

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 28/07/2025.



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

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em coelhos - *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para defesa da tese para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2023

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em
coelhos - *in vitro*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
defesa da tese para obtenção do título de
Doutora em Cirurgia e Medicina
Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Rodrigues, Lenize da Silva.

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos : modelo em coelhos - *in vitro* / Lenize da Silva Rodrigues. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Matheus Bertanha

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 40102041

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Doença Arterial Periférica. 3. Células-Tronco. 4. Endotélio. 5. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimal; Doença Arterial Periférica; Neovasos; Scaffolds; Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecido.

Impacto da Pesquisa

Esta pesquisa experimental em modelo animal em coelhos teve o objetivo de desenvolver um modelo de neovaso sanguíneo, *in vitro*, para futura aplicação como substituto vascular em revascularizações arteriais. Para isso, foram empregadas veias descelularizadas como arcabouços e técnicas de Engenharia de Tecidos com células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo para a regeneração dos componentes celulares do vaso sanguíneo, endotélio e músculo liso, com estímulo de fatores de crescimento e diferenciação celular. Este modelo experimental faz parte de uma linha de pesquisa que pretende levar a terapia substitutiva baseada em medicina personalizada para futura aplicação médica em humanos, fornecendo vasos sanguíneos para doentes que se encontram sem fontes de vasos autólogos para a confecção de pontes ou *bypass* cardiovasculares. A endotelização e a reestruturação da camada muscular em uma estrutura tridimensional deve trazer vantagens significativas para os portadores de doenças cardiovasculares, como maior patência das pontes vasculares pelo efeito antitrombótico do endotélio e maior resistência a infecções em comparação com tecidos sintéticos.

Ainda, todo o processo de desenvolvimento tecnológico gerou aumento da capacitação intelectual da equipe envolvida, consolidação de técnicas de engenharia celular, ampliação do perfil multiprofissional dos envolvidos, evolução institucional e profissional em uma área considerada a fronteira do conhecimento científico atual. Por fim, permitirá a produção de artigos científicos com publicações de maior impacto e excelência nacional, trazendo maior visibilidade para a instituição sede em nível nacional e internacional.

Lenize da Silva Rodrigues

Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos: modelo em coelhos - *in vitro*

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

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Comissão Examinadora da Defesa - Titulares

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Profa. Dra. Ana Terezinha Guillaumon
Universidade de Campinas - UNICAMP

Dra. Helga Caputo Nunes Holzhausen
Centro de Ensino e Pesquisa Hospital Israelita Albert Einstein

Comissão Examinadora da Defesa - Suplentes

Prof. Dr. Pedro Luiz Toledo de Arruda Lourenção
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Dr. Nilton José dos Santos
Universidade de Campinas – UNICAMP

Profa Dra. Hilde Buzzá
Facultad de Física Pontificia Universidad Católica de Chile University of Victoria

Botucatu, 28 de Julho de 2023.

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Maria Aparecida e Avelino, por todo apoio emocional e força. Pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis. Serão eternamente meus exemplos de vida.

À minha querida irmã, Laís, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis. E pelos seus divertidos “aonde nós vamos dessa vez?”.

Ao meu querido avô padrinho, Olívio Augusto (in memorian), por sempre me dar o apoio, me incentivar a buscar meus sonhos e objetivos. Sempre será meu herói, meu orgulho e meu exemplo.

Agradecimentos

“À Deus,

Pois Deus não nos deu um espírito de timidez, mas de fortaleza, de amor e de sabedoria. ” (2 Timóteo 1, 7)

Aos meus pais, Maria Aparecida e Avelino, por sempre zelarem pela minha formação e pela minha vida em todos os momentos.

À minha querida irmã, Laís, e ao meu cunhado Takao por todo apoio quando mais precisei.

A todos os meus amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado, tornando mais fácil os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Professor Drº Matheus Bertanha, pelos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho, pela orientação excepcional, e sem dúvida, por todo estímulo e apoio dado para realização deste trabalho. Sei que não só ganhei um mestre, mas ganhei também um amigo.

À professora Dra. Elenice Deffune, que, sempre esteve quando precisei de orientações específicas.

À equipe do LBA por toda ajuda. A equipe da UNIPLEX -FMB por todo carinho e ajuda nos experimentos. A toda a equipe da Neogene-UNIPLEX-FMB por toda paciência, ensinamentos e ajuda em algumas etapas da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Ortopedia por todo incentivo e apoio. Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia: Douglas de Jesus, Marinede Jorge, Simone Camargo pelo apoio.

À Pós-graduação representada pela Professora Dra. Patrícia Pintor Reis, que permitiu meu ingresso no doutorado e me apoiou nas mudanças necessárias.

À secretária da pós-graduação, Marcia, por toda paciência e carinho nesses anos. E a todos os professores da pós-graduação de Cirurgia e Medicina Translacional pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos Karise Naves, Mariana Secondo, Nathália Sertório, Vinicius Tadeu, Pedro Melluci e Rita de Cássia Alvarado que ao longo desses anos, sofremos, rimos e vencemos nesta caminhada.

À minha querida amiga Marluci, por todo apoio e carinho nesses anos todos, e a toda equipe da biblioteca da FMB.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, representada hoje pelo Magnífico Reitor Professor Titular Pasqual Barretti, pelo fornecimento da infraestrutura que tem sido fundamental para o desenvolvimento da minha carreira como pesquisadora;

À Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, representada hoje pelo Excelentíssimo Diretor Professor Titular Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, pelo fornecimento da infraestrutura que tem sido fundamental para o desenvolvimento da minha carreira como professor e pesquisador;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por financiar as pesquisas do meu orientador e contribuir com o avanço da ciência brasileira

Às pessoas não citadas explicitamente, cujo apoio jamais me faltaram, o meu sincero pedido de desculpas, e a certeza de que a omissão ser restrita apenas a estas páginas, meu muito obrigada!

Epígrafe

*[...] só a caminhada consegue nos libertar das
ilusões do indispensável.*

Frédéric Gros

Resumo

Resumo

Introdução: As doenças cardiovasculares são as principais responsáveis pela mortalidade da população ocidental, sendo que a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) representa 5% desse contingente. Pacientes sintomáticos possuem rápida evolução do quadro clínico quando tratados inadequadamente, sendo que cerca de 25% passam por amputação do membro inferior acometido. Com isso, pesquisas recentes vêm mostrando um futuro promissor na terapia regenerativa e substitutiva de tecidos envolvendo células-tronco mesenquimais (CTM) e engenharia celular, incluindo a engenharia de tecidos em vasos sanguíneos (tissue-engineered blood vessels – TEBV). **Objetivo:** Aprimorar as técnicas de TEBV a partir de modelo animal (coelhos), *in vitro*, a partir da diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASC) em endotélio e músculo liso. **Métodos:** Veias cavas inferiores (VCI) foram obtidas de 30 coelhos fêmeas, não prenhas, para proceder a descclularização e servirem de *scaffold*. Cada VCI foi fragmentada em segmentos de 2cm e a descclularização foi realizada por meio de protocolos estabelecidos com Dodecil sulfato de sódio 1% (SDS) por 2h. Para obtenção das ASCs, tecido adiposo (TA) interescaular foi obtido dos mesmos animais doadores das veias cavas inferiores. Após a dissociação enzimática do TA e a expansão da cultura das ASCs em número necessário, estas foram aplicadas na luz dos *scaffolds* 3D com Puramatrix®, sendo mantidos em placas de cultura de 24 poços, individualmente. Para indução da diferenciação endotelial das células aderidas ao arcabouço, o meio de cultura DMEM foi suplementado com VEGF (50ng/mL), FGF (20ng/mL), IGF (20ng/mL) e GF (20ng/mL), e mantidas por 2, 4 e 8 semanas em cultura. Por análise histopatológica determinou-se o melhor protocolo. A seguir, fez-se a acreção de músculo liso pré-diferenciado por 4 semanas (DMEM+ BMP4 2,5ng/mL e TGF-1 5ng/mL) também com uso de Puramatrix®. Observou-se os resultados histológicos em 2 e 4 semanas e escolheu-se o melhor protocolo. A partir desse resultado, fez-se a quantificação de citocinas no meio de cultura e quantificação da expressão de miRNAs nos neovasos (em triplicata). **Resultados:** No experimento de endotelização do *scaffold*, obtivemos uma melhor distribuição celular tempo-benefício para o tempo de 4 semanas. Em sequência, na adesão de músculo liso, observou-se melhores resultados também em 4 semanas de co-cultura. Análises por HE, imunohistoquímica e imunofluorescência comprovaram a diferenciação celular endotelial e músculo liso. Técnica de miRNAs puderam revelar algumas das vias genéticas envolvidas na TEBV, principalmente no que tange a imaturidade celular. **Conclusão:** O modelo biológico de *scaffold* de veia cava inferior descclularizado e recelularizado, *in vitro*, demonstrou boa celularização e diferenciação celular. As técnicas histológicas, análises de citocinas e do perfil global de expressão de miRNAs sugerem que os resultados são promissores para futuro uso da TEBV em modelo *in vivo*.

Abstract

Abstract

Background: Background: Cardiovascular diseases are the main cause of mortality in the Western population, with peripheral arterial disease (PAD) accounting for 5% of this population. Symptomatic patients have a rapid evolution of the clinical condition when inadequately treated, and about 25% undergo amputation of the affected lower limb. As a result, recent research has shown a promising future in regenerative and tissue replacement therapy involving mesenchymal stem cells (MSC) and cell engineering, including tissue-engineered blood vessels (TEBV) engineering. **Objective:** To improve TEBV techniques from an animal model (rabbits), in vitro, from the differentiation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ASC) into endothelium and smooth muscle. **Methods:** Inferior vena cava (IVC) were obtained from 30 female rabbits, not pregnant, to proceed with decellularization and serve as a scaffold. Each IVC was fragmented into 2cm segments and decellularization was performed using established protocols with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 2h. To obtain the ASCs, interscapular adipose tissue (AT) was obtained from the same donor animals of the inferior vena cava. After the enzymatic dissociation of the TA and the expansion of the culture of the ASCs in the necessary number, these were applied in the light of the 3D scaffolds with Puramatrix®, being maintained in culture plates of 24 wells, individually. To induce endothelial differentiation of cells adhered to the scaffold, the DMEM culture medium was supplemented with VEGF (50ng/mL), FGF (20ng/mL), IGF (20ng/mL), and GF (20ng/mL), and maintained for 2, 4 and 8 weeks in culture. By histopathological analysis, the best protocol was determined. Next, pre-differentiated smooth muscle accretion was performed for 4 weeks (DMEM+ BMP4 2.5ng/mL and TGF-1 5ng/mL) also using Puramatrix®. Histological results were observed at 2 and 4 weeks and the best protocol was chosen. Based on this result, the quantification of cytokines in the culture medium and the quantification of the expression of miRNAs in the neovessels (in triplicate). **Results:** In the scaffold endothelialization experiment, we obtained a better time-benefit cellular distribution for the 4-week period. In sequence, in smooth muscle adhesion, better results were also observed in 4 weeks of co-culture. Analysis by HE, immunohistochemistry, and immunofluorescence confirmed endothelial and smooth muscle cell differentiation. miRNAs technique could reveal some of the genetic pathways involved in TEBV, mainly with regard to cellular immaturity. **Conclusion:** The biological model of decellularized and recellularized inferior vena cava scaffold, in vitro, demonstrated good cellularization and cell differentiation. Histological techniques, cytokine analysis, and global miRNA expression profile suggest that the results are promising for future use of TEBV in an in vivo model.

Lista de Figuras

Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema da estrutura de grandes vasos sanguíneos. _____32
- Figura 2.** Fotomicrografia do corte histológico com coloração em HE do controle dos *scaffolds*. _____64
- Figura 3.** Fotomicrografia de cultura de ASC por microscopia invertida, contraste de fase em **A**: 3 dias; **B**: 15 dias. 40x. _____66
- Figura 4.** Fotomicrografia por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em tecido adiposo. _____67
- Figura 5.** Fotomicrográficas por microscopia invertida de contraste de fase da diferenciação em Células ósseas. _____67
- Figura 6.** Fotomicrografia por microscopia da diferenciação condrogênica de ASC corada com Azul de Toluidina. _____68
- Figura 7.** Perfil fenotípico das ASC, com marcadores CD90/45, CD106/11B e CD 71/31 pela técnica de citometria de fluxo. _____69
- Figura 8.** Fotomicrografia das lâminas de Imunofluorescência, com marcação de Dapi. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. _____70
- Figura 9.** Fotomicrografia das lâminas em HE. Grupo 1 que recebeu 1×10^5 : A, B, C, D; Grupo 2 que recebeu 1×10^6 : E, F, G, H. _____70
- Figura 10.** Fotomicrografia das lâminas dos *scaffolds* descelularizados com SDS e recelularizado com 1×10^6 celularizado. _____71
- Figura 11.** Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 1. **Grupo Controle:** **A** - nas setas indicam a repovoação celular da luz do *scaffold*, **C** e **E** – fotomicrografias de IHQ negativas para marcação de CD31 e CD146, respectivamente; **Grupo Experimento:** **B** - nas setas indicam a repovoação celular linear da luz do *scaffold*, **D** e **F**- fotomicrografias de IHQ positiva para marcação de CD31 e CD146, respectivamente. _____72
- Figura 12.** Painel das fotomicrográficas em imunofluorescência do experimento 1, com marcação de CD146 para o endotélio (FITC) e DAPI para os núcleos celulares. **Grupo Controle:** **A**: 2 semanas **C**: 4 semanas e **E**: 8 semanas; **Grupo Experimento:** **B**: 2 semanas, **D**: 4 semanas e **F**: 8 semanas. _____73
- Figura 13.** Imagem realizada em microscópio confocal de fluorescência de lâmina
-

de endotelização em tempo de cultura de 4 semanas. _____ 74

Figura 14. Célula endotelial, originada a partir de recelularização de *scaffold* (descelularizado com SDS) em cultura por 4 semanas. Imagem obtida em microscópio confocal de fluorescência (DAPI = azul = núcleos celulares; FITC = verde = parede celular anti-CD31; marcação com Qtracker = vermelho/alaranjado = marcação citoplasmática de rastreo das ASC cultivadas). _____ 75

Figura 15. Caracterização da cultura de células musculares lisas. _____ 76

Figura 16. Fotomicrografia das lâminas do o experimento 3 _____ 77

Figura 17. Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 1. _____ 78

Figura 18. Painel de análise das fotomicrográficas do experimento 2 em imunofluorescência com marcação de com DAPI para os núcleos celulares. ____ 79

Figura 19. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia Confocal. _____ 80

Figura 20. Fotomicrografia do experimento 2 (células musculares lisas e endoteliais em *scaffold*) em microscopia confocal de fluorescência, evidenciando apenas os núcleos celulares das células na parede externa do *scaffold* (DAPI = azul) e apenas uma célula endotelial na face luminal à esquerda marcada de verde (FITC = CD146). Aumento de 400x + zoom. _____ 81

Figura 21. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado *versus* controle. _____ 86

Figura 22. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso *versus* controle. _____ 90

Figura 23. Rede de vias moleculares do scaffold endotelizado com musculo liso *versus* controle. _____ 91

Figura 24. Rede de vias moleculares das células endotelizadas *versus* CTM indiferenciadas. _____ 95

Figura 25. Rede de vias moleculares das células musculares lisas *versus* CTM indiferenciadas. _____ 98

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1. MiRNAs pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. _____	48
Tabela 2. Contagem e Viabilidade celular das amostras 1 a 20 de cultura de Células Tronco Mesenquimais. _____	65
Tabela 3. Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante. _____	82
Tabela 4. Experimento 1: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio versus controle). _____	83
Tabela 5. Experimento 2: Análise de perfil de expressão de miRNAs (endotélio versus controle). _____	87
Tabela 6. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos Scaffold endotelizado versus controle (ASC indiferenciadas). _____	92
Tabela 7. Análise de perfil de expressão de miRNAs positivos Scaffold completo versus controle (ASC indiferenciadas). _____	96

Lista de Abreviaturas

Lista de Abreviaturas

Anti-anti	Antibiótico-antifúngico
ASC	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
BMP4	Proteína morfogenética óssea 4
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
CE	Célula endotelial
CML	Célula muscular lisa
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
Desc	Descelularizada
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s medium</i>
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
EDCFs	Fatores de contração
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRFs	Fatores de relaxamento
EGF	Fator de crescimento epitelial
ELAMs	<i>Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule -</i>
ET	Engenharia tecidual ou Engenharia de tecidos

ET-1	Endotelina-1
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FvW	Fator de von Willebrand
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HE	Hematoxilina e eosina
ICM	Isquemia crítica de membros
IF	Imunofluorescência
IGF	Fator de Crescimento Insulínico
IHQ	Imunohistoquímica
incubadora de CO₂ - 5%)	Incubadora com jaqueta de água a 5% de dióxido de carbono
LETC-UNIPEX	Laboratório de Engenharia Tecidual e Celular da Unidade de Pesquisa Experimental
MECdesc	Matrix extracelular descelularizada
MEC	Matrix extracelular
MI	Membros inferiores
miRNAs	MicroRNAs
mmHg	Milímetros de mercúrio
mg/kg	Miligramas por kilo
ml	Mililitros
Músculo liso	ML

M199	<i>Medium 199</i>
N	Número de amostra
NV	Neovaso
NV-CE	Neovaso com ASC diferenciadas em CE
NV-CE/CML	Neovaso com ASC diferenciada em CE e CML (NV-CE/CML)
NO	Óxido nítrico
PGA	Ácido poliglicólico
PDGF-β	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGI₂	Prostaciclina
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PLA	Ácido polilático
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
PVP-I	Polivinilpirrolidona-iodo
RNAs	Ribonucleotídeos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF	Soro fisiológico estéril
SFB	Soro fetal bovino
TA	Tecido adiposo
TEBV	Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos (<i>tissue engineering into blood vessels</i>)
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TGF-1	Fator de crescimento transformante beta tipo 1

3D	Tridimensional
TX-A2	Tromboxano A2
UI	Unidades Internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
UTR	<i>Untranslated region</i>
VCI	Veias cavas inferiores
VCI_{desc}	Veias cavas inferiores descelularizada
VD	Scaffold de veia descelularizada
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VSMCs	Célula de musculo liso vascular

Sumário

Sumário

Resumo	14
Abstract.....	16
Lista de Figuras	18
Lista de Tabelas	21
Lista de Abreviaturas.....	23
REVISÃO DE LITERATURA	30
1. Circulação periférica	30
1.1 Fisiologia dos grandes vasos sanguíneos	30
1.2 Doença arterial periférica	32
1.3 Revascularização cirúrgica por enxerto ou bypass.....	33
1.4 Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos	34
INTRODUÇÃO.....	39
1. Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos	39
1.1 Descelularização da veia	39
1.2 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo	41
1.3 Endotélio.....	42
1.4 Músculo liso vascular	43
1.5 microRNAs.....	45
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Geral	50
3.2 Específicos.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Local do estudo.....	51
4.2 Procedimentos éticos	51
4.3 Animais e condições de alojamento	51
4.4 Grupos	51
4.5 Eutanásia, manipulação e procedimentos	52
4.5.1 Eutanásia.....	52
4.5.2 Obtenção de veias cavas de coelhos	53
A. Descelularização das VCI.....	53
B. Caracterização Histológica dos scaffolds	54

4.5.3 Obtenção do tecido adiposo.....	54
A. <i>Expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo autóloga</i>	54
B. <i>Contagem e viabilidade celular</i>	56
4.6. Experimentos de diferenciação celular.....	56
4.6.1 Semeadura de ASC.....	56
A. <i>Lúmen do scaffold</i>	56
4.7. Adesão celular ao scaffold 3D.....	57
4.8 Endotelização do scaffold de veia cava inferior	58
4.9 Diferenciação celular em músculo liso.....	58
4.10 Semeadura do músculo liso no scaffold endotelizado.....	59
4.11 Determinação do perfil de interleucinas no sobrenadante.....	59
4.12 Análise do perfil global de expressão de miRNA	60
4.13 Cálculo Amostral e Estatística.....	62
5. RESULTADOS.....	64
5.1 Obtenção e descelularização de veias cava inferiores	64
5.1.1 Caracterização Histológica em hematoxilina e eosina (HE) dos scaffolds ..	64
5.2 Obtenção de tecido adiposo.....	64
5.2.1 Expansão e viabilidade celular	65
5.2.2 Teste de controle de qualidade das ASC	66
5.3 Experimentos de diferenciação celular.....	69
5.3.1 Adesão celular ao scaffold 3D.....	69
5.3.2 Endotelização do scaffold de veia cava inferior.....	70
5.3.3 Diferenciação celular em musculo liso.....	75
5.3.4 Semeadura do musculo liso no scaffold endotelizado.....	76
5.4 Determinação do perfil de interleucinas do sobrenadante.....	81
5.5 Análise da expressão de miRNAs	82
6. DISCUSSÃO.....	95
7. CONCLUSÃO.....	99
8. Referências	100
ANEXOS.....	112
Tabelas suplementares.....	115
Atividades científicas	176

Revisão de Literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1. Circulação periférica

1.1 Fisiologia dos grandes vasos sanguíneos

O sistema circulatório ou sistema cardiovascular é representado pelo conjunto formado pelo coração e vasos sanguíneos. Esse sistema é responsável pelo transporte das células sanguíneas e demais componentes do sangue para todas as partes do corpo. Dessa forma, a circulação sanguínea tem como principal função o transporte de oxigênio, nutrientes, hormônios e eliminação dos produtos do metabolismo e do gás carbônico, bem como, manter o equilíbrio do organismo (homeostase), para que as células e sistemas possam desempenhar sua funcionalidade. De modo geral, a grande circulação é composta por vasos sanguíneos, denominados artérias quando saem do coração e veias quando drenam ao coração.¹ As artérias promovem o transporte sanguíneo diante à alta pressão (Figura 1A),¹ por outro lado, as veias transportam o sangue em uma pressão mais baixa. Portanto, as artérias apresentam uma parede com camada muscular suficientemente forte para resistir e controlar a pressões sanguíneas e as veias apresentam uma parede mais fina e elástica, capaz de se contrair e expandir, de acordo com as necessidades fisiológicas de contenção dos volumes sanguíneos como resposta aos estímulos gerados pelo ambiente e também internos do organismo (Figura 1B).¹

Cerca de 16% do volume sanguíneo total se encontra no coração e 84% na circulação sistêmica, destes 64% são veias, 13% são artérias e 7% arteríolas e capilares.¹ Desta forma, a pressão gerada pelo fluxo sanguíneo na entrada das artérias é de 100mmHg e, à medida que o sangue flui para vasos de menor calibre, a pressão média cai, chegando a valores inferiores a 10mmHg, nos capilares sanguíneos das extremidades do corpo.¹

Para que se mantenha um bom funcionamento da circulação sanguínea, ou seja, uma suficiência de perfusão aos tecidos, é necessário um equilíbrio preciso no

funcionamento do *tônus* vascular.²⁻⁴ O funcionamento do *tônus* da musculatura vascular é regulado pelo endotélio vascular através da produção de mediadores que podem produzir vasodilatação: óxido nítrico (NO); fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); e a prostaciclina, ou vasoconstrição: prostaglandina H₂, (PGH₂), tromboxana A₂; angiotensina II (Ang II); endotelina-1 (ET-1); e os ânions superóxido ou espécies reativas de oxigênio (ROS).³⁻⁷

Entretanto, em algumas situações fisiopatológicas, como na hipertensão arterial sistêmica (HAS), ocorre a disfunção na liberação dos fatores mediadores do *tônus* vascular, levando ao aumento dos fatores de vasoconstrição e diminuindo os fatores de vasodilatação, determinando, com o passar do tempo, disfunção endotelial.^{4,5,8} A disfunção do *tônus* muscular em associação com a disfunção endotelial pode levar a outras alterações do sistema vascular, como o surgimento de uma hipertrofia miointimal, aumento de rigidez arterial e um *feedback* de remodelação do músculo liso com diminuição do lúmen arterial.^{4,5,8}

O remodelamento vascular induz a proliferação e migração direcionada de células vasculares/endoteliais combinada com a capacidade do sistema vascular em se adaptar de acordo com as condições do organismo, sendo que estes são os principais fatores no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a arteriosclerose, reestenose após angioplastia transluminal e hipertensão arterial.^{4,5,8}

A arteriosclerose apresenta três variações: aterosclerose, que se origina da formação de ateromas (lipídios, carboidratos, componentes do sangue, cálcio e tecido fibroso) nas grandes e médias artérias; esclerose calcificante da média (esclerose de Mönckberg), que decorre da fibrose seguida da calcificação da camada média nas artérias de maior calibre e predispõe a ocorrência de aneurismas; e a arteriolosclerose, que é a variante morfológica que decorre da proliferação fibromuscular ou endotelial em artérias de pequeno calibre ou arteríolas.

Em relação a aterosclerose, sabe-se que o processo advém do acúmulo de lipídeos no espaço subendotelial, levando a um processo inflamatório reacional e uma série de disfunções endoteliais, promovendo a fagocitose do LDL oxidado por macrófagos que se transformam em células espumosas e acúmulo de detritos do

processo inflamatório subendoteliais. Tais complexos de células espumosas progridem e evoluem com a possibilidade de formação de placas vulneráveis, passíveis de eventos tromboembólicos, o que pode se traduzir em eventos cardiovasculares agudos ou progressivos, sendo este último a causa mais provável da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP).⁹

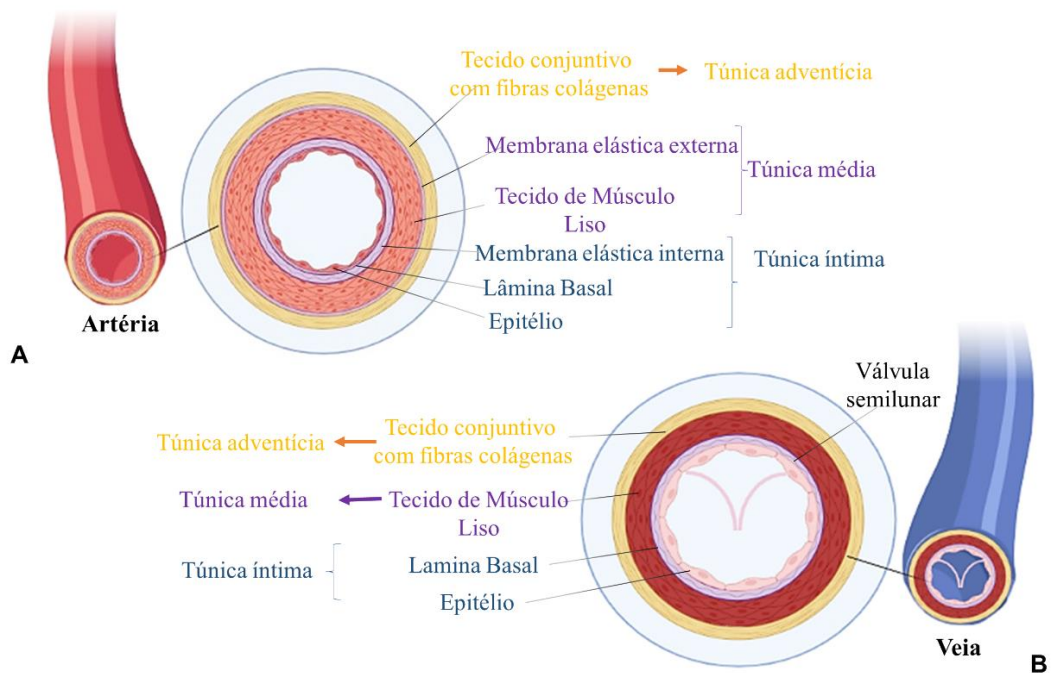


Figura 1. Esquema da estrutura de grandes vasos sanguíneos. **A:** Artéria; **B:** Veia. **Autoria própria**

1.2 Doença arterial periférica

As doenças cardiovasculares representam as maiores causas de mortalidade da população ocidental adulta e estima-se que 5% da população com idade superior a 50 anos são portadores de DAOP.¹⁰⁻¹⁷ Isso significa o acometimento da circulação arterial dos membros inferiores por obstruções ao fluxo sanguíneo em decorrência do processo degenerativo ou não degenerativo da parede arterial.¹⁸⁻²⁰ Sua origem se deve ao processo de aterosclerose, ou seja, a formação de placas obstrutivas na circulação arterial, cuja etiologia se deve a associação de características próprias do envelhecimento com diversos fatores de risco.^{14,15} Entre os principais fatores de

risco estão a hipertensão arterial, idade avançada, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade, tabagismo, hiperuricemia, hiperomocisteinemia, entre outros.¹⁴ Essa patologia tem característica progressiva, apresentando-se clinicamente como causa de limitação para a caminhada, podendo chegar aos estados mais críticos da doença, onde o indivíduo passa a apresentar claudicação incapacitante, dor em repouso, úlceras de difícil cicatrização e progressão para gangrenas, com necessidade de amputações menores ou maiores (perda do membro acometido).^{14,15} Aproximadamente 20 a 30% dos portadores de DAOP em estado avançado não serão candidatos ao tratamento cirúrgico restaurador por qualquer dos métodos existentes.¹⁵ Em geral, isso se deve a gravidade da doença, afetando a circulação arterial troncular com extensão até os vasos de médio calibre, além do possível comprometimento da microcirculação.²¹ Além disso, casos em que 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.²²

1.3 Revascularização cirúrgica por enxerto ou bypass

Na prática cirúrgica cardiovascular, é bem estabelecido que para determinadas situações o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica, tanto coronariana, quanto periférica, requerem a realização de procedimento cirúrgico de revascularização com a realização de pontes, enxertos ou *bypass*.^{14,15,23} Basicamente, o substituto vascular ideal seria um vaso sanguíneo com as mesmas características da artéria que se deseja substituir.²⁴ Naturalmente, isso não é possível na maior parte das vezes, tendo em vista que a utilização de uma artéria autóloga pode promover isquemia do território doador. O substituto mais amplamente utilizado tem sido a veia safena magna autóloga, explantada no mesmo ato cirúrgico.^{25,26} Esse procedimento é considerado como o de melhor resultado em termos de patência, ou seja, perviedade sanguínea ao longo do tempo, para a cirurgia vascular periférica.²⁴ 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, pode-se utilizar substitutos arteriais sintéticos como próteses de Dacron® ou politetrafluoretileno (PTFE). Tais materiais não podem ser utilizados de forma irrestrita, principalmente devido a intolerância dos materiais sintéticos a infecções do sítio cirúrgico ou mesmo a distância.²⁷ Quando se pretende revascularizar artérias de pequeno calibre como artérias da perna ou dos pés, entre outros, há uma limitação para o uso de próteses, uma vez que, apresenta diminuição da patência nessas situações.^{14,15} Nestes casos, muitas vezes o cirurgião não tem muitas opções e acaba por realizar procedimentos com baixas patência, conhecidos como técnicas de salvamento de membros, o que pode resultar em altas taxas de insucesso e culminar com amputação. Nesses casos, a TEBV encontra vasto caminho de desenvolvimento como forma de auxiliar o cirurgião e aumentar a qualidade de vida para os doentes.

1.4 Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos

Desde 1987 pesquisadores vêm utilizando e aprimorando as técnicas de engenharia de tecidos para o desenvolvimento de substitutos cirúrgicos de diversos tecidos acometidos por doenças ou degeneração. Os primeiros relatos da utilização desta técnica, foi através de pesquisas que exploraram o potencial dessa tecnologia a partir de testes para produção de cartilagem, válvulas cardíacas, endotelização de pontes sintéticas, porém realizados de uma forma muito mais simples do que pudesse chegar a aplicação clínica definitiva.²⁸⁻³⁴

A engenharia de tecidos (ET) é uma nova tecnologia que combina células, conceitos de engenharia e material biológico/sintético como forma de reparar, substituir ou regenerar tecidos biológicos, com finalidade terapêutica.³⁵⁻³⁷ As principais aplicações vislumbradas para a ET em humanos são a produção de tecidos como: pele, osso, cartilagem, córneas, vasos sanguíneos, brônquio principal esquerdo, traqueia, estruturas urinárias entre outros.³⁵⁻⁴¹ Diversas estratégias são apresentadas em literatura como forma de vencer os desafios para o fornecimento de estruturas que sirvam como suportes ou *scaffolds* em ET, sendo necessário que

se atendam critérios sobre as características mais desejáveis para as diversas aplicações, incluindo características como: ser biodegradável; possuir resistência mecânica; ser altamente poroso; ser biocompatível e não ser citotóxico; não ser antigênico; ser promotor de adesão, proliferação e diferenciação celular; ser flexível e elástico; apresentar características tridimensionais (3D) semelhantes ao tecido que pretende substituir; ser osteocondutor no caso de substitutos ósseos; e suportar o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos.³⁵⁻³⁷

A ET em vasos sanguíneos é proveniente do termo em inglês *tissue engineering into blood vessels* (TEBV), cujo objetivo é o desenvolvimento de um substituto vascular ideal com semelhança na atividade biológica e estruturação de artérias ou veias para que possa substituir e restaurar de forma equilibrada as funções do tecido vascular danificado, principalmente pela aterosclerose.³⁵ Dessa forma, a TEBV busca gerar substitutos para os vasos sanguíneos que possam mimetizar as funções biológicas e a anatomia do tecido natural, sendo esta proposta mais aplicável para o tratamento substitutivo de artérias acometidas por aterosclerose, de forma mais apropriada para doentes portadores de DAOP, cujas limitações terapêuticas, hoje existentes, não conseguem diminuir o número de amputações de membros inferiores. Com essa alternativa, muitos doentes terão a possibilidade de receber tratamento cirúrgico baseado em medicina personalizada, com by-pass/pontes produzidas especificamente para eles, com células autólogas e com propriedades bioquímicas, mecânicas, e estruturais específicas, como espessura e comprimento, necessários para revascularização, resultando em pontes mais duradouras (maior de patência).^{8,41-44} A TEBV, fundamenta-se no desenvolvimento de *scaffolds* 3D tubulares, que sejam biocompatíveis e sirvam como substituto para o tecido vascular. Tais materiais podem ser obtidos de fontes naturais (vasos descelularizados ou macromoléculas do organismo, como colágeno e fibrina) ou sintéticas [polímeros biodegradáveis como o ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA)].⁴⁴ Entretanto, os *scaffolds* derivados de materiais naturais possuem algumas vantagens em relação aos sintéticos, pois tem a

capacidade de preservar a estrutura 3D , composição de matriz extracelular (MEC) e resistência mecânica, mantidas em relação ao tecido natural de origem.⁴⁴

A obtenção de *scaffolds* naturais, através da técnica de descellularização de tecidos, têm demonstrado excelentes resultados para aplicação na ET. A descellularização promove a remoção dos conteúdos celulares e nucleares das células do tecido, preservando assim a matriz extracelular, e minimizando os riscos de imunogenicidade.^{41,45} Apesar de tudo, ainda não existem protocolos padronizados e específicos para cada tecido submetido a descellularização, o que dificulta a reprodução da técnica e o escalonamento da produção dos *scaffolds* para uso clínico, mesmo que futuro.

A preservação da estrutura da MEC na descellularização (MECdesc) de tecidos, denominado como *scaffold* natural, fornece uma estrutura 3D simplificada para uso em ET e uma melhor interação entre as células e a MECdesc, o que teoricamente facilitaria crescimento celular e regeneração tecidual.⁴⁶ A MECdesc possui características específicas do microambiente celular ideal, possui alta biocompatibilidade e resistência mecânica e, por esse motivo, seria um meio microambiente propício para a colonização celular.⁴⁷⁻⁴⁹ A utilização de *scaffold* de MECdesc de diversos tecidos tem apresentado vantagens significativas em experimentos de semeadura, expansão e diferenciação celular *in vitro*, incluindo facilidades para obtenção dos fenótipos desejados, reversão da senescência e orientação da diferenciação celular de interesse.⁴⁷⁻⁵⁰ Mais importante ainda, as técnicas de utilização MECdesc como recursos para montagem de *scaffold* em ET promovem o desenvolvimento de estruturas semelhantes à *in natura*, principalmente relacionadas às propriedades biomecânicas e, portanto, os MECdesc vêm sendo amplamente utilizados em pesquisas para a reconstrução de tecido ósseo, cartilaginoso, nervos periféricos, pele e vasos sanguíneos.^{47,49}

Embora existam pesquisas explorando diversas técnicas para o desenvolvimento da TEBV em busca de encontrar os melhores substitutivos vasculares para o tratamento de DAOP e outras doenças cardiovasculares, ainda não foi possível disponibilizar um produto adequadamente desenvolvido para testes

clínicos em maior escala, sendo necessário grande investimento em pesquisas para que essa ferramenta possa ser aplicada com segurança nos casos selecionados para isso, resultando em maiores taxas de salvamento de membros.

INTRODUÇÃO

1. Engenharia de tecidos em vasos sanguíneos

O cultivo de células-tronco mesenquimais (CTM) e a descoberta de técnicas que promovem a sua diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a ET.^{50,51-60} As pesquisas com células-tronco avançam em territórios onde a medicina tradicional apresenta limitações, sendo conhecidos como fronteiras do conhecimento científico.⁴³ Dessa forma, essas pesquisas podem contribuir em solucionar situações específicas para os portadores de doenças cardiovasculares.⁴²

Um dos maiores desafios da TEBV é produzir *scaffold* tridimensionais (3D) biocompatíveis, tubulares, com um microambiente mimetizando a arquitetura natural do tecido *in vivo* e tenham características que favoreçam a adesão celular, a diferenciação celular, a permeabilidade de nutrientes através do tecido, a integração como tecido receptor, resistência às forças mecânicas do fluxo sanguíneo, entre outros.⁶¹⁻⁶⁶

1.1 Descelularização da veia

Os *scaffolds* a serem utilizados na TEBV podem ser biológicos, obtidos de tecidos naturais e descelularizados, ou sintéticos, obtidos pela manipulação de materiais absorvíveis como o ácido poliglicólico (PLG), o ácido polilático (PLA), entre outros, que podem ser configurados em estruturas tubulares tridimensionais (3D), como visto previamente.⁶⁷ Dentre as vantagens dos *scaffolds* sintéticos, sabe-se que estes não induzem reações imunogênicas, por outro lado, não há comprovação científica da persistência do suporte mecânico ao longo do tempo.⁶⁷⁻

70

A utilização do *scaffold* biológico apresenta algumas vantagens estruturais, tanto pela forma tubular 3D como pelas características próprias da MEC natural; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta uma adequada eliminação dos componentes celulares para se evitar uma possível reação imunológica no momento de aplicação no receptor do novo tecido.⁷¹ 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 consequentemente expor o receptor aos riscos da perda do enxerto, inclusive risco de complicações que podem levar a óbito.^{72,73}

O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear imunogênicos, preservando a integridade estrutural e propriedades mecânicas da MECdesc, sendo considerado um ambiente propício para o repovoamento celular.⁶⁷ 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 implantação da matriz no organismo.⁶³ 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.^{62,63}

Estudos experimentais prévios, realizados pela nossa equipe, demonstraram que, no caso específico do modelo animal escolhido (em coelhos), as veias cavas inferiores (VCI) podem ser descelularizadas, mantendo boa estruturação da matriz. Dessa forma, concluiu-se que estas são aptas a servirem como *scaffold* tubular 3D e capazes de receber e integrar-se com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (do inglês, *adipose-tissue derived stem cell* - ASC), inclusive com diferenciação em endotélio.⁶² Determinou-se também que o processo de descelularização da veia não acarreta toxicidade residual significativa ou perda das características essenciais da MEC.⁶³ Diante dos avanços obtidos, apresentamos a continuidade do modelo experimental que visa completar o desenvolvimento do método de TEBV e comprovar a segurança e eficácia da estrutura constituída por experimentos que serão melhor descritos a seguir através de testes experimentais *in vitro* e *in vivo* (modelo animal).

Neste caso, como se pretende utilizar o *scaffold* de veia cava inferior de

coelho descelularizada que se caracteriza por ser um tecido bastante delicado; o protocolo elencado como mais seguro e eficaz será a reprodução da técnica previamente padronizada nos estudos já realizados, com o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS).⁵⁴ O SDS é um composto orgânico com propriedades surfactantes (aniônicas). Dada a sua estrutura, esta molécula possui propriedades anfifílicas, sendo comumente utilizado na indústria de detergentes, com a finalidade de remover resíduos oleosos, mas também funciona como desnaturante de proteínas, além de outros usos.^{74,75}

1.2 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (ASCs)

As ASCs estão presentes em maior ou menor quantidade em todos os tecidos do organismo após a fase embrionária, sendo mais facilmente obtidas dos tecidos onde são mais abundantes, preferindo-se utilizar em pesquisa as encontradas em sangue de cordão umbilical⁷⁶, medula óssea⁷⁷ e tecido adiposo⁷⁸.

O tecido adiposo representa uma fonte de CTM com grande concentração celular, de fácil obtenção cirúrgica e praticamente isento de contraindicações para sua obtenção.⁷⁹ A fração do estroma vascular do tecido adiposo se tornou foco de investigações após a comprovação de que ele é capaz de fornecer as ASCs, que são multipotentes e altamente replicantes *in vitro*, apresentando, assim, vantagens potenciais para as aplicações na engenharia de tecidos.^{38,73,77-81}

Contudo, a preparação das células em laboratório para a cultura não é idêntica. A maioria dos pesquisadores isolam as ASCs obtidas de tecido adiposo através da metodologia onde os tecidos são digeridos com collagenase e o fracionamento é feito por centrifugação, permitindo sua expansão *in vitro*.^{82,83}

A Sociedade Internacional para Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy – ISCT, em inglês) 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).^{76,82,83}

O uso dessas células em Medicina Regenerativa implica em isolamento e expansão sem a perda da capacidade de pluripotência.⁸⁴ Muitos estudos têm isolado as ASCs 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.^{85,86}

1.3 Endotélio

A célula endotelial (CE) foi, por muito tempo, considerada somente como uma barreira anatômica de prevenção do extravasamento do sangue para o meio externo aos vasos sanguíneos.²¹ Posteriormente, descobriu-se que o endotélio vascular representa um sistema orgânico bastante complexo, metabolicamente ativo e que é capaz de manter a homeostase do organismo.²¹ Isso se faz através do seu controle sobre o tônus vascular, a regulação do transporte de solutos, o controle da indução do crescimento celular local, a deposição de matriz extracelular para protegê-lo contra as injúrias das substâncias transportadas pelo sangue, a regulação de respostas hemostáticas frente a injúrias de sua parede, as reações inflamatórias e reparadoras dos tecidos por onde passa.²¹ As CEs são histologicamente poligonais, uniformes, arranjadas em monocamada (como ladrilhos alongados), com ordenação paralela ao fluxo sanguíneo, medindo esta camada entre 25 e 50µm de largura, são achatadas e isoladamente podem medir até 3µm de espessura na região que contém o núcleo. Como característica específica, as CEs, além de conter todas as organelas comuns a outras células, apresentam uma organela especial chamada de corpúsculo de Weibel-Palade, que armazena o Fator de von Willebrand (FvW) e a p-selectina, importantes no controle de agregação plaquetária e adesão celular.⁸⁷

Um avanço fundamental para a compreensão da fisiologia vascular foi quando se demonstrou que CEs contribuem ativamente na modulação do tônus vascular atuando sobre o músculo liso da parede, através da produção e liberação de: fatores de contração (EDCFs) como endotelina-1 (ET-1), tromboxano A2 (TX-A2), prostaglandina H2 (PGH2), e ânions superóxido; e fatores de relaxamento

(EDRFs) como prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e óxido nítrico (NO), permitindo o desenvolvimento de fármacos, principalmente para o controle da hipertensão arterial sistêmica (HAS).²¹

Normalmente, há predomínio na liberação de EDRFs pelo estímulo de neurotransmissores, hormônios, substâncias derivadas das plaquetas e do sistema de coagulação, EDCFs e pela tensão de cisalhamento do próprio fluxo sanguíneo.^{88,89} O NO é o mediador primário da vasodilatação.⁹⁰ Assim, o endotélio intacto, frente à agregação plaquetária, libera EDRFs que atuam no músculo liso promovendo a inibição da perpetuação do processo, atuando como um *feedback* negativo.⁹⁰

As CEs, além de sua interface com carga negativa antitrombótica, produzem substâncias que atuam na regulação da coagulação sanguínea como a substância ativadora do fator VII, FvW, antitrombina (antitrombina III), macroglobulina- α_2 , tromboplastina inativada e possui em seu glicocálice de membrana celular sulfato de heparan.²¹ Produz enzimas que participam de importantes reações anabólicas e catabólicas do organismo, como oxirredutores, hidrolases, adenilciclases, descarboxilases, monaminoxidase e colinesterase, além de apresentar receptores para numerosos agentes vasoativos como a noradrenalina, acetilcolina, 5-hidroxitriptamina, propranolol, angiotensina II e histaminas. Produzem ainda, quando estimuladas, moléculas de adesão leucocitária (*Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule* - ELAMs) que tem grande importância nos fenômenos inflamatórios.^{90,91}

1.4 Músculo liso vascular

Os vasos sanguíneos são histologicamente formados por três camadas, internamente a túnica íntima, túnica média e externamente a túnica adventícia.⁹²

A composição de cada camada é variável de acordo com o tipo e calibre do vaso.⁹² A parede vascular, com exceção dos capilares, apresenta uma arquitetura complexa e propriedade mecânica única, estruturada a partir de três tipos de células: CE na túnica íntima; células musculares lisas (CML) na túnica média; e fibroblastos

na túnica adventícia, além de outras células de permeio. Dentre elas, as CE e as CML têm papel principal na manutenção da integridade, propriedades mecânicas e função do vaso sanguíneo.⁹²

Levando-se em consideração as artérias de grande e médio calibre, conhecidas como artérias elásticas, estas apresentam a seguinte conformação: túnica íntima - contendo o endotélio, subendotélio e lâmina elástica interna; túnica média – contendo células musculares lisas organizadas de forma helicoidal, fibras e lamelas elásticas, fibras reticulares (colágeno tipo III e IV), proteoglicanas e glicoproteínas e lâmina elástica externa; túnica adventícia – consistindo de colágeno tipo I e fibras elásticas, se continuando com o tecido conjuntivo no qual o vaso está inserido.⁹² Como parte fundamental da homeostase do vaso sanguíneo a relação entre as CE e as CML mantém o tônus vascular. Dessa forma, pretende-se que o neovaso produzido por ET possua uma camada muscular organizada e suficiente para a anastomose em uma artéria elástica.

Além disso, deve se levar em consideração que a funcionalidade vascular é representada não somente por suas características morfofuncionais, mas também pela sua capacidade de reação frente a estímulos bioquímicos endógenos, o que pode ser avaliado *in vitro* através de testes de reatividade vascular frente a estímulos farmacológicos, visando o desempenho na sua contração e relaxamento, de forma dependente ou não da ação do endotélio.⁹³⁻⁹⁵

As CMLs têm a principal função de dar suporte para a estrutura do vaso sanguíneo, bem como, manter a pressão intravascular e a perfusão tecidual através da regulação do tônus vascular. As CMLs apresentam mais plasticidade do que outros tipos de células, devido a diferentes funções do tecido, incluindo contração, proliferação e síntese de MEC.⁹⁶

Diante de condições fisiopatológicas, ou seja, remodelação vascular ocasionado por uma disfunção ou dano endotelial do tecido, as CMLs migram para a região e se multiplicam para contribuir com o restauro da lesão neointimal, entretanto, evidências científicas sugerem que o recrutamento excessivo células-

tronco/progenitoras encontrados no vaso são responsáveis pelo acúmulo de CML na íntima durante a remodelação vascular, podendo ocasionar hiperplasia neointimal e arteriosclerose. Portanto, entender os mecanismos regulatórios que controlam a diferenciação de CML de progenitores vasculares é essencial para explorar alvos terapêuticos para potenciais aplicações clínicas.⁹⁷

As CML que se originam da diferenciação embrionária demonstram altas taxas de proliferação e migração celular, no entanto, produzem uma grande quantidade de proteínas e fatores da matriz extracelular, que são diferentes daqueles secretados por CML adultos imaturos, mas necessários para que ocorra a angiogênese vascular.⁹⁸

No desenvolvimento do músculo liso, é necessário o envolvimento de várias vias de sinalização, como, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF- β) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) que são quimioatrativos e auxiliam na migração de células murais que expressam o receptor de PDGF- β e desempenham múltiplas funções na proliferação ou diferenciação.⁹⁷ O proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) atua na expressão transitória do marcador inicial do mesoderma, como na indução de fatores de transição cardíaca e diferenciação em cardiomíocitos.⁹⁹⁻¹⁰²

Com tudo, para estabelecer uma estratégia para obter célula de músculo liso vascular (VSMC), de origem autóloga, é altamente desejado na TEBV para produção de vasos sanguíneos funcionais, porém realizar isso de forma autóloga através de vasos maduros nem sempre é possível.¹⁰³⁻¹⁰⁴ Portanto, a indução bioquímica com utilização de fatores de crescimento é uma estratégia utilizada para diferenciar ASCs em células contráteis semelhantes a VSMC e manter seu fenótipo VSMC para reconstrução de tecidos.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Por outro lado, as vias moleculares envolvidas em todos esses processos são extremamente complexas e intrincadas, sendo fundamental a evolução nesse campo para melhores resultados em TEBV.

1.5 microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são ribonucleotídeos (RNAs) pequenos, de aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, não codificadores, que atuam na regulação da expressão gênica. Os miRNAs estão envolvidos em inúmeros processos como controle de genes associados ao ciclo celular, proliferação e diferenciação celular entre outros processos.¹⁰⁸⁻¹¹⁴ Os miRNAs atuam por meio de complementaridade de bases com moléculas de RNA mensageiro (mRNA), podendo esta ser parcial ou total com a sequência-alvo de um ou mais RNAs mensageiros. A ligação ocorre entre a região 5' UTR (do inglês, untranslated region – UTR) de uma molécula de miRNA com a região 3' UTR de um mRNA, em sequências de nucleotídeos no mRNA denominadas “seed”.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Os miRNAs geralmente levam à repressão pós-translacional da expressão gênica, por meio de clivagem de mRNA ou deadenilação.^{109,110} Uma característica importante dos miRNAs é a capacidade de ligação e controle da expressão de vários mRNAs-alvo, simultaneamente, sendo que um mesmo mRNA-alvo também pode ter sua regulação gênica controlada por diferentes miRNAs.¹¹⁴ Adicionalmente, os miRNAs possuem especificidade tecidual, sendo que nem todos os miRNAs encontram-se expressos nos mesmos tecidos.¹¹⁷⁻¹²⁰

Os miRNAs desempenham papel na regulação de genes envolvidos nos processos de autorrenovação e diferenciação celular. Portanto, atuam no controle pós-transcricional de genes específicos das CTM associadas ao sistema vascular, diferenciação e desenvolvimento do sistema cardiovascular.¹²¹⁻¹²³ De fato, estudos indicam que alterações em miRNAs podem resultar no comprometimento, de moderado a grave, do desenvolvimento do sistema cardiovascular.¹²³ Há relatos do papel de miRNAs específicos na diferenciação de células-tronco em células endoteliais vasculares ou na regulação da expressão gênica de células endoteliais; tais miRNAs incluem miR-99b, miR-181a, miR-181b, miR-6086, miR-6087 e miR-5739. No entanto, o papel dos miRNAs na diferenciação de células endoteliais e no desenvolvimento do sistema cardiovascular ainda precisa ser melhor elucidado, bem como seu envolvimento em doenças vasculares.¹²⁴⁻¹²⁶

Enxertos vasculares produzidos através da TEBV, se mostram uma fonte não limitada de suprimentos e podendo oferecer compatibilidade imunológica, resistência, capacidade de remodelação e autorreparação.¹²⁷ A produção de um neovaso funcional a partir de um *bioscaffold* por TEBV apresenta um equilíbrio delicado de regulação biomolecular, envolvendo as vias de migração, proliferação e diferenciação celular, sendo que muitas dessas vias são controladas por miRNAs, que em desarranjo podem levar a problemas após o implante, como hiperplasia neointimal e/ou estenose/oclusão.¹²⁸⁻¹³⁴

Com base embriológica, mas também reparadora, a angiogênese é responsável por controlar os processos fisiológicos normais e patológicos, regulando vários eventos de sinalização molecular e garantindo a interação entre vários tipos de células, tendo como principais etapas ativação de células endoteliais, degradação enzimática da membrana basal capilar, proliferação de células endoteliais e migração direcionada, fusão de vasos, diminuição e estabilização dos pericitos e formação da rede capilar.¹³⁵⁻¹³⁸ Este processo ocorre através dos reguladores angiogênicos e moléculas sinalizadoras, incluindo fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), Fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), Interferon, Metaloproteinase de matriz-1/9 (MMP-1/9); através de seus estimuladores angiogênicos como Angiogenina, Angiopoietina, Fator de crescimento transformador α/β (TGF α/β). Além do controle negativo, através de inibidores angiogênicos como a Angioarrestina, Interleucina 12, fragmento de fibronectina e Angiostatina.¹³⁵⁻¹³⁸ Direta ou indiretamente, a angiogênese é regulada através da expressão de miRNAs.^{139,141}

Os miRNAs também atuam na regulação do processo fisiológico ou patológico da regulação vascular, tanto na sinalização para a adesão e proliferação celular, captação e fluxo de lipídios e geração de mediadores inflamatórios, fornecendo novos *insights* biomoleculares sobre a aterosclerose e possíveis alvos terapêuticos.¹²⁵ Em resposta a lesão e outros estímulos, os níveis de expressão de

proteínas contráteis são diminuídos e os níveis de expressão de proteínas em proliferação são aumentados nas células do músculo liso vascular (VSMCs); essas alterações levam ao aumento da proliferação celular e tem papel na patogênese de várias doenças cardiovasculares, incluindo reestenose vascular após angioplastia.^{134,142}

Certos miRNAs como miR-126, miR-221/222, miR-17-92 cluster, miR-93, let-7f, miR-214 são relatados para modular a resposta do endotélio vascular a estímulos angiogênicos.¹³⁵ O termo angiomiRNAs foi proposto para miRNAs que regulam a angiogênese.¹³⁸⁻¹⁴⁴ Vários miRNAs são encontrados para ter expressão ectópica apenas em CE com expressão específica apenas em células de linhagem endotelial.¹⁴⁵ Esses miRNAs afetam a angiogênese interagindo com várias moléculas-chave em diferentes tipos de células (Tabela 1).

Tabela 1. miRNAs pró-angiogênicos e anti-angiogênicos ^{140,143, 146-157}			
Tipo	miRNA	Alvo	Função
Pró-angiogênico	miR-126	SPRED-1, PIK3R2, VECAM-1	Promove a sinalização AKT e ERK dependente de VEGF desreprimindo o p85
	miR-210	Ephrin-A3	Estimulação da formação do tipo capilar e quimiotaxia EC em resposta ao VEGF
	miR-10b and 9b	HOX Pathway	Aumentar a proliferação de células endoteliais em resposta ao VEGF
	Let-7b, 7f	Let-7b: TIMP1 Let-7f: TSP-1	Regular a formação de brotos
	miR-132	p120RasGAP	Facilita a proliferação de células endoteliais ao regular negativamente p120RasGAP
	miR-378	Sufu, Fus1	Promove a migração de células endoteliais, formação de tubos e angiogênese tumoral in vivo
	miR-17-92 cluster	TIMP1, TSR, VEGF	Promover a divisão celular endotelial, migração
Anti-angiogenic	miR-24	GATA4, PAK 2	Inibe a angiogênese
	miR-195	VEGF, VAB2, CDC 42	Suprime a angiogênese e a metástase no carcinoma hepatocelular
	miR-221/miR-222	c-kit, eNOS	Inibe a migração e proliferação da célula endotelial
	miR-328	CD 44	Reduz a formação de estrutura capilar
	miR-15b/miR-16	VEGF	Induzir apoptose celular
	miR-192	EGR1, HOXB9	Reduz globalmente a via angiogênica

Dessa forma, o estudo dos miRNAs envolvidos na angiogênese, na aterosclerose e nas várias funções vasculares podem contribuir com a elucidação das bases biomoleculares normais e patológicas dos vasos sanguíneos, contribuindo

sobretudo com a TEBV e sua evolução para atender ao que se propõe.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

O modelo biológico de *scaffold* de veia cava inferior descelularizada e recelularizado com células endoteliais e músculo liso obtidos por diferenciação celular de células-tronco derivadas de tecido adiposo, *in vitro*, demonstrou boa celularização e diferenciação celular, comprovado por caracterização morfológica. Os tempos necessários para completa obtenção do neovaso pelas técnicas empregadas foi de 8 semanas, sendo 4 semanas para endotelização e mais 4 semanas para integração das células musculares lisas. A análise do perfil global de expressão de miRNAs sugere que inúmeras vias de regulação genética estão envolvidas nos processos de diferenciação endotelial e de músculos lisos da parede vascular, trazendo luz aos mecanismos biomoleculares necessários para a engenharia de tecidos em vasos sanguíneos como uma proposta promissora para o fornecimento de substitutos vasculares no futuro.

Referências

8. Referências

1. Guyton, A.C. e Hall J.E.– Tratado de Fisiologia Médica. Editora Elsevier. 13^a ed., 2017.
2. CARVALHO, MHC et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.
3. Evora, PRB et al. Oxido nítrico e substância vasoativas derivadas do endotélio: papel no controle do tônus vascular. Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo, p. 129-37, 1996.
4. GUADAGNIN, V. et al. Influência do estresse oxidativo sobre a regulação do tônus vascular e a eficácia das terapias antioxidantes. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 12, n. 1, p. 82-89, 2015.
5. CARVALHO, Maria Helena Catelli et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. Rev Bras Hipertens, v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.
6. Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, Körbelin J. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. Cells. 2021 Oct 10;10(10):2712.
7. Thakore P, Ali S, Earley S. Regulation of vascular tone by transient receptor potential ankyrin 1 channels. Curr Top Membr. 2020;85:119-150.
8. Pellegata A. F., Asnaghi M. A., Stefani I., et al. Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. BioMed Research International, 2013, 1–8.
9. Yoshida,WB – O processo aterosclerótico : da disfunção endotelial à lesão complexa. In: Kauffman. Doença aterosclerótica periférica , BBS ed., 2^a ed., 2007.
10. Allison M.A, Ho E., Denenberg J.O.,et al. Ethnic-specific prevalence of peripheral arterial disease in the United States. Am J Prev Med. 2007;32:328–333.
11. Selvin E., Erlinger T.P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. Circulation. 2004;110:738–743.
12. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. Circulation research 2015;116:1509-1526.
13. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, et al. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. Circulation research 2016;118:535-546.
14. TASC Steering Committee, Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkes GR, Dormandy J, Razavi M, Reekers J, Norgren L. An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Vasc Med. 2015 Oct;20(5):465-78.

15. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Journal of vascular surgery* 2007;45:S5-S67.
16. Lane R, Harwood A, Watson L, Leng GC. Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Dec 26;12(12):CD000990.
17. Lambert M, Belch J. Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? *Journal of internal medicine* 2013;274:295-307
18. Yoshida WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros. *J Vasc Br* 2005;4 316-8.
19. Uccioli L, Meloni M, Izzo V, Giurato L, Merolla S, Gandini R. Critical limb ischemia: current challenges and future prospects. *Vasc Health Risk Manag*. 2018;14:63-74.
20. Reis PEO. Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br*. 2005;4:366-70.
21. Maffei, F.H.A et al. Doenças vasculares periféricas. Guanabara Koogan, 2016.
22. Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's vascular surgery. Elsevier Health Sciences, 2014.
23. Montrieff T, Koyfman A, Long B. Coronary artery bypass graft surgery complications: A review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med*. 2018 Dec;36(12):2289-2297
24. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. *In vivo* applications of electrospun tissue- engineered vascular grafts: a review. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2014; 20:628- 640.
25. Sukovatykh BS, Belikov LN, Sukovatykh MB, Sidorov DV, Inarkhov MA, Inokhodova EB. Rezul'taty primeneniya razlichnykh sposobov avtovenoznogo bedrenno-podkolennogo shuntirovaniya nizhe shcheli kolennogo sustava [Results of using various methods of autovenous femoropopliteal bypass grafting below the knee-joint fissure]. *Angiol Sosud Khir*. 2016;22(4):137-143. Russian.
26. Gaudino M, Taggart D, Suma H, Puskas JD, Crea F, Massetti M. The choice of conduits in coronary artery bypass surgery. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66:1729- 1737.
27. Leroy O, Meybeck A, Sarraz-Bournet B, d'Elia P, Legout L. Vascular graft infections. *Current opinion in infectious diseases* 2012; 25:154-158.
28. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg*. 1991;88:753-59.
29. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg*. 1995;60:S513-16.

30. Deutsch M, Meinhart J, Vesely M, et al. *In vitro* endothelialization of expanded polytetrafluoroethylene grafts: a clinical case report after 41 months of implantation. *J Vasc Surg.* 1997;25:757–63.
31. Zilla P, Fasol R, Deutsch M, et al. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg.* 1987;6:535–41
32. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;2:403–30.
33. He J, Zhang X, Xia X, Han M, Li F, Li C, Li Y, Gao D. Organoid technology for tissue engineering. *J Mol Cell Biol.* 2020 Aug 1;12(8):569–579.
34. Sahakyants T, Vacanti JP. Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. *Pediatr Surg Int.* 2020 Oct;36(10):1123–1133.
35. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 2016 Jan;51(1):8–12.
36. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med.* 2017 Jan 14;68:29–40.
37. Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE. Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective. *Molecules.* 2021 Apr 26;26(9):2518.
38. Niklason L.E, Lawson J.H. Bioengineered human blood vessels. *Science.* 2020 Oct 9;370(6513):eaaw8682.
39. Devillard C.D., Marquette C.A. Vascular Tissue Engineering: Challenges and Requirements for an Ideal Large Scale Blood Vessel. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Oct 4;9:721843.
40. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013 Dec;19(6):485–502.
41. Du J., Hu X., Su Y. et al. Gelatin/sodium alginate hydrogel-coated decellularized porcine coronary artery to construct bilayer tissue engineered blood vessels. *Int. J. Biol. Macromol.* 2022, 209, 2070–2083.
42. Bertanha M. Prospects for applications of stem cells in vascular surgery. *Jornal Vascular Brasileiro*, 2016, 15, 173–175.
43. Wang Z, Mithieux SM, Weiss AS. Fabrication Techniques for Vascular and Vascularized Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2019 Oct;8(19):e1900742.
44. Cai, Z., Gu, Y., Cheng, J., et al. Decellularization, cross-linking and heparin immobilization of porcine carotid arteries for tissue engineering vascular grafts. *Cell and Tissue Banking*, 20(4), 569– 578.
45. Pellegata A.F., Asnaghi M.A., Stefani I., et al. Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. *BioMed Research International*, 2013, 1–8.
46. Lee EJ, Kasper FK, Mikos AG. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2014 Feb;42(2):323–37.

47. Guan Y, Yang B, Xu W, et al. Cell-Derived Extracellular Matrix Materials for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2022 Oct;28(5):1007-1021.
48. Ge F, Lu Y, Li Q, Zhang X. Decellularized Extracellular Matrices for Tissue Engineering and Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1250:15-31.
49. Iwaki R, Shoji T, Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shinoka T. Current status of developing tissue engineering vascular technologies. *Expert Opin Biol Ther.* 2022 Mar;22(3):433-440.
50. Stoltz J, de Isla N, Li Y, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. *Stem Cells Int* 2015; 2015:734731.
51. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. Springer, 2011.
52. Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Básica.* 9 ed. Elsevier; 2016.
53. Dong JD, Huang JH, Gao F, Zhu ZH, Zhang J. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering of small-diameter blood vessels. *Vascular.* 2011 Aug;19(4):206-13
54. Ajit A, Santhosh Kumar TR, Krishnan LK. Engineered Human Adipose-Derived Stem Cells Inducing Endothelial Lineage and Angiogenic Response. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019;25(3):148-159
55. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue- engineered human blood vessel. *FASEB J* 1998;12:47-56.
56. 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;168:1697-709.
57. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth- muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* 2006;119:4994- 5005.
58. 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;107:2078-81.
59. Song Y, Feijen J, Grijpma D, Poot A. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts: a literature review. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2011;49:357- 374.
60. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell.* 2018;22(3):340-354.
61. Huang AH, Niklason LE. Engineering of arteries *in vitro*. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(11):2103-18.
62. Bertanha M, Moroz A, Almeida R, et al. Tissue-engineered blood vessel

- substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *Journal Vascular Surgery* 2014;59:1677-1685.
63. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *Experimental cell research* 2014;326:103-111.
64. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, 32, 3233-3243
65. Nagase H, Visse R. Matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, 2006, 68, 562-573.
66. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14, 608-616.
67. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-83.
68. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and *in vivo* relevance. *Methods*. 2015 Aug;84:25-34.
69. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Apr 25;10:805299.
70. Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, et al. Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 30;21(15):5447.
71. Yu XX, Wan CX, Chen HQ. Preparation and endothelialization of decellularised vascular scaffold for tissue-engineered blood vessel. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Jan;19(1):319-26.
72. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, Sung JH, Lu CH, Wei JR, Wang ZW, Huang SJ, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):621-30.
73. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater*. 2021 Sep 23;10:15-31.
74. Somuncu ÖS. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1212:71- 85
75. Aldridge A, Desai A, Owston H, Jennings LM, Fisher J, Rooney P, Kearney JN, Ingham E, Wilshaw SP. Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft. *Cell Tissue Bank*. 2018 Sep;19(3):287-300.
76. Nuruse K. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005;54:1823-8.
77. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell*

- Mol Med 2007;11:945- 57.
78. 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;54:132-41.
79. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells.* 2019 Jul 28;8(8):784
80. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci.* 2019 Sep;76(17):3323- 3348.
81. Freiman A, Shandalov Y, Rosenfeld D, Shor E, Ben-David D, Meretzki S, Levenberg S, Egozi D. Engineering vascularized flaps using adipose-derived microvascular endothelial cells and mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 Jan;12(1):e130-e141.
82. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):641-8.
83. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004;8:301-16.
84. Vigorito AC. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31:280-284
85. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? *J Appl Genet* 2007; 48:307-19.
86. Qadura M, Terenzi DC, Verma S, Al-Omran M, Hess DA. Concise Review: Cell Therapy for Critical Limb Ischemia: An Integrated Review of Preclinical and Clinical Studies. *Stem Cells.* 2018 Feb;36(2):161-171.
87. Pérez S, Bertoft E. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch-Stärke* 2010;62:389-420.
88. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
89. Bkaily G, Abou Abdallah N, Simon Y, Jazzar A, Jacques D. Vascular smooth muscle remodeling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2020 Aug 27:1-8.
90. Pate M, Damarla V, Chi DS, Negi S, Krishnaswamy G. Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. *Adv Clin Chem* 2010;52:109-30.
91. Van Hinsbergh VW. Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* 2011.
92. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 3ª ed., 2017.
93. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive

- species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res.* 2001;89(3):224-36.
94. Durgin BG, Straub AC. Redox control of vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Lab Invest.* 2018;98(10):1254-1262.
95. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87(3):179-83.
96. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13–40.
97. Wang G, Jacquet L, Karamariti E, Xu Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol.* 2015 Jul 15;593(14):3013-30.
98. Shang Y, Yoshida T, Amendt BA, Martin JF, Owens GK. Pitx2 is functionally important in the early stages of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Cell Biol.* 2008;181:461–473.
99. Kami D., Shiojima I., Makino H., Matsumoto K, et al. “Gremlin Enhances the Determined Path to Cardiomyogenesis.” *PLoS ONE* 3 (2008): e2407
100. Parvizi M., Bolhuis-Versteeg L.A., Poot A.A., Harmsen M.C., Efficient generation of smooth muscle cells from adipose-derived stromal cells by 3D mechanical stimulation can substitute the use of growth factors in vascular tissue engineering, *Biotechnol. J.* 11 (2016) 932-944.
101. Dan P., Velot E., Decot V., Menu P., The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells, *J. Cell. Sci.* 128 (2015) 2415-2422.
102. Yoshida T., Owens G.K. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity, *Circ. Res.* 96 (2005) 280-291.
103. L.P. Neff, B.W. Tillman, S.K. Yazdani, M.A. Machingal, J.J. Yoo, S. Soker, B.W. Bernish, R.L. Geary, G.J. Christ, Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels *in vivo*, *J. Vasc. Surg.* 53 (2011) 426-434.
104. J.A. de Villiers, N. Houreld, H. Abrahamse, Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine, *Stem Cell. Rev.* 5 (2009) 256-265.
105. Wang C., Yin S., Cen L.,et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein-4, *Tissue Eng. Part A.* 16 (2010) 1201-1213.
106. Kim M.R., Jeon E.S., Kim Y.M.,et al. Thromboxane a(2) induces differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells, *Stem Cells.* 27 (2009) 191-199.
107. Kim Y.M., Jeon E.S., Kim M.R.,et al. Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 2482-2491.

108. Zhang X, Bendeck MP, Simmons CA, Santerre JP. Deriving vascular smooth muscle cells from mesenchymal stromal cells: Evolving differentiation strategies and current understanding of their mechanisms. *Biomaterials*. 2017 Nov;145:9-22.
109. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(5):376-85.
110. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1812 (5): 592–601.
111. Wang Y, Blelloch R. Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Research*. 2009;69(10):4093–4096.
112. Wang Y, Blelloch R. Cell cycle regulation by microRNAs in stem cells. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2011;53:459–472.
113. Yu Z, et al. miRNAs regulam a auto-renovação e diferenciação das células-tronco. *Fronteiras em genética*. 2012; 3 : 191
114. Rhoades, M.W., et al. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520.
115. Lai, E.C. MicroRNAs are complementary to 3'-UTR sequence motifs that mediate negative posttranscriptional regulation. *Nat. Genet.* 2002. 30: 363-364.
116. Xie, X., *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005. 434: 338-345.
117. Osada, H. and Takahashi, T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2007;28: 2-12.
118. Sandberg, R., *et al.* Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 2008. 320: 1643-1647.
119. Cheng, C., *et al.* The relationship between the evolution of microRNA targets and the length of their UTRs. *BMC Genomics*. 2009. 10: 431.
120. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129: 1401– 1414.
121. Murchison EP, Partridge JF, Tam OH et al. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12135– 12140.
122. Wang Y, Medvid R, Melton C et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 2007; 39: 380– 385.
123. Yang WJ, Yang DD, Na S et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 2005; 280: 9330– 9335.
124. Kane NM, Howard L, Descamps B et al. Role of microRNAs 99b, 181a, and 181b in the differentiation of human embryonic stem cells to vascular endothelial cells. *Stem Cells* 2012; 30: 643– 654.
125. Yoo JK, Kim J, Choi SJ et al. Discovery and characterization of novel microRNAs during endothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21: 2049– 2057.

126. Yoo JK, Kim J, Choi SJ et al. The hsa-miR-5739 modulates the endoglin network in endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 415: 258– 262.
127. Cleary M.A., et al.. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med* 18, 394, 2012; Naito Y., et al.. Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 312, 2011
128. Zampetaki A., and Mayr M. MicroRNAs in vascular and metabolic disease. *Circ Res* 110, 508, 2012
129. Song Z., and Li G. Role of specific microRNAs in regulation of vascular smooth muscle cell differentiation and the response to injury. *J Cardiovasc Transl Res* 3, 246, 2010
130. Xin M., et al.. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev* 23, 2166, 2009
131. Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction-the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular research*.1999;41:345–360
132. Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011;4:104–111.
133. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:812–81
134. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews.* 2004;84:767–801.
135. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22:1276–1312.
136. Tiwari A, Mukherjee B, Dixit M. MicroRNA Key to Angiogenesis Regulation: MiRNA Biology and Therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2018;18(3):266-277. doi: 10.2174/1568009617666170630142725.
137. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473(7347), 298-307.
138. Chung. AS.; Lee, J.; Ferrara, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 2010, 10(7), 505-514.
139. Ribatti, D.; Conconi, MT.; Nussdorfer, GG. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol. Rev.*, 2007, 59, 185-205.
140. Kuehnbacher, A.; Urbich, C.; Zeiher, AM.; Dimmeler, S. Role of dicer and drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.*, 2007, 101(1), 59-68.
141. Wang, S.; Olson, EN. AngiomiRs-Key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2009, 19(3), 205-211
142. Tili E, Michaille JJ, Calin GA. Expressão e função de micro-RNAs em células imunes durante o estado normal ou de doença. *Int J Med Sci.* 2008 ; 5 :73-79

143. Gallach, S.; Calabuig-Fariñas S.; Jantus-Lewintre, E.; Camps, C. MicroRNAs: Promising new antiangiogenic targets in cancer. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 1-14.
144. Chang, S-H.; Hla, T. Gene regulation by RNA binding proteins and microRNAs in angiogenesis. *Trends Mol. Med.*, 2011, 17(11), 650- 658.
145. Carmeliet, P.; Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801), 249-257.
146. Fish JE, Santoro MM, Morton SU et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell* 2008; 15: 272– 284.
147. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008; 283: 15878– 15883.
148. Lee DY, Deng Z, Wang CH et al. MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20350– 20355.
149. BA.; Gao, D.; Johns, C.; Mattick, J.S.; Wilton, S.D.; Ferro. V.; McMillan. N.A.; Swarbrick, A.; Mittal. V.; Mellick, A.S. MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells. *Cancer Res.*, 2013, 73(1), 341-352
150. Anand, S.; Majeti, B.K.; Acevedo, L.M.; Murphy, E. A.; Mukthavaram, R.; Schepke, L.; Huang, M.; Shields, D.J.; Lindquist, J.N.; Lapinski, P.E.; King, P.D.; Weis, S.M.; Cheres, D.A. MicroRNA132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.*, 2010, 16(8), 909-914.
151. Heusschen, R.; Gink, M.V.; Griffioen, A.W.; Thijssen, V.L.; MicroRNAs in the tumor endothelium: Novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, 2010, 1805(1), 87-96.
152. Pourrajab, F.; Zarch, A.Vakili.; Hekmatimoghaddam, S.; Khormizi, M.R-Z. MicroRNAs; easy and potent targets in optimizing therapeutic methods in reparative angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, 2015, 19(12), 2702-2714.
153. Wang, R.; Zhao, N.; Li, S.; Fang, JH.; Chen, MX.; Yang, J.; Jia, WH.; Yuan, Y.; Zhuang, SM. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2, and CDC42. *Hepatology*, 2013, 58(2), 642-653.
154. Poliseno, L.; Tuccoli, A.; Mariani, L.; Evangelista, M.; Citti, L.; Woods, K.; Mercatanti, A.; Hammond, S.; Rainaldi, G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 2006, 108(9), 3068-3071.
155. Slevin, M.; Krupinski, J.; Gaffney, J.; Matou, S.; West, D.; Delisser, H.; Savani, RC.; Kumar, S. Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.*, 2007, 26(1), 58-68.
156. Hua, Z.; Lv, Q.; Ye, W.; Wong, C-KA.; Cai, G.; Gu, D; Ji, Y.; Zhao, C.; Wang, J.; Young, B.B.; Zhang, Y. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PloS One*, 2006, 1(1), 1-12.

157. Wu, S.Y.; Rupaimoole, R.; Shen, F.; Pradeep, S.; Pecot, C.V.; Ivan, C.; Nagaraja, A.S.; Gharpure, K.M.; Pham, E.; Hatakeyama, H.; McGuire, M.H.; Haemmerle, M.; Vidal-Anaya, V.; Olsen, C.; Rodriguez-Aguayo, C.; Filant, J.; Ehsanipour, E.A.; Herbrich, S.M.; Maiti, S.N.; Huang, L.; Kim, J.H.; Zhang, X.; Han, H.D.; ArmaizPena, G.N.; Seviour, E.G.; Tucker, S.; Zhang, M.; Yang, D.; Cooper, L.J.; Ali-Fehmi, R.; Bar-Eli, M.; Lee, J.S.; Ram, P.T.; Baggerly, K.A.; Lopez-Berestein, G.; Hung, M.C.; Sood, A.K. A miR192-EGR1-HOXB9 regulatory network controls the angiogenic switch in cancer. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 1-14
158. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009;30:3749-56.
159. Singer MM, Tjeerdema RS. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Reviews of environmental contamination and toxicology*: Springer, 1993:95-149.
160. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004;40(1):146-53
161. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A, Lichtenberg A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs.* 2010;34(3):206-10
162. Zhou J, Fritze O, Schleicher M, Wendel HP, Schenke-Layland K, Harasztosi C, Hu S, Stock UA. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials.* 2010;31(9):2549-54.
163. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299- 31.
164. Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature.* 1997;385:537–540.
165. Wang C, Cen L, Yin S, Liu Q, Liu W, Cao Y, Cui L. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2010;31:621-30.
166. Dalton S. Expondo dimensões ocultas do controle do ciclo de células-tronco embrionárias. *Cell Stem Cell.* 2009; 4 (1): 9–10. Stein GS, et al. Uma perspectiva arquitetônica do controle do ciclo celular na transição do ciclo celular da fase G1 / S. *Journal of Cellular Physiology.* 2006; 209 (3): 706–710.
167. Hao J, Duan FF, Wang Y. MicroRNAs and RNA binding protein regulators of microRNAs in the control of pluripotency and reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2017;46:95–103.
168. Li N, et al. microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem Cell*

- Research & Therapy. 2017;8(1):110.
- 169.** Lichner Z, et al. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation*. 2011;81(1):11–24.
- 170.** Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Developmental Cell*. 2003;5(2):351–358.
- 171.** Luo Z, Wen G, Wang G, Pu X, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q. MicroRNA-200C and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1. *Stem Cells*. 2013 Sep;31(9):1749-62.
- 172.** Wang S, Aurora AB, Johnson BA et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008; 15: 261– 271.
- 173.** Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 2008; 111: 1217– 1226