélio. 5. Modelo experimental
em coelho. 6. Inflamação.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Doença arterial
periférica; Endotélio; Engenharia de tecidos; Resposta Inflamatória.

Mariana Thais Silva Secondo

Avaliação de biointegração e resposta inflamatória a vasos sanguíneos produzidos por engenharia de tecidos – Modelo experimental em coelho

Dissertação, apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para exame de qualificação para defesa da obtenção do título de Mestra em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Matheus Bertanha

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Vascular
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Prof. Dr. Diego Noé Rodríguez Sánchez
Departamento. Clínica Veterinária / FMVZ/Botucatu – Unesp

Prof. Dr. Rodrigo Gibin Jaldin
Departamento de Cirurgia e Ortopedia – Vascular
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Botucatu, 01 de Setembro de 2021

Para meus pais e para meu filho Lucas

AGRADECIMENTOS

À Lenize, agradeço por todo auxílio em todas as etapas deste trabalho, desde a coleta de dados, até a elaboração final desta dissertação.

Aos amigos da cirurgia vascular (professores e residentes), agradeço pelo total incentivo.

Ao meu professor Dr. Matheus Bertanha, agradeço pela confiança, pela generosidade em dividir seu conhecimento, pela paciência e, acima de tudo, por fomentar a pesquisa científica.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

Secondo, M. T. Avaliação de biointegração e resposta inflamatória a vasos sanguíneos produzidos por engenharia de tecidos – Modelo experimental em coelho. Botucatu, 2021. 34p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Introdução: Na prática cirúrgica cardiovascular é bem estabelecido que, para determinadas situações, o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica requer a realização de *by-pass*. Usam-se preferencialmente como substitutos vasculares veias autólogas ou próteses sintéticas. No entanto, nem todos os pacientes possuem veias autólogas passíveis de se utilizar como substituto vascular e nem todas as pontes arteriais têm patência satisfatória quando confeccionadas com próteses. Assim, na limitação do uso de próteses ou veias autólogas, a engenharia de tecidos com a produção de neovasos pode ser uma opção promissora. Estudos têm demonstrado ser possível a diferenciação *in vitro* de células tronco adultas em tecidos da parede vascular, como endotélio e músculo liso. Estudos experimentais prévios também demonstraram que as veias cava de coelho podem ser descelularizadas e servem como arcabouço para receber células tronco mesenquimais (CTMs), com posterior diferenciação em células endoteliais *in vitro*. **Objetivo:** Produzir uma estrutura 3D utilizando arcabouços de veia cava inferior de coelho descelularizada com o repovoamento celular a partir de CTMs obtidas de tecido adiposo; testar sua interação com o organismo receptor e avaliar a indução da resposta inflamatória. **Métodos:** Trata-se de um trabalho experimental realizado em 6 etapas descritas a seguir: obtenção de veias cava de coelho para produção de arcabouço; obtenção, expansão e caracterização das CTMs derivadas de tecido adiposo; preparação do arcabouço para implante (autólogo e alogênico); experimento *in vivo*, com implante no dorso de 12 coelhos de veias cava alogênicas *in natura* (n=3), de veias cava descelularizadas (n=3), de veias cava descelularizadas + CTM alogênicas (n=3) e de veias cava descelularizadas + CTM autólogas (n=3); obtenção de amostras de sangue para análise da resposta inflamatória aos implantes; avaliação histomorfológica dos implantes após 60 dias da implantação e análise da resposta inflamatória diretamente no macerado dos explantes. **Resultados:** Os dados da análise das interleucinas (ILs) séricas não revelaram diferenças estatísticas entre os grupos. Já os dados da análise das ILs do homogenato do tecido congelado do explante permitiram concluir que, através da dosagem de fator de necrose tumoral alfa (TNF α), o implante da veia descelularizada apresentou a maior reação inflamatória, enquanto que, através da dosagem de IL-10, o grupo veia descelularizada + CTM autóloga apresentou menor atividade pró-inflamatória. Quanto a avaliação histomorfológica dos implantes coletados após 60 dias, observou-se alta taxa de endotelização, com boa evolução tecidual associada a notável taxa de celularidade, sendo que o grupo veia descelularizada + CTM autóloga foi o que apresentou menor reação inflamatória dentre os grupos analisados. A análise em microscopia de fluorescência revelou a presença das CTM nos explantes. **Conclusão:** O uso de CTM autóloga no arcabouço de veia cava inferior descelularizada foi o protocolo que apresentou maior organização celular, melhor diferenciação e menor resposta inflamatória do hospedeiro.

Palavras-chave: Doença Arterial Periférica, Engenharia de Tecidos, Endotélio, Células Tronco Mesenquimais, Inflamação, Diferenciação Celular.

Secondo, M. T. Evaluation of biointegration and inflammatory response to blood vessels produced by tissue engineering - experimental model in rabbit. Botucatu, 2021. 34p. Dissertation (Master's Degree) - Botucatu School of Medicine, UNESP Paulista State University "Julio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Background: Cardiovascular surgical practice is well established that, for certain conditions, the treatment of atherosclerotic obstructive disease requires a bypass. Autologous veins or Dacron or PTFE prostheses are preferably used as vascular substitutes. However, not all patients have autologous veins that can be used as a vascular substitute, and not all arterial bridges have satisfactory patency when made with prostheses. Thus, in limiting the use of prostheses or autologous veins, tissue engineering with the production of new vessels may be a promising option. Studies have made possible the in vitro differentiation of adult stem cells into vascular wall tissues, such as endothelium and smooth muscle. Previous experimental studies have also shown that rabbit vena cava can be decellularized and serve as a scaffold to receive mesenchymal stem cells (mesenchymal stem cells - MSC), with subsequent differentiation into endothelial cells in vitro. **Objective:** To produce a 3D structure using decellularized rabbit inferior vena cava scaffolds with cell repopulation from adipose tissue basic MSC; test its interaction with the recipient organism and assess the induction of the inflammatory response. **Methods:** This is an experimental work carried out in 6 previous stages, as follows: presentation of rabbit vena cava for the production of a framework; expansion, expansion, and characterization of adipose tissue-derived MSCs; preparation of the implant framework (autologous and allogeneic); in vivo experiment, with an implant in the back of 12 rabbits of allogeneic in natura vena cava (n = 3), decellularized vena cava (n = 3), decellularized vena cava + allogeneic MSC (n = 3) and decellularized vena cava + Autologous MSC (n = 3); blood decanter for analyzing the inflammatory response to implants; histomorphological evaluation of the implants 60 days after implantation and analysis of the inflammatory response directly in the explant macerate. **Results:** Data from the analysis of serum interleukins (ILs) did not reveal statistical differences between groups. The data from the analysis of ILs from the frozen tissue homogenate of the explant allow that, through the dosage of tumor necrosis factor-alpha (TNF α), the implant of the decellularized vein presents the greatest inflammatory reaction, while, through IL-10, the decellularized vein + autologous MSC group presented less pro-inflammatory activity. As for the histomorphological evaluation of the implants collected after 60 days, a high rate of endothelialization was observed, with good tissue evolution associated with the cellularity rate, and the decellularized vein + autologous MSC group had the lowest inflammatory reaction of the groups. An analysis under fluorescence microscopy revealed the presence of MSC in the explants. **Conclusion:** The use of autologous MSC in the decellularized inferior vena cava framework was the protocol that presented greater cellular organization, better differentiation, and lesser inflammatory response of the host.

Keywords: Peripheral Arterial Disease, Tissue Engineering, Endothelium, Mesenchymal Stem Cells, Inflammatory Response, Cell Differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotomicrografia de Veia Cava Inferior de coelho descelularizada com SDS 1% 2h em HE, aumento de 20X. _____	28
Figura 2: Implante de arcabouço de veia cava inferior descelularizada com SDS + MSC autóloga (seta). _____	29
Figura 3: Crescimento com confluência de 95% em passagem celular em 2º estágio _____	29
Figura 4: Perfil fenotípico das CTM, com marcadores CD90/45, CD106/11B e CD 71/31 pela técnica de citometria de fluxo. _____	30
Figura 5: Procedimento de retirada do implante de arcabouço. _____	31
Figura 6: Fragmentos do estudo que foram congelados (um fragmento para cada animal - n = 12) e enviados para análise por congelação, imunofluorescência e dosagem de ILs de macerado. _____	31
Figura 7: Amostras de plasma coletadas de todos os animais nos momentos pré-operatório, 1, 7, 14, 30, 60 dias, mantidas congeladas até a dosagem de ILs de interesse. _____	32
Figura 8: Fotomicrografias HE - Microscopia óptica dos explantes de arcabouços implantados após 60 dias. _____	34
Figura 9: Análise em microscopia de fluorescência. A: Grupo 3, B: Grupo 4, apresentando sinais de marcação celular (MSC) com Qtracker (fluorescência vermelha em nanocristais depositados no citoplasma). _____	34
Figura 10: Análise de lâmina de imunohistoquímica em microscopia óptica com anticorpo marcador de endotélio CD31. A: Grupo 1; B: Grupo 2; C: Grupo 3; D: Grupo 4. _____	35
Figura 11: Fotomicrografias de Imunofluorescência em tecido congelado. A: Veias descelularizadas com CTM alogênicas: núcleos celulares em azul (DAPI) e, em vermelho, citoplasma das CTM marcadas com Qtracker; B: Veias descelularizadas com CTM autólogas: núcleos celulares em azul (DAPI) e, em vermelho, citoplasma das CTM marcadas com Qtracker (setas apontam para células marcadas) _____	36
Figura 12. Fotomicrografias de Imunofluorescência em tecido congelado. A: Veias descelularizadas com CTM alogênicas: núcleos celulares em azul (DAPI); em vermelho, citoplasma das CTM marcadas no tecido (Qtracker); em verde, membrana citoplasmática marcada com anti-CD31 e FITC; B: Veias descelularizadas com CTM autólogas: núcleos celulares em azul (DAPI); em vermelho, citoplasma das CTM marcadas no tecido (Qtracker); em verde, membrana citoplasmática marcada com anti-CD31 (FITC) (setas apontam para células marcadas). _____	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias do plasma por ELISA. __ 32

Tabela 2: Análise das interleucinas do homogenato. _ _ _ _ _ 33

Tabela 3: Tabela com a dosagem de malonaldeído sérico para cada grupo, em cada etapa do experimento (pré opratório, 1, 7, 14, 30 e 60 dias pós implante) _ _ _ _ _ 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos
CTM	Célula tronco mesenquimal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DS	Deoxicolato de sódio
CO2	Dióxido de carbono
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
SDS	Duodecil sulfato de sódio
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
HE	Hematoxilina eosina
IV	Intravenoso
LCC	Laboratório de cultura celular
MDA	Malonaldeído
MC	Meio de cultura
PTFE	Politetrafluoretileno
PVP-I	Polivinilpirrolidona-iodo
SFB	Soro fetal bovino
PBS	Tampão fosfato salino
VCI	Veia cava inferior

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Células-Tronco Mesenquimais	16
1.2 Engenharia Celular e Neoangiogênese	17
1.3 Produção de arcabouço por descelularização de veias	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Ética.....	21
3.2 Grupos experimentais	21
3.3 Animais e condições de alojamento	21
3.4 Obtenção das VCI para produção de arcabouços venosos e tecido adiposo para CTM	21
3.5 Aplicação de CTMs em andaimes de veias descelularizadas	24
3.6 Implantes das VCI e dos arcabouços celularizados ou não – modelo animal <i>in vivo</i>	25
3.7 Obtenção das amostras de sangue para análise de interleucinas e estresse oxidativo	26
3.8 Avaliação histomorfológica	26
3.9 Análise estatística	27
4. RESULTADOS.....	27
4.1 Obtenção de veias cava de coelho para produção dos arcabouços	27
4.2 Obtenção, expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo.	29
4.3 Implantes das VCI e dos arcabouços celularizados ou não – modelo animal <i>in vivo</i>	31
4.4 Obtenção das amostras de sangue para análise de interleucinas	32
4.5 Avaliação histomorfológica	34
4.6 Estresse oxidativo pela análise de MDA em plasma.	37
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Na prática cirúrgica cardiovascular, é bem estabelecido que para determinadas situações o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica^{1,2} requer a realização de procedimento cirúrgico com a realização de enxertos arteriais. Basicamente, o substituto vascular ideal seria um vaso sanguíneo com as mesmas características da artéria que se deseja substituir.³ Naturalmente, isso não é possível na maior parte das vezes, sendo então utilizada como substituto vascular a veia safena magna autóloga, explantada no mesmo ato cirúrgico.^{4,5} Esse procedimento é considerado como o de melhor resultado em termos de patência para a cirurgia vascular periférica.²

Na impossibilidade de se utilizar veias autólogas, como, por exemplo, quando o paciente já foi submetido à safenectomia por insuficiência venosa, quando esta veia se apresenta varicosa ou quando a mesma apresenta calibre muito reduzido e inadequado, há uma limitação ao uso da veia.² Nesses casos, pode-se utilizar substitutos arteriais sintéticos como próteses de Dacron® ou politetrafluoretileno (PTFE), mas não de forma irrestrita, principalmente devido à possibilidade de ocorrência de infecções no sítio cirúrgico ou mesmo à distância.⁶ Quando se pretende revascularizar artérias de pequeno calibre como artérias da perna ou dos pés, entre outros, há limitação do uso de próteses pela diminuição do tempo de patência apresentada nessas situações, o que limita a capacidade de atuação do cirurgião.²

Resumidamente, o que o cirurgião vascular precisa realizar é uma ponte robusta com um substituto vascular adequado, desviando sangue de um ponto proximal da circulação arterial para um ponto distal com luz arterial pérvia, reestabelecendo o fluxo sanguíneo para os tecidos isquêmicos.⁷ Consequentemente, o procedimento deve reestabelecer a nutrição e suporte de oxigênio para os tecidos e evitar a evolução para amputação.⁷

1.1 Células-Tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em maior ou menor quantidade em todos os tecidos do organismo após a fase embrionária, sendo seu potencial de indiferenciação também variável para cada tecido. De forma geral, são mais facilmente obtidas dos tecidos onde são mais abundantes e indiferenciadas, como no sangue de cordão umbilical⁸, medula óssea⁹ e tecido adiposo.¹⁰

O tecido adiposo representa uma fonte de CTM com grande concentração celular, de fácil obtenção cirúrgica e praticamente isento de contraindicações para sua obtenção; contudo, a sua manipulação em laboratório não é idêntica.^{11,12} A fração do estroma vascular do tecido adiposo se tornou foco de investigações após a comprovação de que ele é capaz de fornecer CTMs multipotentes, apresentando assim vantagens potenciais para aplicação na engenharia de tecidos.^{8,13}

A maioria dos pesquisadores isolam as CTMs obtidas de tecido adiposo através da metodologia descrita por Rodbel, *et al* (1960)¹⁴, onde os tecidos são digeridos com colagenase e o fracionamento é feito por centrifugação. As células são colocadas em cultura e a população de CTM pode ser expandida.^{13,15}

A Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como CTM: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar CD73, CD90 e CD105, não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α e os antígenos leucocitários humanos (HLA-DR).¹⁶

O uso dessas células em Medicina Regenerativa implica o isolamento e a expansão sem a perda da capacidade de multipotência.¹⁷ Muitos estudos têm isolado as CTMs e têm controlado *in vitro* a sua diferenciação em diversos tecidos através de indução por fatores de

crescimento específicos, com o objetivo de reparar tecidos lesionados, o que pode representar uma alternativa terapêutica viável em determinadas situações clínicas.^{18, 19}

1.2 Engenharia Celular e Neoangiogênese

O cultivo de CTM e a descoberta de técnicas que promovem a sua diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a engenharia de tecidos.²⁰ As pesquisas com células-tronco avançam em territórios onde a medicina tradicional apresenta limitações, sendo conhecidos como fronteiras do conhecimento científico.¹³ Dessa forma, essas pesquisas podem contribuir em situações específicas para os portadores de doenças cardiovasculares.¹¹

A doença cardiovascular representa a maior causa de mortalidade da população adulta ocidental e estima-se que 5% da população com idade superior a 50 anos são portadores de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP).² Isso significa o acometimento da circulação arterial dos membros inferiores por obstruções ao fluxo sanguíneo em decorrência do processo degenerativo ou não degenerativas da parede arterial.²¹⁻²³ Sua apresentação se deve a associação com inúmeros fatores de risco, como idade avançada, diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, fatores genéticos e tabagismo.²¹ Essa patologia tem característica progressiva, causando limitações para a vida do doente, que, em um estado mais crítico, pode apresentar dor em repouso, gangrenas e perda de membros por amputações.²²

Aproximadamente 20 a 30% dos portadores de DAOP em estado avançado não serão candidatos ao tratamento cirúrgico restaurador por qualquer dos métodos existentes.² Em geral, isso se deve a gravidade da doença afetando a circulação arterial troncular com extensão até os vasos de pequeno calibre, além do possível comprometimento da microcirculação.²⁴ Nesses casos, a amputação acaba sendo o único tratamento possível.² Além disso, casos onde o tratamento preconizado não obteve resultado satisfatório ou não duradouro tornam-se os maiores desafios da cirurgia vascular atual. Para tanto, buscam-se novas técnicas e materiais

como substituto vascular ideal, principalmente para restaurar a circulação abaixo do joelho, que exige pontes longas e de fino calibre.²⁵

Durante o período embrionário, a formação dos vasos sanguíneos tem origem do mesoderma.²⁶ Inicialmente são formadas pequenas ilhotas de tecido endotelial totalmente isoladas, que se desenvolvem por mitose e aos poucos se fundem, dando início ao sistema vascular fechado.²⁶ As outras camadas da parede vascular são derivadas das células pouco diferenciadas do mesoderma, formando as camadas muscular e adventícia dos vasos.²⁶

Estudos têm demonstrado que é possível realizar *in vitro* a diferenciação das células-tronco adultas nos tecidos da parede vascular como o endotélio e o músculo liso;²⁷⁻³² nossa equipe comprovou que as veias cava de coelho (modelo experimental) podem ser descelularizadas, mantendo boa estruturação da matriz, estando aptas para servir de arcabouço e serem repovoadas com CTMs, inclusive sendo possível a sua diferenciação em endotélio.³³ Determinou-se também que o processo de descelularização da veia não acarreta toxicidade residual significativa ou perda das características essenciais da matriz extracelular.³⁴ Diante dos avanços obtidos, apresentamos a continuidade do modelo experimental que visa a completar o desenvolvimento do método de engenharia de tecidos em vasos sanguíneos e comprovar a segurança e eficácia da estrutura em modelo animal.

1.3 Produção de arcabouço por descelularização de veias

Tem-se utilizado suporte biológico derivado de tecido e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais e em alguns casos com aplicação clínica definida para produção de órgãos e tecidos.^{34, 35} A utilização desses arcabouços apresenta algumas vantagens biológicas; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso e que se garanta uma adequada eliminação dos componentes celulares para se evitar uma possível reação imunológica no momento de aplicação no receptor do novo tecido, além de outras contaminações.³⁶ Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro

e assim podem induzir uma resposta inflamatória ou uma rejeição imunomediada do tecido transplantado e, conseqüentemente, expor o indivíduo aos riscos da perda do enxerto, inclusive risco de óbito.³⁵

O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear, preservando a integridade estrutural e as propriedades mecânicas da matriz extracelular restante, sendo considerado um ambiente propício para o repovoamento celular.³¹ Além disso, durante o procedimento de descelularização, os agentes descelularizantes utilizados precisam ter um efeito residual mínimo, com a finalidade de não inibir o crescimento celular após a implantação da matriz no organismo.^{33,38} Os protocolos mais completos para um processo de descelularização incluem uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas, que podem ser reforçadas conforme as características biomecânicas do tecido que se pretende descelularizar.³⁴

Neste estudo, pretende-se dar continuidade a investigação do uso de arcabouço de veia cava inferior (VCI) de coelho descelularizada, com o protocolo elencado por esta equipe de estudo como mais seguro e eficaz de acordo com experimentos prévios, utilizando duodecil sulfato de sódio (SDS) para a preparação do arcabouço teste.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir estruturas em 3D utilizando arcabouços de VCIs submetidas a descelularização, repovoadas com CTMs e testadas quanto a interação e a resposta inflamatória após implantação subcutânea em coelhos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a interação tecidual do arcabouço *in vivo*;
 - Realizar a análise histomorfométrica do arcabouço implantado;
 - Avaliar a migração das CTMs marcadas com Qtracker;
 - Realizar a avaliação imunohistoquímica específica para identificação de células endoteliais no arcabouço implantado;
 - Analisar o perfil oxidativo provocado pelos arcabouços implantados, através da quantificação de malonaldeído (MDA) sérico;
 - Avaliar interleucinas (ILs) séricas e também no macerado do tecido implantado para testar a resposta inflamatória induzida pelo implante dos arcabouços.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ética

Este estudo foi realizado de acordo com as Diretrizes do National Institute of Health (NIH) para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH 2011), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais local (CEUA) com registro nº 1251/2017.

3.2 Grupos experimentais

Os implantes foram realizados sobre a fáscia muscular dorsal dos animais (não foi implantada na circulação). Foram constituídos 4 grupos em triplicata:

- Grupo 1: Recebeu implante de um fragmento de veia cava inferior alogênica *in natura* (n=3);
- Grupo 2: Recebeu implante de um fragmento de veia descelularizada com SDS sem adição de células (VD-SDS) (n=3);
- Grupo 3: Recebeu implante de um fragmento de veia descelularizada com SDS + 1×10^5 CTM alogênicas (VD-SDS+CTM alog.) (n=3);
- Grupo 4: Recebeu implante de um fragmento de veia descelularizada com SDS + 1×10^5 CTM autólogas (VD-SDS+CTM aut.) (n=3);

3.3 Animais e condições de alojamento

Foram utilizados 16 animais adultos com peso entre 2,5 e 3,5 kg, sendo que, um animal foi utilizado para obtenção de veia *in natura* alogênica imediatamente antes do implante. Os animais foram alojados em condições controladas e alimentados com uma dieta granulada padrão com água *ad libitum*.

3.4 Obtenção das VCI para produção de arcabouços venosos e tecido adiposo para CTM

Os procedimentos anestésicos foram assistidos por médico veterinário qualificado. Antes de iniciar a incisão cirúrgica para coleta de tecidos, os coelhos foram pré-medicados por via intramuscular com uma combinação de cetamina 10 mg / kg (Dopalen®, 100mg/mL,

Paulínia, SP, Brasil), cloridrato de xilazina 3 mg / kg (Anasedan® 2 %, 20 mg/mL, Paulínia, SP, Brasil) e acepromazina 0,1 mg / kg (Apromazin® 0,2%, 200 mg / mL, Barueri, SP, Brasil). Além disso, um anestésico tópico, Lidocaína 7mg / kg (Xilocaína 1% 20 mg / mL, Cristália, Butantã, SP, Brasil) foi administrado no local projetado para a incisão cirúrgica.

Para obtenção das veias, o abdômen do animal foi tricotomizado, sendo realizada a assepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-IRiodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e todo o procedimento seguiu rigorosa técnica cirúrgica, sob condições estéreis. As veias foram coletadas através de uma laparotomia xifopúbica e dissecação delicada da veia cava desde o seu segmento mais distal até a veia renal mais baixa. As veias tributárias foram isoladas e por fim, todas seccionadas sem ligadura para não comprometer os resultados da descelularização. Por fim, as veias foram lavadas interna e externamente com soro fisiológico 0,9% e heparina não fracionada 1000UI/100ml para retirada do máximo de sangue residual. Foram acondicionadas em tubo cônico estéril de 50ml contendo tampão fosfato salino (PBS) e transportadas para o laboratório de cultura celular (LCC). Todos os animais foram submetidos à eutanásia, após os procedimentos, com sobredose anestésica com Tiopental Sódico (90mg/kg IV - Thiopentax®, Cristália, Itapira, SP, Brasil).

Em câmara de fluxo laminar, ambiente estéril, as veias foram separadas em fragmentos de aproximadamente 2cm de comprimento, sendo 2 fragmentos para cada unidade de veia cava coletada (n = 14 fragmentos), que foram então descelularizadas, isto é, foi promovida a remoção das células e dos antígenos HLA-DR dos doadores. O protocolo de descelularização foi realizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% em agitação contínua por 2 horas (em Shaker *News Brunswick Scientific*® com temperatura controlada em 37°C).

Os fragmentos foram lavados com PBS cinco vezes e depois acondicionados e conservados em geladeira a 4°C em solução estéril contendo antibiótico (ciprofloxacina, 10mg/mL, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) e antifúngico (anfotericina B, 20mg/mL, Geolab,

Anápolis, GO, Brasil). O controle de qualidade da descelularização foi realizado em duas amostras aleatórias que foram submetidos ao processamento histológico e corado em HE para confirmação da inexistência de células viáveis no arcabouço.

Também foi coletado dos animais eutanasiados tecido adiposo para compor o banco de CTM alogênica a ser utilizado neste experimento. Para obtenção das CTMs autólogas, da mesma forma como foi realizada para os animais alogênicos, foi realizada incisão cutânea transversal interescapular de 1,5cm para dissecação e obtenção de 2g de tecido adiposo dessa região, sob condição estéril. Porém, para os animais que foram mantidos vivos, uma anestesia local de segurança foi realizada com a infusão local de 1mL de Lidocaína 1% sem vasoconstrictor (Xylestesin® - Cristália, Itapira, SP, Brasil) no local da incisão na região dorsal interescapular do animal. A ferida foi suturada com pontos simples (Nylon 4-0, New Jersey, EUA).

As amostras de tecido adiposo foram identificadas e encaminhadas ao LCC onde foram processadas de acordo com o protocolo de digestão enzimática.¹⁸⁻²⁰ Resumidamente, foi adicionada uma solução de collagenase tipo I (Collagenase, Type I - Invitrogen™, Grand Island, NE, EUA) na proporção de 4mg por grama de tecido adiposo, que foi preparada em 2mL de tampão químico orgânico ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico (HEPES - Thermo Fisher Scientifica™ Gibco, Grand Island, NY, EUA). O tecido adiposo foi incubado nessa solução por 15 horas à 37°C para completar o processo de digestão enzimática, em ambiente de estufa com jaqueta de água, com 5% de dióxido de carbono (CO₂) (Thermo Class 100®). Após este período, a collagenase foi neutralizada com soro fetal bovino (SFB - Gibco, Thermo-Fisher, Waltham, MA, EUA). O *pellet* obtido (contendo as CTMs) foi ressuspensionado em meio HEPES enriquecido com SFB e procedida nova centrifugação. O novo *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) Gibco, Thermo-Fisher, Waltham, MA, EUA) retirando-se alíquota de 30µL para contagem

celular em câmara de Neubauer (verificação da viabilidade celular e estimativa do número total de células). As células obtidas foram plaqueadas em frascos de cultura de 25cm² (Nunc®). O meio de cultura foi o DMEM contendo antibiótico (Ciprofloxacina, 10mg/ml, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) e antifúngico (Anfotericina B, 20mg/mL, Geolab, Anápolis, GO, Brasil). Os frascos foram mantidos em estufa à 37°C, com 5% de CO₂ (Thermo Class 100®). O meio de cultura foi trocado a cada 48h. Através de monitoramento por microscopia invertida (microscópio Axiovert 200®, Zeiss™) observou-se confluência superior a 80% da área da placa, sendo então este o momento de realizar a replicação do número de frascos (primeira passagem), removendo as CTMs com de tripsina/1mm a 0,25% + EDTA (Invitrogen™), novamente realizada contagem de controle em câmara de Neubauer e posterior semeadura em frascos de 75cm² (NunCTM). Isso se repetiu até a terceira passagem.

A caracterização fenotípica foi realizada por citometria de fluxo em parceria com o laboratório de citometria de fluxo do Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA do Hospital das Clínicas da FMB) através da análise de uma amostra de segunda passagem de CTM que foi ressuspensa em Isoton na proporção de 1x10⁵ células/100µL. Foram analisados os marcadores de superfície positivos para CD71, CD90 e CD106, e negativos para CD31, CD45 e CD11b (todos da BD Biosciences™, San Jose, CA, EUA). Os resultados negativos foram considerados consistentes quando inferiores a 5% e positivos quando superiores a 50%. As características multipotentes foram confirmadas pela capacidade de diferenciação em tri-linhagem. Para induzir a diferenciação mesodérmica tri-linhagem, kits de diferenciação de adipogênese, condrogênese e osteogênese específicos foram usados de acordo com as instruções do fabricante (kits StemPro®, Gibco™, Invitrogen, Grand Island, NE, EUA).

3.5 Aplicação de CTMs em andaimes de veias descelularizadas

As CTMs foram expandidas até 3ª passagem e então utilizadas nos experimentos. Inicialmente, as CTMs foram submetidas ao processo de marcação citoplasmática com

Qtracker, que é um agente fluorescente vermelho em forma de nanocristais que são opsonizados para o citoplasma. Resumidamente, as células foram incubadas com nanomarcadores cristais Qtracker 565 (CellLabeling Kits – Invitrogen™) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante para células em suspensão, onde, para obtermos uma dosagem de 10 nM de Qdots, acrescentou-se 1 microlitro da solução A e 1 microlitro da solução B do kit Qtracker, para cada um milhão de células a serem marcadas. A solução resultante, após 5 minutos a temperatura ambiente (25°C), foi acrescida de 200 microlitros de meio DMEM e então colocada 30 segundos no vórtex, para agitação e homogeneização dos componentes. Esta solução foi depositada sobre o pellet celular previamente obtido das culturas celulares e mantidos em ambiente de estufa de CO₂ 5% a 37°C por um período de 45 minutos, protegido da luminosidade. As células foram lavadas por duas vezes em meio DMEM e estavam prontas para uso.

A semeadura das células no arcabouço foi realizada com 10µL de uma solução contendo Puramatrix® + Glucose 5% (meio a meio) e 1×10^5 CTM neste volume, utilizando-se a ponteira da pipeta para depositar a solução contendo as células para a luz da veia (face luminal). Em seguida, a gelificação do Puramatrix foi induzida pela adição de 100µL de meio de cultura sobre o arcabouço e este foi mantido em um poço de uma placa de cultura não aderente (ultra-low attachment surface plates - Corning®, 24 poços) por 30 min. Um mL de meio de cultura foi adicionado e a placa foi mantida por duas horas em ambiente estufa com jaqueta de água a 5% de dióxido de carbono (CO₂) (Thermo Class 100®) à 37°C para pré-aderência celular. Após esse período de pré-aderência, os fragmentos foram transportados para a realização dos implantes.

3.6 Implantes das VCI e dos arcabouços celularizados ou não – modelo animal *in vivo*

Para a implantação dos arcabouços, os animais foram anestesiados como descrito previamente, seguindo-se rigorosa técnica asséptica. Uma pequena incisão longitudinal de 2cm de comprimento foi realizada na região dorsal torácica do animal, com dissecação até o limite

da fáscia mais superficial do músculo grande dorsal, onde os fragmentos do estudo foram fixados (apenas um fragmento por animal) com um ponto simples de NYLON 4-0 (Ethicon®, Somerville, NJ, USA) por tratar-se de um material não absorvível, para identificação no momento do explante, em cada extremidade do implante. Os animais foram monitorados diariamente e coletas de amostras de sangue foram realizadas conforme o cronograma do estudo, o que será melhor explicado a seguir. Os animais foram mantidos em alojamento específico, conforme descrito previamente e, após o período de observação de 60 dias, os animais foram eutanasiados, conforme descrito previamente. Os fragmentos foram coletados cirurgicamente para posteriores análises histomorfológicas.

3.7 Obtenção das amostras de sangue para análise de interleucinas e estresse oxidativo

Foi coletado 1,5mL de sangue periférico através da punção da veia marginal dorsal da orelha nos tempos pré-operatório, 1, 7, 14, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico de cada animal (12 animais). Cada amostra foi encaminhada para o LCC onde foram centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos para obtenção do plasma; em seguida as amostras foram mantidas congeladas em freezer -80°C até o momento da realização das dosagens das interleucinas inflamatórias (IL6, TNF- α) e antiinflamatórias (IL-4, IL10) por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), além da realização de análises para detecção do estresse oxidativo pelo método de reação do malonaldeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico (TBARS),³⁷ no laboratório de estresse oxidativo da UNIPEX.

3.8 Avaliação histomorfológica

Os fragmentos coletados (60 dias após o implante) foram seccionados em duas partes iguais, sendo uma colocada em formaldeído tamponado a 10% para confecção de blocos parafinizados e a outra parte mantida congelada para realização de corte a fresco para

identificação das CTMs marcadas com Qtracker (vermelho) em microscópio de fluorescência, além de ser macerada posteriormente para dosagem de ILs teciduais.

Dos blocos parafinizados, foram confeccionadas lâminas para histologia padrão hematoxilina e eosina (HE) e para imunohistoquímica com análise de marcador primário anti-CD31 diluído em 1 para 10 (Novus Biologicals™, Englewood, CO, EUA) para identificação das células endoteliais.

As lâminas confeccionadas com material a fresco foram destinadas para análise dos núcleos celulares em imunofluorescência com selante *fluoroshield* com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma™, Cotia, SP, Brasil), bem como para confecção de lâminas distintas com marcações com anti-CD31 com FITC.

3.9 Análise estatística

A comparação entre médias nos momentos foi feita utilizando um delineamento por medidas repetidas com o objetivo de avaliar a interação grupo versus momentos. Nos casos em que os dados apresentavam distribuição simétrica, foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ajustado ao delineamento. Nos casos onde a distribuição apresentou-se assimétrica, um ajuste em distribuição gama foi realizado para o mesmo delineamento, seguido do teste de comparação múltipla de Wald. Em todos os testes foi fixado o nível de significância de 5%. Todas as análises foram feitas no programa SAS for Windows, v.9.4.

4. RESULTADOS

4.1 Obtenção de veias cava de coelho para produção dos arcabouços

As veias cava inferiores para descelularização foram obtidas de 7 coelhos. Estas foram descelularizadas com SDS 1% 2h conforme descrito previamente e foram mantidas em um banco de veias em geladeira a 4°C até o momento do experimento (2 semanas).

Foi realizado controle de qualidade do processo de descelularização com o exame em histologia por HE de amostras das veias cava descelularizadas, evidenciando-se completa eliminação das células do doador (Figura 1).

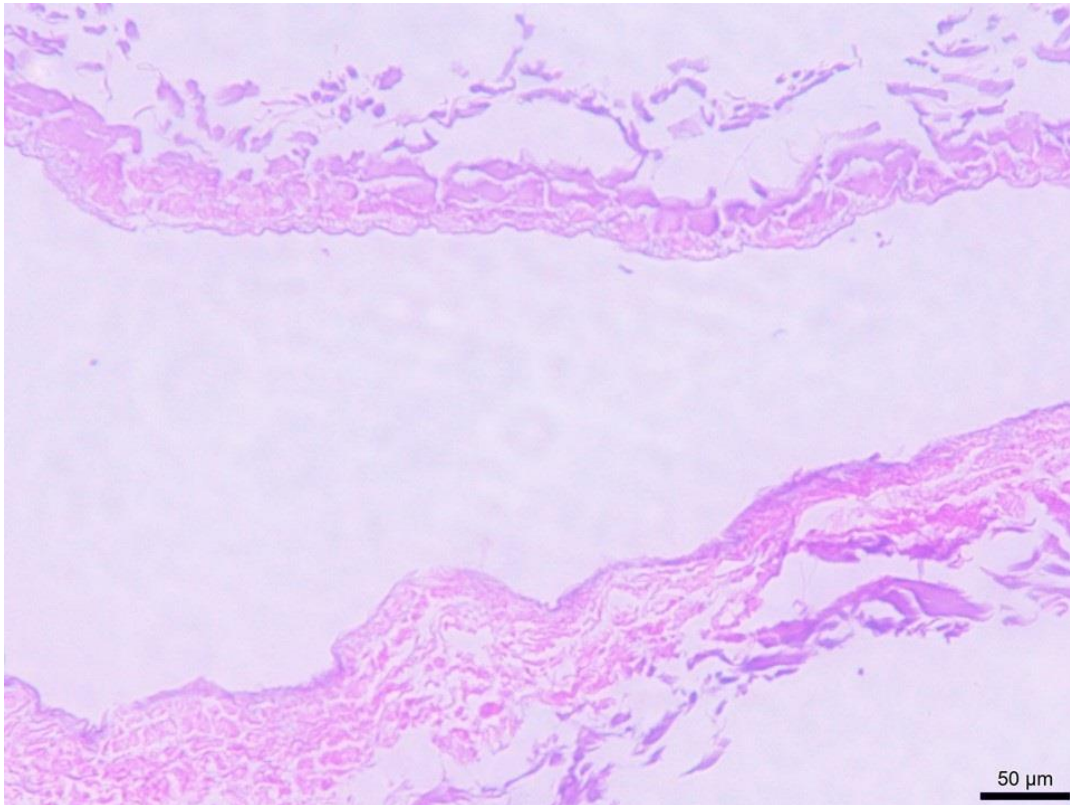


Figura 1. Fotomicrografia de Veia Cava Inferior de coelho descelularizada com SDS 1% 2h em HE, aumento de 200X. **Autor:** SECONDO, M. T. S. 2021

Para o grupo *in natura* (Grupo1), um animal foi eutanasiado no mesmo dia do experimento *in vivo* e a veia foi segmentada em 3 partes e implantada diretamente nos coelhos receptores deste grupo e coletadas após 60 dias (Figura 2).

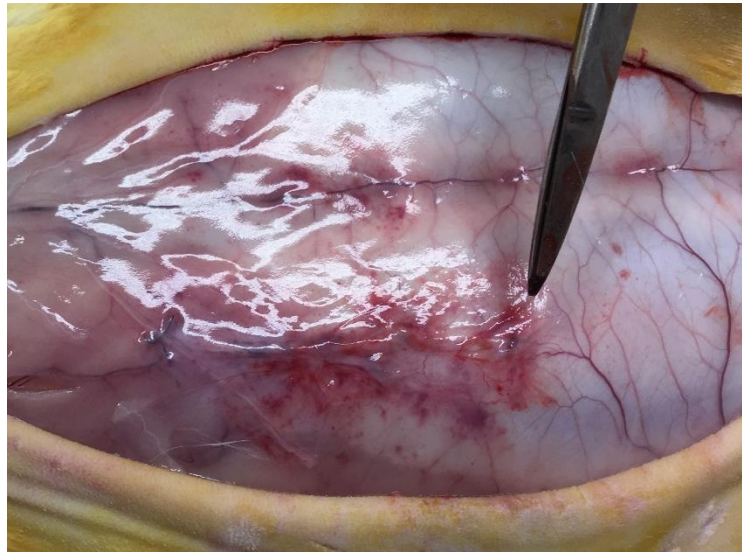


Figura 2. Implante de arcabouço de veia cava inferior descelularizada com SDS + CTM autóloga (seta). Os pontos de reparo são vistos para limitar o implante, após 60 dias. **Autor:** SECONDO, M. T. S. 2021

4.2 Obtenção, expansão e caracterização das MSC derivadas de tecido adiposo.

Foi realizada a obtenção, expansão e caracterização das CTMs derivadas de tecido adiposo (Figura 3). As amostras de tecido adiposo obtidas de 3 coelhos (os mesmos utilizados para obtenção de veias cavas) foram utilizadas para celularizar os arcabouços do Grupo 3 – VD-SDS+CTMs alogênicas.

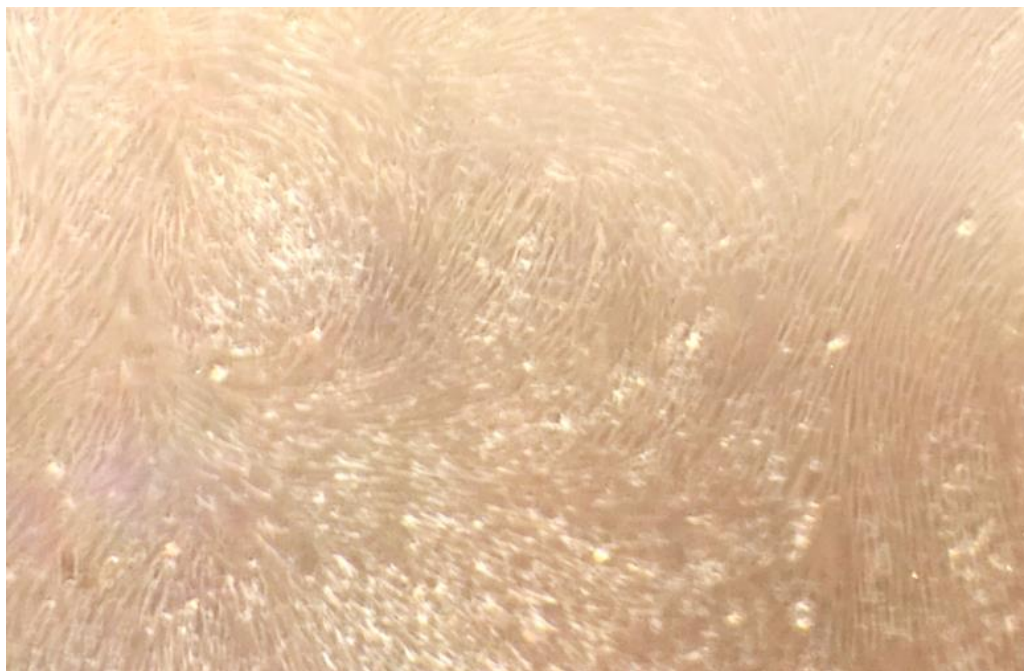


Figura 3. Fotomicrografia de microscopia invertida a fresco de MSC em placa de cultura. Confluência de 95% em 2ª passagem celular. **Autor:** SECONDO, M. T. S. 2021

Alíquotas contendo 1×10^5 de CTM foram utilizadas para realizar a caracterização fenotípica. Conforme ilustrado no histograma figura 4, os valores médios de intensidade de fluorescência para os três marcadores foram 79,04% (CD90), 52,43% (CD106) e 55,05% (CD71). Os resultados estão dentro do padrão de positividade estabelecido pela SITC, de 50%; contudo, os marcadores CD106 e CD71 apresentaram maior expressividade. Estes achados corroboram com o que se encontra na literatura, que considera a hipótese de que na cultura podemos encontrar células em diferentes níveis de diferenciação e não subtipos celulares diferentes. Diante desta hipótese, células mais imaturas têm maior tamanho e menor granulosidade e células mais maduras, menor tamanho e maior granulosidade, que corresponderia ao segundo pico encontrado na distribuição do histograma pela técnica de citometria de fluxo.³⁹

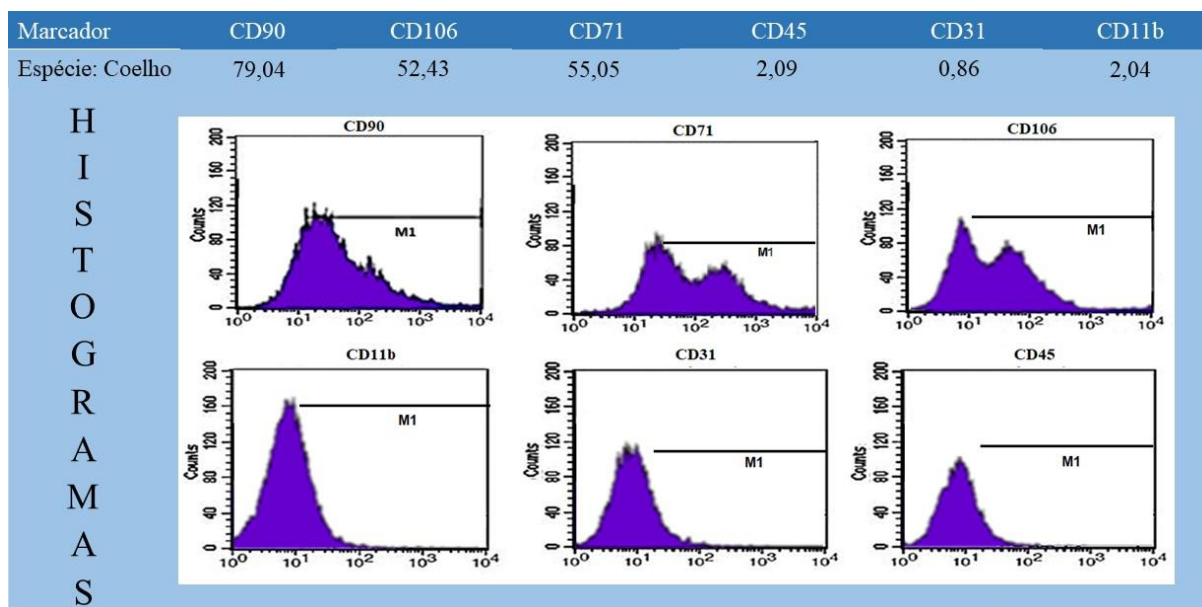


Figura 4. Perfil fenotípico em citometria de fluxo para CTM utilizadas neste estudo, com os respectivos histogramas para os marcadores anti CD90; CD45, CD106, CD11B, CD 71 e CD31.

Autor: SECONDO, M. T. S. 2021

4.3 Implantes das VCI e dos arcabouços celularizados ou não – modelo animal *in vivo*

O implante dos fragmentos de VCI alogênica e arcabouços celularizados ou não foi realizado de acordo com o previsto na metodologia, sem complicações. Os explantes foram coletados após 60 dias com a eutanásia dos animais e as análises histológicas foram conduzidas no laboratório de Patologia do HC da FMB-UNESP. As figuras 5 e 6 mostram a obtenção do explante e o congelamento de parte do fragmento para análise a fresco.

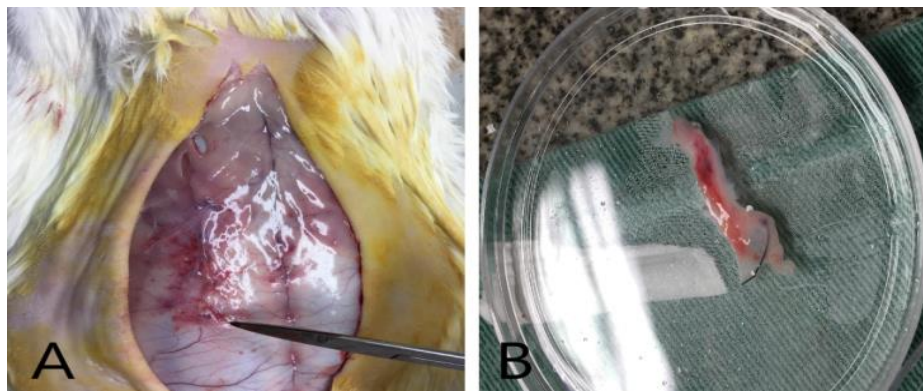


Figura 5. Procedimento de retirada do implante de arcabouço com 60 dias. **A.** Procedimento de coleta do fragmento implantado. **B.** Explante de arcabouço coletado para análise histológica. **Autor:** SECONDO, M. T. S. 2021



Figura 6. Fragmentos do estudo que foram congeladas, um fragmento para cada animal (n = 12), seguidos para análise por congelamento, imunofluorescência e dosagem de ILs de macerado

Autor: SECONDO, M. T. S. 2021

4.4 Obtenção das amostras de sangue para análise de interleucinas

Foram realizadas coleta de sangue periférico, centrifugação e separação do plasma. O plasma foi aliqotado para análise de interleucinas e de estresse oxidativo, e as alíquotas foram mantidas congeladas a -80°C em ultrafrezer na UNIPLEX. (Figura 7)



Figura 7. Amostras de plasma coletadas de todos os animais nos momentos pré-operatório, 1, 7, 14, 30, 60 dias, mantidas congeladas até a dosagem de ILs de interesse.

Autor: SECONDO, M. T. S. 2021

O estudo dos níveis séricos de ILs revelou níveis séricos estatisticamente semelhantes entre os grupos estudados. Os resultados estão compilados na Tabela 1. A IL 4 apresentou resultado igual a zero em todas as análises e foi considerada como não detectável nas condições deste experimento.

Tabela 1. Análise das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias do plasma por ELISA.

Variável I	G	Momento												P- valor
		1		2		3		4		5		6		
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
TNF	1	31.4aA	3.32	32.03aA	3.17	26.42b A	2.07	25.17b A	7.3	14.43cA	3.37	21.52bC	7.64	0.445 7
	2	32.5aA	2.61	26.31bB	4.72	29.82bB	1.95	26.11cA	1.74	16.11d A	3.1	13.05eB	1.86	
	3	33.76a A	1.72	28.59ba	3.04	26.61b A	4.54	56.35ab	52.8 6	21abAA	13.9 1	23abAB	15.5 3	
	4	23.43aB	3.08	30.76aA	1.51	22.39b A	4.36	41.09cB	15.3 5	14.28d A	5.34	14.65eA	3.92	
IL6	1	1.19aA	2.06	0.9aA	1.63	0bA	0	0.67aA	1.16	0bA	0	0bA	0	0.523 0
	2	7.35aA	7.32	0bB	0	1.19aB	2.06	0.67aA	1.16	0bA	0	0bA	0	
	3	4.88aA	8.45	3.5aA	6.17	5.38aB	5.61	10.63aA	9.76	0bA	0	0bA	0	
	4	0aB	0	0aB	0	25.26bB	42.8 2	0aB	0	0bA	0	0bA	0	
IL10	1	32.93a A	4.68	37.21aA	7.27	34.71aA	7.93	44.96aB	17.4 4	29.50cA	7.29	26cA	2.57	0.445 7

2	30.49a A	4.24	33.61aA	3.24	29.48aB	7.78	30.74aA	4.45	28.86b A	8.1	23.60b A	2.76
3	31.97a A	6.56	42.3aA	10.9 6	33.35aA	8.48	37.2aA	10.9 7	33.18aA	17.3 1	39.80aB	16.7
4	38.59a A	12.4 7	38.1aA	8.01	29.91aA	12.1 4	39.3aA	15.9 4	32.61aA	12.6 5	33.34aB	4.02

Tempos das coletas de amostra sanguínea: 1 – Pré-operatório; 2-24h após o procedimento; 3- 7 dias após o procedimento; 4 – 14 dias após o procedimento; 5 – 30 dias após o procedimento; 6 – 60 dias após o procedimento. Média seguidas da mesma letra minúscula (ficando os grupos) não diferem significativamente ao nível de 5%; e médias seguidas de mesma letra maiúscula (fixando o momento) não diferem significativamente ao nível 5%.

G: Grupos

Foi realizado também a análise das mesmas ILs no homogenato (macerado) do tecido congelado do explante (coletado após 60 dias do implante), cujos resultados estão apresentados na Tabela 2. Mais uma vez, o resultado da IL4 foi igual a zero em todas as amostras e foi considerada como não detectável nas condições deste experimento.

Tabela 2. Análise de interleucinas do homogenato (macerado dos tecidos)

Variáveis	Grupos								p-valor
	1		2		3		4		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
TNF	40.92ab	6.94	56.65c	16.82	37.91a	10.56	49.95ab	7.23	0.0022
IL6	12.19a	20.82	12.85a	10.97	2.6a	6.38	12.74a	14.51	0.7222
IL10	52.09a	25.6	52.28a	6.22	27.68b	2.16	62.11a	16.8	0.0002

Grupo 1: Veia alogênica; Grupo 2: Veia descelularizada; Grupo 3: Veia descelularizada +CTM alogênica; Grupo 4: Veia descelularizada + CTM autóloga. Médias seguidas da mesma letra minúscula (fixando grupos) não diferem significante ao nível de 5%

Pode-se concluir a partir dos dados da análise das interleucinas no homogenato do explante congelado que, para o $\text{TNF}\alpha$, o grupo veia descelularizada apresentou maiores resultados comparativamente aos demais grupos, o que caracteriza uma maior reação inflamatória aos 60 dias ($p = 0.0022$). Para os valores aferidos pela dosagem de IL6, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, portanto, não foi possível utilizar-se desse parâmetro para diferenciar a inflamação provocada pelos implantes nas condições desse experimento. Para a IL10, observou-se que apenas o grupo 3 (arcabouço + CTM alogênicas) teve menor dosagem desta citocina em comparação com os demais grupos, com diferença estatística significativa ($p=0,0002$), o que sugeriu diminuição da regulação do processo inflamatório mediado por IL10 nesse grupo.

4.5 Avaliação histomorfológica

A análise por HE revelou alta taxa de endotelização, com boa evolução tecidual associada a notável taxa de celularidade nos tecidos analisados (Figura 8).

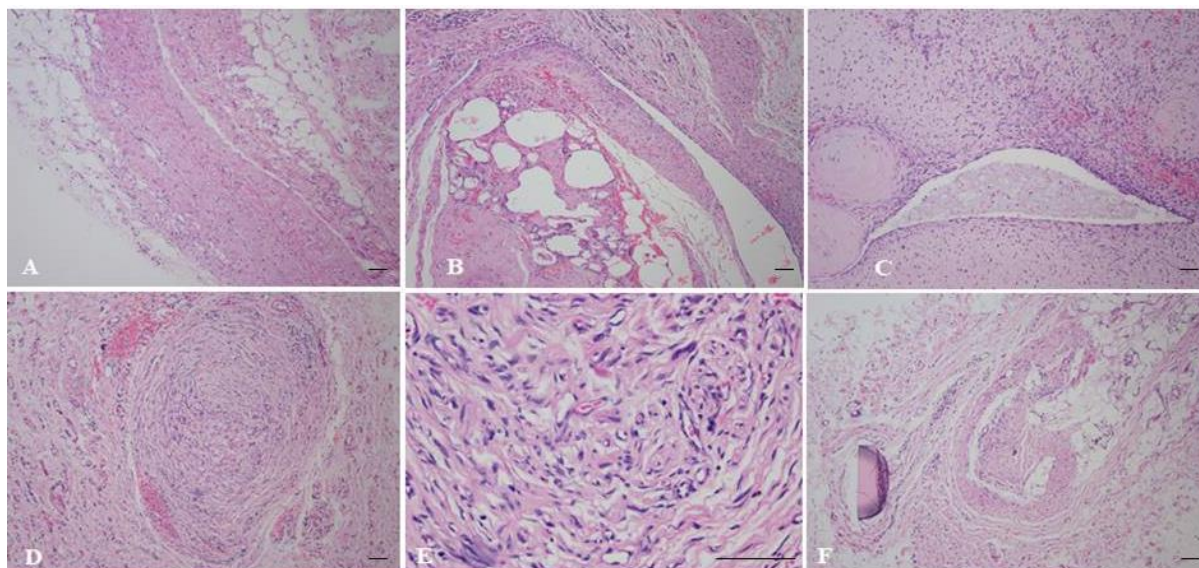


Figura 8. Fotomicrografias HE - Microscopia óptica dos explantes de arcabouços implantados após 60 dias. **A e B:** Grupo 1- Veia alogênica apresentando células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e histiócitos) além da manutenção de estruturas da veia nativa (endotélio) e fibroblastos; **C:** Grupo 2- VD-SDS apresentando neoformação endotelial, reação tecidual reparadora, fibroblastos imaturos (miofibroblastos), tecido de granulação, baixa evidência de reação inflamatória; **D e E:** Grupo 3- VD-SDS + CTMs alogênicas evidenciando proliferação vascular adjacente, baixa reação inflamatória, proliferação de fibroblastos (miofibroblastos) e neovascularização funcional no interior do tecido com hemácias em seu interior; **F:** Grupo 4- VD-SDS + CTMs autólogas que apresenta neoformação vascular adjacente abundante, revitalização da parede do arcabouço, endotélio repovoando parcialmente a luz do arcabouço venoso, não evidencia-se reação inflamatória, exceto pela região do ponto de NYLON.

Autor: Secondo, M. T. S. 2021.

Paralelamente, apenas com a finalidade de se comprovar que as CTMs implantadas nos arcabouços se mantiveram presentes no decorrer do experimento, alguns cortes do material congelado dos grupos 3 e 4 foram observados em microscópio de fluorescência, comprovando a presença de CTMs ou seus derivados nos explantes desses grupos pela marcação ainda presente dos nanocristais de Qtracker – fluorescência citoplasmática em vermelho. (Figura 9)

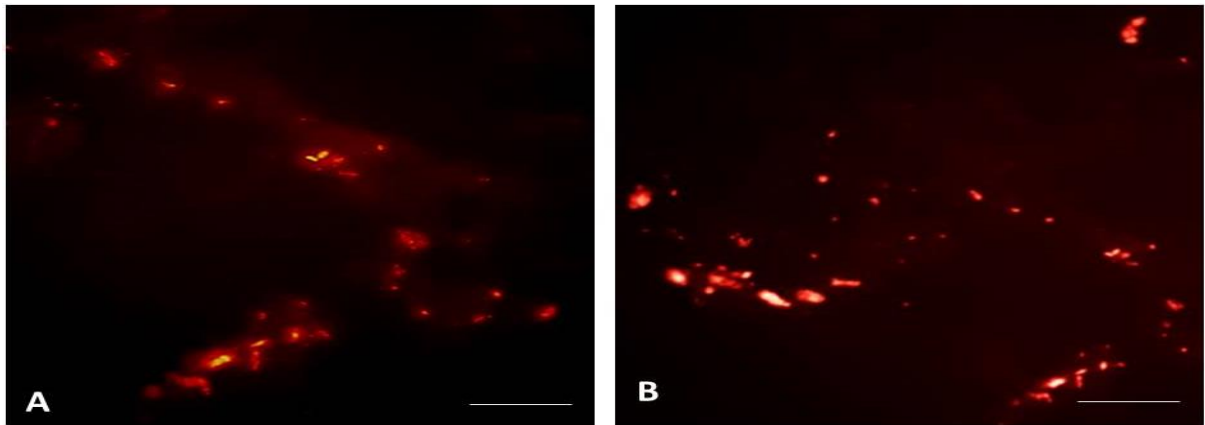


Figura 9. Análise em microscopia de fluorescência. **A:** Grupo 3, **B:** Grupo 4, apresentando sinais de marcação celular (CTM) com Qtracker (fluorescência vermelha em nanocristais depositados no citoplasma).

Autor: Secondo, M. T. S. 2021

A imunohistoquímica para o anticorpo CD31, marcador de endotélio vascular, foi positiva em todos os grupos, porém, com padrões de ocorrência um pouco diferentes entre os grupos, correspondendo com os achados da histologia em HE, com menor intensidade de marcação endotelial para o grupo 1 e um padrão menos organizado para os grupos 2 e 3 em comparação com o grupo 4 (Figura 10).

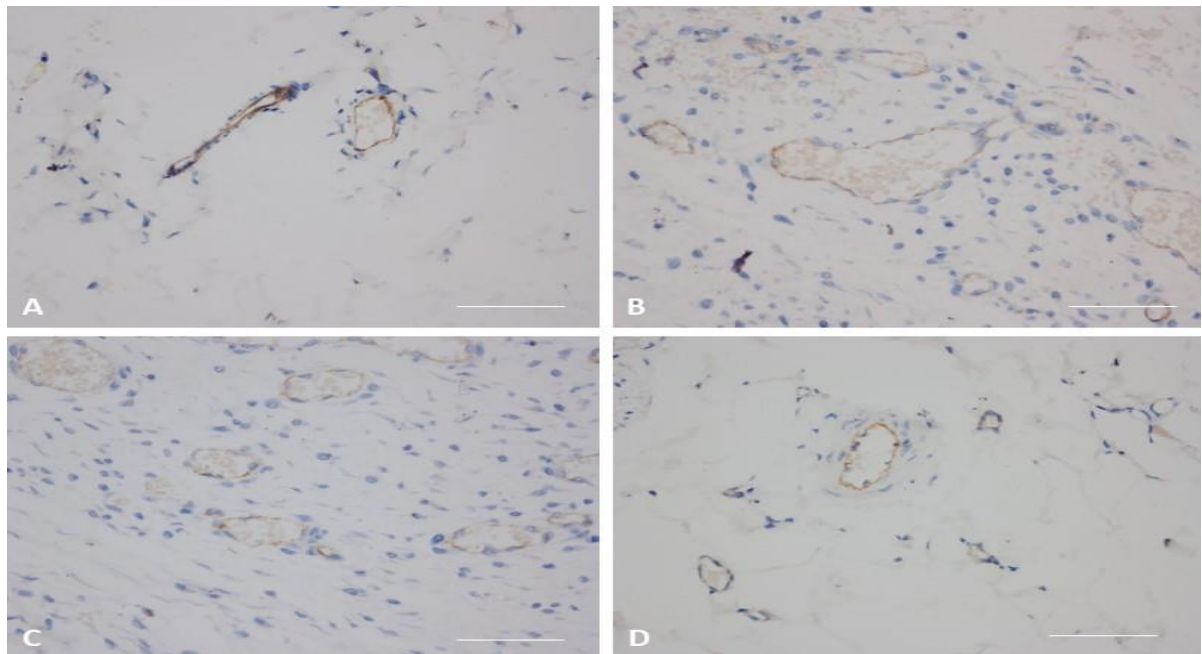


Figura 10. Análise de lâmina de imunohistoquímica em microscopia óptica com anticorpo marcador de endotélio CD31. **A:** Grupo 1; **B:** Grupo 2; **C:** Grupo 3; **D:** Grupo 4. **Autor:** Secondo, M. T. S. 2021

A marcação por imunofluorescência com Qtracker foi melhorada com a marcação nuclear com DAPI para observar a correlação citoplasma e núcleos, caracterizando células

viáveis. Observou-se que havia células viáveis marcadas com os dois marcadores nos dois grupos (G3 e G4). (Figura 11)

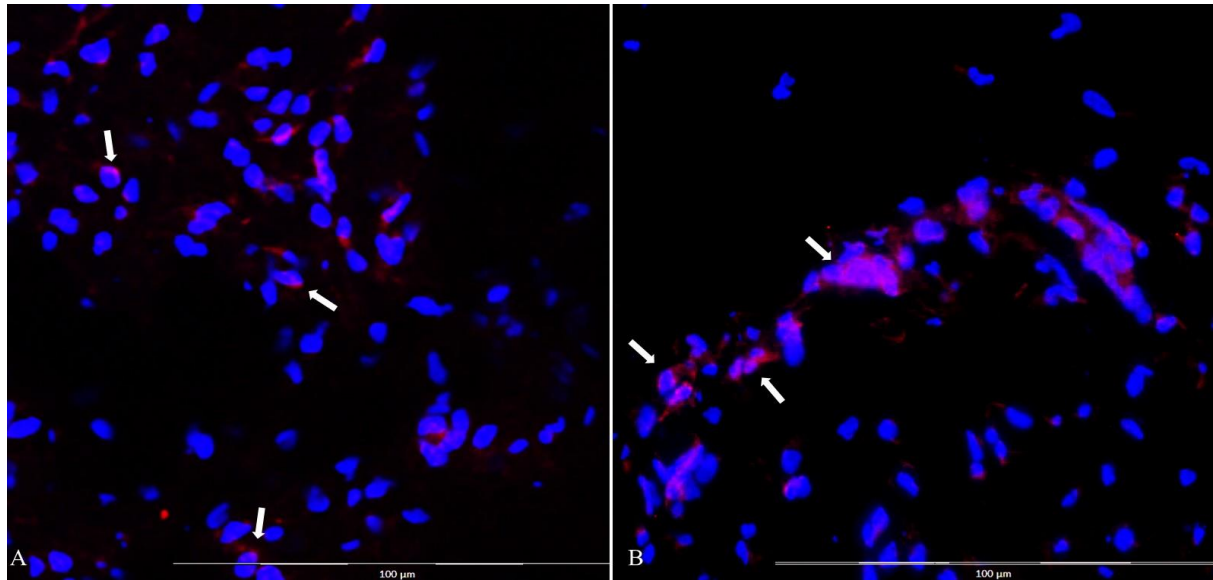


Figura 11. Fotomicrografias de Imunofluorescência em tecido congelado. **A:** Veias descelularizadas com MSCs alogênicas, núcleos celulares em azul (DAPI) e vermelho, citoplasma das CTMs marcadas no tecido (Qtracker); **B:** Veias descelularizadas com CTMs autólogas, núcleos celulares em azul (DAPI) e vermelho, citoplasma das CTMs marcadas no tecido (Qtracker) (setas apontam para células marcadas).

Autor: Secondo, M. T. S. 2021

Foi realizada então a marcação com CD31 + FITC (Verde) e DAPI (azul), além da marcação prévia com Qtracker (vermelho) e foi possível observar, em microscopia confocal de fluorescência, a ocorrência de algumas células endoteliais que provavelmente vieram da cultura implantada, pois apresentaram simultaneamente as 3 marcações nos dois grupos que receberam arcabouço e CTM. (Figura 12)

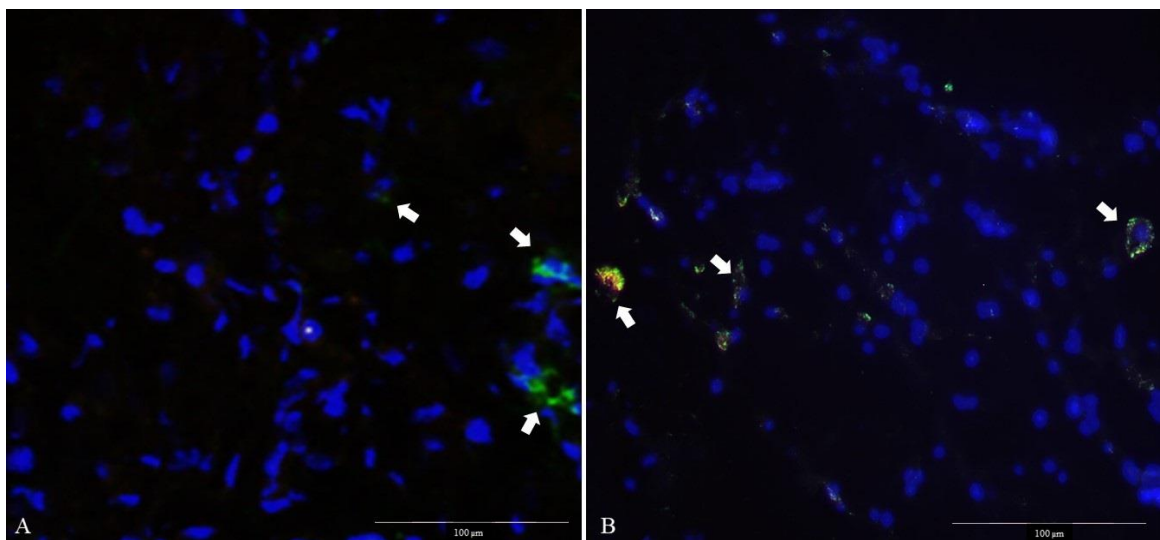


Figura 12. Fotomicrografias de Imunofluorescência em tecido congelado. **A:** Veias descelularizadas com CTMs alogênicas: núcleos celulares em azul (DAPI); em vermelho, citoplasma das CTMs marcadas no tecido (Qtracker); em verde, membrana citoplasmática marcada com anti-CD31 e FITC; **B:** Veias descelularizadas com CTMs autólogas:

núcleos celulares em azul (DAPI); em vermelho, citoplasma das CTMs marcadas no tecido (Qtracker); em verde, membrana citoplasmática marcada com anti-CD31 (FITC) (setas apontam para células marcadas).

Autor: Secondo, M. T. S. 2021

4.6 Estresse oxidativo pela análise de MDA em plasma.

Foi realizada dosagem de malonaldeído (MDA) das amostras de plasma congelado de todos os tempos desse experimento para todos os grupos com a finalidade de observar variações do estresse oxidativo nos diferentes tempos e grupos, de forma a tentar extrapolar os resultados com a resposta inflamatória provocada pelos implantes. (Tabela 3).

Tabela 3. Teste comparativo entre os 4 grupos em cada momento.

Variável	Grupo 1 (n=3)			Grupo 2 (n=3)			Grupo 3 (n=3)			Grupo 4 (n=3)			p
	med	min	max	med	min	max	med	min	max	med	min	max	
MDO1	.0411	.0102	.0621	.0264	.0213	.0913	.0214	.0056	.0258	.0346	.0222	.0625	0.459
MDO2	.0288	.0220	.0607	.0394	.0138	.0617	.0192	.0123	.0745	.0484	.0280	.0548	0.922
MDO3	.0416	.0361	.1357	.0190	.0166	.0728	.0148	.0050	.0185	.0395	.0116	.0608	0.192
MDO4	.0375	.0341	.0542	.0321	.0118	.0871	.0165	.0150	.0244	.0203	.0114	.0214	0.157
MDO5	.0375	.0353	.0753	.0352	.0277	.1186	.0066	.0034	.0081	.0326	.0127	.0484	0.070
MDO6	.0178	.0151	.1853	.0476	.0209	.0487	.0098	.0065	.0196	.0265	.0245	.0341	0.147
<i>p</i>	0.916			0.700			0.098			0.266			

MDO1 (pré-operatório), MDO2 (1 dia pós-operatório), MDO3 (7 dias), MDO4 (14 dias), MDO5 (30 dias), MDO6 (60 dias).

De forma geral, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas para a análise sérica de MDA no plasma, não permitindo fazer inferências quanto à influência dos procedimentos adotados neste estudo e ao aumento ou à diminuição do estresse oxidativo.

5. DISCUSSÃO

O tratamento convencional para a DAOP é realizado através de medidas clínicas para o controle de fatores de risco mas, em situação de isquemia crítica, as alternativas mais comumente utilizadas são os tratamentos endovasculares (angioplastia) e as cirurgias de revascularização (pontes / *bypass* realizados com veia autóloga ou com material sintético).⁴⁰ Entretanto, para uma parcela de pacientes, os tratamentos convencionais não se aplicam e as amputações acabam por se tornar a única opção restante.² Consequentemente, a biotecnologia se torna parceira para o desenvolvimento de produtos biomiméticos, e inúmeras pesquisas têm

apontado para a possibilidade de produção de órgãos ou tecidos que podem ser promissores para a regeneração ou substituição de vasos danificados, levando-se em consideração que já temos tecnologia suficiente para a diferenciação de CTMs em endotélio, músculo liso e outros tecidos.^{41, 42}

Artigo de revisão de literatura de Afra *et al*,⁴³ compararam os resultados de pesquisas pré-clínicas com o emprego de CTMs autólogas ou alogênicas para o desenvolvimento de vasos sanguíneos e concluiu-se que as células autólogas apresentam uso preferencial. Nesta mesma revisão, foi comparado o potencial das CTMs na engenharia de vasos sanguíneos funcionais *versus* outros tipos celulares, como células mononucleares da medula óssea, células precursoras de endotélio, células de músculo liso autólogas adultas diferenciadas, células endoteliais autólogas, células tronco embrionárias e células tronco pluripotentes.⁴³ Concluiu-se que as CTMs ainda são as células preferenciais na engenharia de tecidos em vasos sanguíneos, principalmente pelo seu potencial multipotente e pela facilidade de obtenção em quantidade. Podem também secretar um amplo espectro de macromoléculas bioativas que ajudam na regeneração de tecidos lesados e que têm propriedades imunomoduladoras.⁴³

Quanto ao arcabouço, é necessário, para engenharia de tecidos em vasos sanguíneos, que estes apresentem características muito específicas, pois precisam suportar as tensões vasculares sem degeneração, inibir eventos trombóticos, apresentar boa interação com os tecidos adjacentes e com as células implantadas e promover o transporte de nutrientes através da porosidade de sua parede.⁴¹ Nossos estudos prévios determinaram que o método empregado para a produção do arcabouço venoso no modelo em coelhos é suficientemente adequado para atender aos requisitos descritos e este estudo demonstra que o uso de CTMs promove um ambiente favorável às adaptações imunológicas quando o arcabouço é exposto ao ambiente natural *in vivo*.³³

A resposta imunológica desencadeada pelo implante dos arcabouços no modelo animal *in vivo* variou entre os grupos e a forma de análise. Para as avaliações de resultados séricos, não se observaram diferenças significativas entre os grupos nos tempos analisados, o que pode ser justificado pela volatilidade da produção dessas citocinas após as primeiras horas da cirurgia, pelo pequeno porte das cirurgias e pela pequena quantidade de tecido implantado. Para as análises do homogenato do tecido coletado 60 dias após o implante, diferentemente da análise sérica, pode-se observar que, mesmo tardiamente, houve alguma diferença entre os grupos, sendo possível observar que houve uma maior reação pró-inflamatória no tecido descelularizado (grupo 2) em comparação com os demais grupos pela análise do TNF α , mas não pela análise da IL6. Entretanto, pode-se observar ainda uma diminuição da ação anti-inflamatória nos animais que receberam CTMs alogênicas em comparação aos demais grupos pela análise da IL10. Curiosamente, nossos experimentos não foram capazes de verificar a presença de IL4 em nenhum animal, nem nos homogenato nem na análise sérica. Talvez isso possa ser explicado pelo modelo animal empregado (coelhos), ou pela volatilidade da citocina nas amostras. De qualquer forma, já é conhecido o papel imunomodulador das CTMs utilizadas em engenharia de tecidos, o que foi um fator determinante nas análises realizadas.

Quanto a diferenciação celular das CTMs e a organização estrutural destes neovasos, os implantes com veia cava descelularizada + CTM foram promissores, sendo possível observar a presença dessas células ainda viáveis no tecido após 60 dias do implante e que algumas puderam se diferenciar em endotélio. Esse fato pode ser explicado pelas condições favoráveis que o ambiente do vaso descelularizado provoca, tanto pelas condições tridimensionais como por possíveis induções ocasionadas pela própria composição da matriz extracelular, principalmente pelo colágeno e pela elastina dos arcabouços.⁴¹

Quanto ao estresse oxidativo analisado pela dosagem do MDA sérico, não foi observada diferença estatística entre os grupos, o que não permite diferenciar a influência de cada implante

por essa metodologia. Vale lembrar que o experimento não foi realizado com controle dietético para essa análise, o que pode ter influenciado nos resultados.

Assim, este trabalho se propôs a testar a influência do arcabouço celularizado com CTM em comparação ao arcabouço não celularizado e a veia in natura alogênica quanto ao potencial de indução de resposta inflamatória no receptor, além da capacidade de biointegração com o receptor e a diferenciação endotelial. Foi possível observar que cada variação teve influência nos resultados e que a situação ideal implica na utilização de CTMs autólogas.

6. CONCLUSÃO

O uso de arcabouços de veia cava descelularizada com SDS 2% 1h e recelularizados com CTMs autólogas foi o protocolo que apresentou maior organização celular, melhor diferenciação endotelial e menor resposta imunogênica do hospedeiro. Dessa forma, acredita-se que novos experimentos devam ser realizados para avaliar o comportamento desses produtos da bioengenharia implantados no sistema circulatório *in vivo*, para avaliar se existe funcionalidade e durabilidade que subsidiem avaliações futuras para aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

1. Deb S, Wijeyesundera HC, Ko DT, Tsubota H, Hill S, Fremes SE. Coronary artery bypass graft surgery vs percutaneous interventions in coronary revascularization: a systematic review. JAMA. 2013 Nov 20;310(19):2086-95.
 2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group, Bell K, Caporusso J, Durand-Zaleski I, Komori K, Lammer J, Liapis C, Novo S, Razavi M, Robbs J, Schaper N, Shigematsu H, Sapoval M, White C, White J, Clement D, Creager M, Jaff M, Mohler E 3rd, Rutherford RB, Sheehan P, Sillesen H, Rosenfield K. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur J VascEndovasc Surg. 2007;33 Suppl 1:S1-75.
-

-
3. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Dec;20(6):628-40
 4. **TROCAR**
 5. Gaudino M, Taggart D, Suma H, Puskas JD, Crea F, Massetti M. The Choice of Conduits in Coronary Artery Bypass Surgery. *J Am CollCardiol*. 2015 Oct 13;66(15):1729-37.
 6. Leroy O, Meybeck A, Sarraz-Bournet B, d'Elia P, Legout L. Vascular graft infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2012 Apr;25(2):154-8.
 7. Lejay A, Vento V, Kuntz S, Steinmetz L, Georg Y, Thaveau F, Heim F, Chakfé N. Current status on vascular substitutes. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2020 Oct;61(5):538-543.
 8. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1823-8.
 9. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med*. 2007 Sep-Oct;11(5):945-57.
 10. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41.
 11. Bertanha M. Perspectivas de uso de células-tronco em cirurgia vascular. *J Vasc Bras*. 2016 Jul-Sep;15(3):173-175.
 12. Harasymiak-Krzyżanowska I, Niedojadło A, Karwat J, Kotuła L, Gil-Kulik P, Sawiuk M, Kocki J. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol Biol Lett*. 2013 Dec;18(4):479-93
 13. Harasymiak-Krzyżanowska I, Niedojadło A, Karwat J, Kotuła L, Gil-Kulik P, Sawiuk M, Kocki J. Adipose tissue-derived stem cells show considerable promise for regenerative medicine applications. *Cell Mol Biol Lett*. 2013 Dec;18(4):479-93
 14. Rodbell M. The removal and metabolism of chylomicrons by adipose tissue in vitro. *J BiolChem*. 1960 Jun;235:1613-20
 15. Ginani, F.; Soares, DM; Barboza, C. A. Rendimento de Células mesenquimais do tecido adiposo submetidas a diferentes protocolos de extração. *Braz. J. Health Sci*, v. 17, p. 65-70, 2013.
-

-
16. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
 17. Vigorito AC. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31:280-84
 18. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J ApplGenet.* 2007;48(4):307-19.
 19. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol Biol.* 2011;698:3-8.
 20. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N, Reppel L, He Y. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *StemCells Int.* 2015;2015:734731.
 21. Yoshida WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros. *J VascBr* 2005;4 316-8.
 22. Dormandy J, Mahir M, Ascady G, Balsano F, De Leeuw P, Blombery P, Bousser MG, Clement D, Coffman J, Deutshinoff A, et al. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article. *J CardiovascSurg (Torino).* 1989 Jan-Feb;30(1):50-7.
 23. Reis PEO. Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br.* 2005;4:366-70.
 24. MAFFEI, Francisco Humberto de Abreu. Doenças vasculares periféricas, vol. 2. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.
 25. Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's vascular surgery. Elsevier Health Sciences, 2014.
 26. Moore KL, Persaud, TVN. Embriologia Básica. 6ª. Ed. São Paulo: Elsevier, 2008.
 27. L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 1998 Jan;12(1):47-56.
 28. Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, Bendeck MP. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol.* 2006 May;168(5):1697-709.
 29. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH. Sphingosyl phosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J CellSci.* 2006 Dec 1;119(Pt 23):4994-5005.
-

-
30. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, Yamada M, Sugimoto K, Daida H. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*. 2003 Apr 29;107(16):2078-81.
 31. Song Y, Feijen J, Grijpma DW, Poot AA. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *ClinHemorheolMicrocirc*. 2011;49(1-4):357-74.
 32. Liu JC. A novel strategy for engineering vascularized grafts in vitro. *World J StemCells*. 2010 Aug 26;2(4):93-6.
 33. Bertanha M, Moroz A, Almeida R, Alves FC, AcorciValério MJ, Moura R, Domingues MA, Sobreira ML, Deffune E. Tissue-engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *J VascSurg*. 2014 Jun;59(6):1677-85.
 34. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, Silva RA, Rinaldi JC, Golim MA, Felisbino SL, Domingues MA, Sobreira ML, Reis PP, Deffune E. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *ExpCell Res*. 2014 Aug 1;326(1):103-11.
 35. Bertanha M, Sobreira ML, Bovolato ALC, Rinaldi JC, Reis PP, Moroz A, Moraes LN, Deffune E. Ultrastructural analysis and residual DNA evaluation of rabbit vein arcabouço. *Acta Cir Bras*. 2017 Sep;32(9):706-711.
 36. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83.
 37. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009 Aug;30(22):3749-56.
 38. Elias, DBD, et al. "Avaliação das concentrações de malonaldeído e nitrito em pacientes com anemia falciforme em tratamento ou não com hidroxiureia." *Einstein (São Paulo)* 8 (2010): 414-418.
 39. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018 Jan;93(1):19-31.
 40. Lejay A, Vento V, Kuntz S, Steinmetz L, Georg Y, Thaveau F, Heim F, Chakfé N. Current status on vascular substitutes. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2020 Oct;61(5):538-543.
-

41. Song HG, Rumma RT, Osaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018 Mar 1;22(3):340-354
 42. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30.
 43. Afra, S., Matin, M.M. Potential of mesenchymal stem cells for bioengineered blood vessels in comparison with other eligible cell sources. *Cell Tissue Res* 380, 1-13 (2020)
-