RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/04/2026.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

STEFANY MESQUITA LÔPO

PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PÓ DE VEIA SAFENA MAGNA DESCELULARIZADA E LIOFILIZADA PARA USO EM CULTURA CELULAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu
2024

STEFANY MESQUITA LÔPO

PADRONIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PÓ DE VEIA SAFENA MAGNA DESCELULARIZADA E LIOFILIZADA PARA USO EM CULTURA CELULAR

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador (a): Prof. Dr. Matheus Bertanha

Botucatu
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lôpo, Stefany Mesquita.
Padronização da produção de pó de veia safena magna descelularizada e liofilizada para uso em cultura celular / Stefany Mesquita Lôpo. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientador: Matheus Bertanha
Capes: 90300009

1. Colágeno. 2. Engenharia tecidual. 3. Secagem por congelação. 4. Matriz extracelular. 5. Veia safena.

Palavras-chave: Colágeno; Engenharia de tecidos; Liofilização; Matriz extracelular; Veia safena magna.

Stefany Mesquita Lôpo

Padronização da produção de pó de veia safena magna descelularizada e liofilizada para uso em cultura celular

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha

Comissão Examinadora da Defesa – Titulares

_____

Prof. Dr. Matheus Bertanha

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

_____

Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

_____

Profa. Dra. Marli Leite de Moraes

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Comissão Examinadora da Defesa – Suplentes

_____

Dra. Ana Lívia de Carvalho Bovolato

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

_____

Dr. Nilton José dos Santos

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

Botucatu, 30 de abril de 2024

Agradecimentos

“O Senhor me aperfeiçoará em conhecimento concernente ao seu reino. Louvar-te-ei, ó Senhor, para sempre, pois tu és misericordioso, e não desamparará as obras das tuas próprias mãos” – Salmos 138:8

Agradeço a Deus e a todos que de alguma e qualquer forma me deram suporte, inspiração e ajuda durante os dois anos e dois meses de mestrado. Sem vocês eu não teria concluído mais essa etapa com sucesso e tantos aprendizados.

Obrigada pela paciência em ensinar e pela paciência em ouvir minhas aflições que pareciam esmagadoras, mas que no final me tornaram uma pessoa mais resiliente.

Obrigada!!!

Epígrafe

"Quando a mente não quer ser convencida, sempre encontra algo para inspirar-lhe dúvidas."

Jane Austen

RESUMO

Introdução: Na prática cirúrgica cardiovascular é bem estabelecido a realização de procedimentos cirúrgicos de pontes, enxertos ou *bypass*, para o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica. O ideal seria a substituição por um vaso sanguíneo com as mesmas características, o que não é possível na maior parte das vezes, utilizando como alternativa um fragmento da veia safena magna autóloga. Contudo, existem pacientes que se encontram na impossibilidade de autotransplante e, nestes casos, a engenharia de tecidos pode beneficiá-los através da produção de substitutos vasculares a partir de um arcabouço (*scaffold*) e células tronco autólogas. A produção de *bioscaffolds* têm evoluído, mas ainda apresenta gargalos no controle da nano e macroestrutura para a obtenção de arcabouços com características físico biológicas que mimetizam o tecido vascular. **Objetivo:** Produzir o pó da veia safena magna humana insuficiente descelularizada (VSM_d) por liofilização, caracterizar quimicamente e testar o material em cultura celular, para uso do mesmo como biomaterial em engenharia de tecidos. **Metodologia:** As veias safenas magnas foram descelularizadas com o agente dodecil sulfato de sódio (SDS), em concentração de 2% por duas horas sob agitação. A qualidade do procedimento foi avaliada por análise histológica e de DNA residual. Para a obtenção do pó de VSM_d foi realizada a técnica de liofilização, à vácuo e a frio, para então pulverizar o material obtendo-se um pó. A partir deste material foi realizada a quantificação de resíduo do agente descelularizante através do método de determinação do complexo SDS e azul de metileno em clorofórmio, que pode ser quantificada pela avaliação da densidade óptica. Foi realizada a descrição química do pó de VSM_d através de estudo de proteômica, utilizando análise por cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas. A fim de avaliar a citotoxicidade do pó de VSM_d foi realizado dois ensaios colorimétricos, um utilizando o brometo tetrazólio (MTT) e o outro o corante vermelho neutro (NR). Foi realizado ainda uma avaliação do comportamento do pó da VSM_d como facilitador de adesão celular e formação de culturas tridimensionais *in vitro*. Nos ensaios de cultura celular, o material foi avaliado em duas condições, diluído em ácido acético e diluído em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM). **Resultados:** Foi obtido o pó de VSM_d através da metodologia proposta e observou-se uma esterilização eficiente por UV. As análises de qualidade de descelularização por histologia e quantificação de DNA apresentação uma boa descelularização, contudo foi identificado uma concentração de SDS residual considerável na amostra. A partir dos testes de cultura celular observou-se uma boa proliferação das células VERO (células comerciais imortalizadas da linhagem derivado do rim do macaco verde africano, vervet), nas diluições de 15% e 12,5% para o pó de VSM_d diluído em ácido acético, e nas diluições de 5% e 2,5% para o pó diluído em DMEM. Em ambos os experimentos as células se proliferaram sobre e em volta dos grânulos de VSM_d. **Conclusão:** A partir do estudo realizado foi possível realizar a padronização da produção do pó de VSM_d, foi identificado que a maior parte das proteínas da amostra possuem função estrutural e o material em cultura celular demonstrou que não é citotóxico para as células.

Palavras-chaves: Veia Safena, Liofilização; Colágeno, Matriz Extracelular, Engenharia Tecidual.

ABSTRACT

Introduction: In cardiovascular surgical practice it is well established to perform a surgical procedure of bridges, grafts, or bypass for the treatment of atherosclerotic obstructive disease. The ideal would be the replacement by a blood vessel with the same characteristics, however, this is not possible in most cases, using the autologous great saphenous vein as a substitute. There are still patients who see the impossibility of using autologous veins, in these cases, tissue engineering can benefit them, seeking to produce a vascular substitute from a scaffold and autologous stem cells. The production of biological vascular scaffolds has evolved, but it still presents bottlenecks in the control of the nano and macrostructure to obtain scaffolds with physical-chemical characteristics that mimic the vascular tissue. **Objective**: To produce powder from decellularized insufficient human great saphenous vein (VSM_d) by lyophilization and chemically characterize it for use in biomaterials engineering. **Methodology:** The decellularization of the great saphenous veins was done with the agent sodium dodecyl sulfate (SDS) at 2% for two hours under agitation. The decellularization of the samples was evaluated by histological and residual DNA analysis. In order to obtain the VSM_d powder, a freeze dryer was used that carry on a lyophilization by vacuum. From this material, the residue of the decellularizing agent was quantified using the method of determining the SDS complex and methylene blue in chloroform, which can be quantified by evaluating the optical density. The chemical description of the VSM_d powder was carried out through a proteomic study, using high-performance liquid chromatography analysis associated with mass spectrometry. With a focus on evaluate the cytotoxicity of VSM_d powder, two colorimetric tests were carried out, one using tetrazolium bromide (MTT) and the other using neutral red dye (NR). An evaluation of the behavior of VSM_d powder as a facilitator of cell adhesion and formation of 3D in vitro cultures. In cell culture assays, the material was evaluated under two conditions, diluted in acetic acid and diluted in Dulbecco's modified Eagle's culture medium (DMEM). **Results:** VSM_d powder was obtained using the proposed methodology and efficient UV sterilization was observed. Analysis of decellularization quality by histology and DNA quantification showed good decellularization, however, a considerable residual SDS concentration was identified in the sample. From cell culture tests, good proliferation of VERO cells (immortalized commercial cells from the lineage derived from the kidney of the African green monkey, vervet) was observed in dilutions of 15% and 12.5% for the VSM_d powder diluted in acetic acid, and in dilutions of 5% and 2.5% for the powder diluted in DMEM. In both experiments, cells proliferated on and around the VSM_d granules. **Conclusion:** From the study carried out, it was possible to standardize the production of VSM_d powder, it was identified that most of the proteins in the sample have a structural function and the material in cell culture demonstrated that it is not cytotoxic to cells.

Keywords: Saphenous Vein, Freeze Drying, Collagen, Extracellular Matrix, Tissue Engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 – Liofilizador L108 Liotop utilizado para a liofilização dos segmentos de veia safena magna insuficiente descelularizada e *in natura*.....15
Figure 2 – Esterilização do pó por radiação UV em fluxo laminar. 15
Figure 3 – Foto das placas de Petri com ágar Sabouraud suplementado com extrato de levedura, ágar Sabauroud suplementado com Cloranfenicol e Brain heart infusion (BHI) ágar. 16
Figure 4 – Cortes histológicos dos scaffolds de veia safena magna insuficiente (VSMi) in natura e descelularizada com SDS 2% corados com hematoxilina e eosina (H&E).....24
Figure 5 – Fotos da confecção de pó de veia safena magna insuficiente descelularizada.....25
Figure 6 – Imagem das placas de Petri com meio de cultura e pó de veia safena magna após 15 dias de cultivo pó de veia safena magna descelularizada (VSMd). 26
Figure 7 – Análise de interação proteica pelo String.....31
Figure 8 – Fotos das lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cultura de célula VERO em contato com filme de solução de pó de veia safena magna descelularizada (VSMd) diluída em ácido acético.....37
Figure 9 – Fotos das lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cultura de célula VERO em contato com solução de pó de veia safena magna descelularizada (VSMd) diluída em meio de cultura DMEM.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diluição do pó de VSM_d em ácido acético para os testes de viabilidade celular. 20
Tabela 2 – Diluição do pó de VSM_d em DMEM para os testes de viabilidade celular. 21
Tabela 3 – Contagem de núcleos celulares em tecido de veia safena magna descelularizada. 25
Tabela 4 – Valores de absorbância do ensaio de MTT com pó de VSM_d em ácido acético. 53
Tabela 5 – Valores de absorbância do ensaio de NR com pó de VSM_d em ácido acético. 53
Tabela 6 – Valores de absorbância do ensaio de MTT com pó de VSM_d em DMEM. 54
Tabela 7 – Valores de absorbância ensaio de NR com pó de VSM_d em DMEM. 54
Tabela 8 – Cálculo dos outliers do ensaio de MTT com pó de VSM_d em ácido acético. 55
Tabela 9 – Cálculo dos outliers do ensaio de NR com pó de VSM_d em ácido acético. 55
Tabela 10 – Cálculo dos outliers do ensaio de MTT com pó de VSM_d em DMEM. 56
Tabela 11 – Cálculo dos outliers do ensaio de NR com pó de VSM_d em DMEM. 56
Tabela 12 – Médias dos grupos calculadas pelo programa estatístico, SAS versão 9.4. 57
Tabela 13 – Valores de p, gerados pelo programa SAS versão 9.4, ao comparar as diluições. 57
Tabela 14 – Médias dos grupos calculadas pelo programa estatístico, SAS versão 9.4. 58
Tabela 15 – Valores de p, gerados pelo programa SAS versão 9.4, ao comparar as diluições. 58
Tabela 16 – Médias dos grupos calculadas pelo programa estatístico, SAS versão 9.4. 59
Tabela 17 – Valores de p, gerados pelo programa SAS versão 9.4, ao comparar as diluições. 59
Tabela 18 – Médias dos grupos calculadas pelo programa estatístico, SAS versão 9.4. 60
Tabela 19 – Valores de p, gerados pelo programa SAS versão 9.4, ao comparar as diluições. 60
Tabela 20 – Dados gerados das proteínas encontradas na amostra pela análise proteômica. 61
Tabela 21 – Descrição das proteínas encontradas na amostra pela análise proteômica. 66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva padrão confeccionada a partir dos valores da absorbância das diluições. 27
Gráfico 2 – Quantificação de DNA residual gerado pelo equipamento NanoDrop™ One.....28
Gráfico 3 – Composição do pó de veia safena magna descelularizada, a partir de análise em espectrômetro de massas. 29
Gráfico 4 – Classificação das proteínas pela ferramenta Panther.....30
Gráfico 5 – Análise estatística comparativa entre as diluições e o controle do ensaio de MTT, para o pó de VSM_d diluído em ácido acético. 33
Gráfico 6 – Análise estatística comparativa entre as diluições e o controle do ensaio de NR, para o pó de VSM_d diluído em ácido acético. 34
Gráfico 7 – Análise estatística comparativa entre as diluições e o controle do ensaio de MTT, para o pó de VSM_d diluído em meio de cultura DMEM. 35
Gráfico 8 – Análise estatística comparativa entre as diluições e o controle do ensaio de NR, para o pó de VSM_d diluído em meio de cultura DMEM. 36

Sumário

RESUMO **1**

ABSTRACT **2**

LISTA DE FIGURAS **3**

LISTA DE TABELAS **4**

LISTA DE GRÁFICOS **5**

1. INTRODUÇÃO **9**

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE **12**

3. OBJETIVOS **12**

3.1 Objetivo geral 12

3.2 Objetivo Específicos 12

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS **13**

4.1 Local da realização do estudo 13

4.2 Aspectos éticos 13

4.3 Obtenção das veias safenas magnas 13

4.4 Processo de Descelularização das VSM_i 14

4.5 Avaliação da eficácia da descelularização 14

4.6 Processo de obtenção de pó de VSM_d 14

4.7 Esterilização do pó de VSM_d 15

4.8 Teste de qualidade de esterilização do pó de VSM_d 15

4.9 Quantificação de SDS residual em pó de VSM_d 16

4.10 Análise de DNA residual 17

4.11 Caracterização da composição química do pó de VSM_d por espectrometria de massas 17

4.12 Avaliação do pó de VSM_d em cultura celular 19

4.12.1 Ensaios de citotoxicidade/viabilidade celular em cultura enriquecida com pó de VSM_d 19

A) Cultura exposta a filme de pó de VSM_d diluído em ácido acético 19

B) Cultura exposta a pó de VSM_d diluído em DMEM 20

C) Ensaio de MTT e NR 21

4.12.2 Análise citológica de cultura celular enriquecida com pó de VSM_d 22

A) Experimento com pó de veia VSM_d como indutor de adesão celular em superfície de lamínula em placa de cultura (lamínula revestida com pó de VSM_d): 22

B) Experimento com pó de VSM_d como suplemento suspenso em meio cultura celular: 22

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA **23**

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO **24**

6.1 Obtenção das veias safenas magnas 24

6.2 Avaliação da eficácia da descelularização 24

6.3 Processo de obtenção de pó de VSM_d 25

6.4 Teste de esterilidade do pó 25

6.5 Quantificação de SDS residual em pó de VSM_d 26

6.6 Análise de DNA residual 27

6.7 Caracterização da composição físico-química do pó de VSM_i 29

6.8 Avaliação do pó de VSM_d em cultura celular 32

6.8.1 Ensaios de citotoxicidade/viabilidade celular em cultura enriquecida com pó de VSM_d 32

A) MTT em cultura exposta a nanofilme de pó de VSM_d diluído em ácido acético 32

B) NR em cultura exposta a nanofilme de pó de VSM_d diluído em ácido acético 33

C) MTT em cultura exposta a pó de VSM_d diluído em DMEM 34

D) NR em cultura exposta a pó de VSM_d diluído em DMEM 35

6.8.2 Análise citológica de cultura celular enriquecida com pó de VSM_d 36

A) Experimento com pó de VSM_d como indutor de adesão celular em superfície de lamínula em placa de cultura (lamínula revestida com pó de VSM_d): 37

B) Experimento com pó de VSM_d como suplemento suspenso em meio cultura celular: 38

7. CONCLUSÃO 40

REFERÊNCIAS 42

ANEXO 1 47

ANEXO 2 48

ANEXO 3 53

ANEXO 4 61

1. INTRODUÇÃO

É bem estabelecido na prática cirúrgica vascular que o tratamento da doença obstrutiva aterosclerótica, tanto coronariana[1] quanto periférica[2], em determinadas situações, se faz necessária a realização de procedimento cirúrgico com a utilização de pontes, enxertos ou *by-pass*. O substituto vascular ideal para este tratamento seria um vaso sanguíneo com as mesmas características da artéria que se deseja substituir[3], no entanto, isso não é possível na maior parte das vezes, utilizando-se a veia safena magna autóloga, do próprio paciente, como alternativa para a substituição vascular.[4,5] Esse procedimento é considerado como o de melhor resultado em termos de patência para a cirurgia vascular periférica.[2]

A utilização de artérias autólogas para confecção de enxertos pode ser inviável pelo risco de se gerar isquemia nos tecidos após sua retirada, dessa forma, existindo a impossibilidade de se utilizar as veias autólogas pode-se empregar então substitutos arteriais sintéticos como próteses de Dacron® ou politetrafluoretileno expandido (ePTFE). Nesses casos, o paciente possui um limitante para o uso da veia autóloga como, por exemplo, quando o paciente já foi submetido à safenectomia por insuficiência venosa, quando esta veia se apresenta varicosa, ou quando a veia safena apresenta calibre reduzido e/ou inadequado para ser utilizada como substituto.[6]

Nos casos em que se pretende revascularizar artérias de pequeno diâmetro, como das pernas ou dos pés, ainda há limitação do uso de próteses pela curta patência apresentada nessas situações.[2] Muitas vezes os cirurgiões não tem muitas opções e diante das altas taxas de insucesso, a despeito do que se faça, ou até mesmo da evolução da condição do paciente requerendo a amputação do membro afetado, a engenharia de tecidos surge como uma alternativa que poderá beneficiar esses pacientes.[2]

Sendo assim, a engenhara de tecidos aplicada a vasos sanguíneos (em inglês *tissue engineering blood vessel* - TEBV), consiste na intenção de se desenvolver um substituto vascular, a partir de um arcabouço (*scaffold*) e células-tronco autólogas, as quais, serão estimuladas a diferenciação para reconstituição de um tecido similar ao que se encontra naturalmente na parede dos vasos.[7] De forma ideal, a TEBV poderá disponibilizar substitutos de vasos com características específicas, de comprimento e espessura, que mimetizem as funções biológicas e a anatomia natural do tecido para revascularização personalizada e uso em cirurgia arterial via *by-pass*.[8]

Levando isso em consideração, o desenvolvimento da TEBV possui diversos desafios ao se produzir *scaffolds* tridimensionais (3D), os quais, precisam ser biocompatíveis e conservar o microambiente natural do tecido *in vivo*, sendo semelhante em estrutura e organização da arquitetura.[9] Além disso, esses arcabouços devem possuir propriedades favorecedoras de adesão e diferenciação celular, sem inviabilizar a permeabilidade de nutrientes através do tecido e ainda resistir às forças mecânicas do fluxo sanguíneo, características inerentes dos vasos sanguíneos, possuindo também uma boa integração com o tecido receptor.[10,11]

Os materiais utilizados na engenharia de tecidos e medicina regenerativa incluem os constituídos por componentes da matriz extracelular (MEC) e polímeros sintéticos. Os obtidos da MEC do tecido e seus componentes como o colágeno, laminina e quitosana, são classificados como biológicos. Estes são preferencialmente utilizados em engenharia de tecidos em virtude de sua melhor interação com vários tipos celulares. Enquanto os sintéticos, que são obtidos da manipulação de materiais absorvíveis, como o ácido poliglicólico (PLG) e o ácido polilático (PLA), podem ser configurados em estruturas tubulares 3D e facilmente funcionalizados.[12] Os polímeros sintéticos são amplamente estudados para aplicação em engenharia de tecidos, suas propriedades mecânicas, porosidade e tempo de degradação são vantagens para o uso em biomedicina. Muitos estudos já utilizam os *scaffolds* sintéticos associados com polímeros naturais, proteínas e/ou peptídeos isolados buscando melhorar as propriedades de adesão celular, hidrofobicidade e biodegradação desses materiais. [13]

A utilização do *scaffold* biológico possui suas vantagens, mas possui a necessidade de ser realizado um preparo criterioso dos mesmos para se evitar uma intensa resposta inflamatória no organismo receptor, a qual, pode mitigar o resultado da reconstrução do tecido. Nesse processo deve-se garantir a eliminação das células e seus componentes inerentes ao tecido *in natura*.[14] Se não foram removidos, os antígenos celulares xenogênicos e halogênicos, podem ser reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro desencadeando então uma resposta inflamatória ou uma rejeição imunomediada do tecido transplantado, acarretando em exposição do paciente à riscos de perda do enxerto e riscos de óbito.[15]

Devido a essa problemática, utiliza-se a técnica de descelularização, a qual, tem o objetivo de remoção de todo material celular, preservando, contudo, a estrutura do tecido *in natura*. Tal estrutura possui componentes inerentes à MEC do tecido natural sendo considerado um ambiente propício para o repovoamento celular.[16] Sob outra perspectiva faz-se necessário

um estudo aprofundado da descelularização atentando-se para uma permanecia residual mínima dos agentes descelularizantes no material produzido, com a finalidade de se garantir que esses agentes não irão inibir o crescimento celular ou induzir rejeição do *scaffold* após implantação no organismo. Os protocolos para o processo de descelularização podem combinar técnicas físicas, químicas e enzimáticas, as quais, devem ser adaptadas conforme as características biomecânicas específicas do tecido que se pretende descelularizar.[15,16,17]

Atualmente, várias técnicas vêm sendo empregadas para a produção de *scaffolds* vasculares. Estas têm evoluído através dos procedimentos de controle estrutural, aumentando a precisão da geometria anatômica da micro/macroestrutura.[18] Nos tratamentos tradicionais os biomateriais são pipetados em placas como gotículas ou inseridos em moldes bidimensionais (2D), contudo alguns trabalhos já observaram melhores resultados a partir de arcabouços 3D bioimpressos, técnica que possibilita uma melhor distribuição celular no *scaffold* e melhor estruturação 3D principalmente de tecidos grandes.[18,19,20]

Ensaios vêm aprimorando técnicas de bioimpressão 3D como alternativa para controlar o microambiente da estruturação de novos vasos sanguíneos produzidos pela TEBV.[21-29] Entretanto, a produção de tintas compatíveis com as células, que podem ser resistentes a tensões mecânicas, que mantenham a estrutura tubular ao longo do tempo e que permitam a organização da matriz dos vasos sanguíneos com utilidade prática clínica na substituição de artérias obstruídas ainda é um desafio a ser vencido.[21-30] Para tal, o estudo de biomateriais através da associação de novos polímeros com materiais biológicos se faz necessário na tentativa de combinar as vantagens dos compostos sintéticos e biológicos.

A literatura científica apresenta algumas metodologias que se mostraram favoráveis na obtenção de materiais biológicos com a liofilização e desnaturação de veias sob altas temperaturas, sendo essas técnicas úteis para a conservação e fabricação de *scaffolds* e produção de polímeros naturais.[18,31-39] A técnica de liofilização se trata de um processo de secagem onde os líquidos do tecido são removidos por sublimação, obtendo-se assim um produto biológico desidratado com suas estruturas preservadas. A obtenção de material biológico seco também pode ser realizada pela técnica de desidratação do material aquecido sob vácuo, sendo esta uma alternativa simplificada da liofilização.[18, 35-39]A união das técnicas clássicas com as novas tecnologias de bioimpressão 3D podem ajudar a solucionar alguns dos problemas da obtenção de uma biotinta ideal para a fabricação de *scaffolds* estruturados para a TEBV.[30, 35-39]

7. CONCLUSÃO

A partir dos estudos previamente descritos foi possível realizar a padronização da produção do pó de VSM_d, além de investigar o seu uso em cultura celular.

- Verificou-se que a esterilização do pó através da exposição à radiação UV por 40 minutos se mostrou eficiente;
- Através da análise de espectrometria de massas foi possível verificar os principais componentes do produto estudado, actina, imunoglobulina, miosina, colágeno, albumina e histonas, correspondendo a cerca de 70% da composição do pó. Foi possível identificar que cerca de 26% das proteínas encontradas possuem função relacionada à matriz extracelular do tecido e que grande parte das proteínas encontradas na amostra estão relacionadas a funções estruturais. Essa análise foi de suma importância para conseguirmos identificar como e onde melhorar o protocolo de produção de pó de VSM_d. Em futuros trabalhos será necessário investigar formas de remoção da imunoglobulina encontrada na amostra;
- Através do teste de quantificação de SDS residual identificamos que ainda há uma presença significante, cerca de 1%, de SDS na amostra, mesmo após as lavagens. O SDS é um surfactante que pode induzir a menor proliferação e adesão celular sendo indesejado na composição do material para uso como *bioscaffold*. Dessa forma os próximos trabalhos deveram buscar formas de otimizar o protocolo de produção de pó de VSM_d para que essa concentração de SDS seja menor, ou ainda, buscar um método para remover este reagente da amostra;
- Os testes de quantificação de DNA demonstraram que a quantidade de DNA íntegro no pó de veia safena magana descelularizada era de 10,4ng de DNA/21mg do material, cerca de apenas 18% da quantidade presente no pó de VSM *in natura*, 56,2ng de DNA/22mg do tecido;
- A partir dos testes de citotoxicidade celular (MTT e NR) verificou-se que a cultura celular apresentou menor viabilidade nas maiores concentrações de pó de VSM_d. Em ambos os testes para o experimento onde o pó foi diluído em DMEM foi observada maior viabilidade que o controle apenas na diluição de 2,5%. No experimento em que o pó foi diluído em ácido acético as maiores diluições em que o pó não se mostrou diferente, quanto a viabilidade celular, comparando-se ao controle foi 15% e 12,5%.

- Por meio das análises das imagens do experimento de histologia do pó em cultura celular foi possível verificar que as células se proliferaram sobre e ao redor dos grânulos de pó de VSM_d, formando uma cultura tridimensional onde o material serviu de suporte para a proliferação celular. Foi possível observar menor quantidade de células no fundo do poço do experimento de pó diluído em DMEM na concentração de 5%, contudo não é possível dizer se houve menor proliferação celular ou as células apenas se proliferaram nas estruturas tridimensionais do pó ao invés do fundo do poço.
- **Caracterização de um novo Produto Tecnológico:** os dados de espectrometria de massa neste manuscrito, Anexo 4, foram carregados no Repositório MassIVE da Universidade de Ciência da Computação e Engenharia da Califórnia, San Diego (ftp://massive.ucsd.edu/v07/MSV000094451/ acessado em 02 de abril de 2024) com os dados definir o identificador MSV000094451.

REFERÊNCIAS

1. Montrief 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.

2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, Group TIW. Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). European Journal of Vascular and Endovascular Surgery 2007;33:S1-S75.

3. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. In vivo applications of electrospun tissueengineered vascular grafts: a review. Tissue Engineering Part B: Reviews 2014; 20:628-640.

4. Sukovatykh B, Belikov L, Sukovatykh M, Sidorov D, Inarkhov M, Inokhodova E. Results of using various methods of autovenous femoropopliteal bypass grafting below the knee-joint fissure. Angiology and vascular surgery 2016; 22:137.

5. 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.

6. Leroy O, Meybeck A, Sarraz-Bournet B, d'Elia P, Legout L. Vascular graft infections. Current opinion in infectious diseases 2012; 25:154-158.

7. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. Cells Tissues Organs. 2011, 195(1-2), 144-158.

8. Bertanha M. Prospects for applications of stem cells in vascular surgery. Jornal Vascular Brasileiro, 2016, 15, 173-175.

9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials, 2011, 32, 3233-3243.

10. Nagase H, Visse R. MurphyStructure and function of matrix metalloproteinases and timps. Cardiovasc. Res., 2006,68, 562-573.

11. Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr. Opin. Cell Biol., 2002,14, 608-616.

12. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. Cells Tissues Organs, 2012,195(1-2),144-158.

13. Reddy MSB, Ponnamma D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. Polymers (Basel). 13(7):1105. 2021 Mar 30. PMID: 33808492;

14. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. Biomaterials 2009; 30:3749-56.

15. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 2006; 27:3675-83. 40.

16. 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.

17. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, Silva RA, Rinaldi JC, Golim MA, Felisbino SL, Domingues MA, Sobreira ML, Reis PP. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. Experimental cell research 2014; 326:103-111.H.

18. Nakatsuji, M. Matsusaki, Extracellular Matrix Microfiber Papers for Constructing Multilayered 3D Composite Tissues, ACS Biomater. Sci. Eng. 5 (2019) 5610–5614.

19. CHO, D.W. et al. 3D bioprinting: modeling in vitro tissues and organs using tis- sue-specific bioinks. Cham: Springer, 2019.

20. CROOK, J. M. 3D Bioprinting: Principles and Protocols. 1st Ed: Springer, 2020.

21. Papaioannou TG, Manolesou D, Dimakakos E, Tsoucalas G, Vavuranakis M, Tousoulis D. 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. Acta Cardiol Sin. 2019 May;35(3):284-289.

22. Alonzo M, AnilKumar S, Roman B, Tasnim N, Joddar B. 3D Bioprinting of cardiac tissue and cardiac stem cell therapy. Transl Res. 2019 Sep; 211:64-83. doi: 10.1016/j.trsl.2019.04.004. Epub 2019 Apr 20.

23. Zhou X, Nowicki M, Sun H, Hann SY, Cui H, Esworthy T, Lee JD, Plesniak M, Zhang LG. 3D Bioprinting-Tunable Small-Diameter Blood Vessels with Biomimetic Biphasic Cell Layers. ACS Appl Mater Interfaces. 2020 Oct 14; 12(41): 45904-45915.

24. Datta P, Ayan B, Ozbolat IT. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. Acta Biomater. 2017 Mar 15; 51:1-20.

25. Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Mar 22; 113(12):3179-84.

26. Barrs RW, Jia J, Silver SE, Yost M, Mei Y. Biomaterials for Bioprinting Microvasculature. Chem Rev. 2020 Oct 14; 120(19):10887-10949.

27. Jafarkhani M, Salehi Z, Aidun A, Shokrgozar MA. Bioprinting in Vascularization Strategies. Iran Biomed J. 2019 Jan;23(1):9-20.

28. Miri AK, Khalilpour A, Cecen B, Maharjan S, Shin SR, Khademhosseini A. Multiscale bioprinting of vascularized models. Biomaterials. 2019 Apr; 198:204-216.

29. Ng HY, Lee KA, Kuo CN, Shen YF. Bioprinting of artificial blood vessels. Int J Bioprint. 2018 Jun 19;4(2):140.

30. Said HM. Biotin: biochemical, physiological and clinical aspects. Subcell Biochem. 2012; 56:1-19.

31. Ryan AJ, Gleeson JP, Matsiko A, Thompson EM, O'Brien FJ. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. J Anat. 2015 Dec; 227(6):732-45.

32. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds, Biomaterials. 25 (2004) 1077-86.

33. Haugh MG, Murphy CM, O'Brien FJ. Novel freeze-drying methods to produce a range of collagenglycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes., Tissue Eng. Part C. Methods. 16 (2010) 887–94. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0422.

34. Levingstone TJ, Matsiko A, Dickson GR, O'Brien FJ, Gleeson JP. A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair, Acta Biomater. 10 (2014) 1996–2004.

35. Soares, GM; Guimarães, NN. LIOFILIZAÇÃO DE VASOS DE ORIGEM SUÍNA PARA MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO. REVISTA UNIARAGUAIA, v. 15, n. 1, p. 12-20, 2020.

36. Reeves, T. Roland et al. Mechanical characteristics of lyophilized human saphenous vein valves. Journal of vascular surgery, v. 26, n. 5, p. 823-828, 1997.

37. Staudacher, M. et al. Lyophilized veins studied by scanning electron microscopy. European Surgical Research, v. 7, n. 2, p. 120-128, 1975.

38. Goldman, MH. et al. Lyophilized veins as arterial interposition allografts. Cryobiology, v. 18, n. 3, p. 306-312, 1981.

39. Ryan, Alan J. et al. Hierarchical biofabrication of biomimetic collagen-elastin vascular grafts with controllable properties via lyophilisation. Acta Biomaterialia, v. 112, p. 52-61, 2020.

40. Galbraith, T., Roy, V., Bourget, J.-M., Tsutsumi, T., Picard-Deland, M., Morin, J.-F. Gros-Louis, F. Cell seeding on UV-C-treated 3D polymeric templates allows for cost-effective production of small-caliber tissue-engineered blood vessels. Biotechnology Journal. 2018.

41. Tort, S., Demiröz, F. T., Yıldız, S., & Acartürk, F. Effects of UV Exposure Time on Nanofiber Wound Dressing Properties During Sterilization. Journal of Pharmaceutical Innovation. 2019.

42. Ágar Sabouraud. Laborclin. Registro ANVISA: 10097010-166. 2022. Disponível em: < https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/172143.pdf>

43. Ágar de extrato de leveduras. Biokar Diagnostics. Dsiponível em < https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/04/172463BK-00-AGAR-DE-EXTRATO-DE-LEVEDURAS.pdf>

44. Brain Heart Infusion (BHI). Laborclin. Registro ANVISA: 10097010-137. 2022. Disponível em < https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/03/172072.pdf>

45. Zvarova B, Uhl FE, Uriarte JJ, et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. Tissue Eng Part C Methods 2016; 22: 418-428. 2016/02/26.

46. Mathapati S, Galla S, Sankaranarayanan K, et al. Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue. Indian J Thorac Cardiovasc Surg 2010; 26: 129-131.

47. Bertanha, M., Sobreira, M. L., et al. Ultrastructural analysis and residual DNA evaluation of rabbit vein scaffold. Acta Cirurgica Brasileira, 32 (9), 706 – 711. 2017.

48. Liguori, G. R., Liguori, T. T. A., de Moraes, S. R., Sinkunas, V., Terlizzi, V., van Dongen, J. A., … Harmsen, M. C. Molecular and Biomechanical Clues From Cardiac Tissue Decellularized Extracellular Matrix Drive Stromal Cell Plasticity. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8. 2020.

49. Keane, Timothy J., Ilea T. Swinehart, and Stephen F. Badylak. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. Methods 84 (2015): 25-34.

50. Collagen I, Bovine, Gibco, by life technologies. Publication number MAN0007333. 2014. Disponível em: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/A1064401_Bovine _collagen_I_PI.pdf>

51. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harbor Protocols, 2018(6).

52. Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols, 3(7), 1125–1131.