

Matheus Bertanha

Estruturação *ex-vivo* de vasos sanguíneos a partir da diferenciação  
de células tronco de coelhos

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita  
Filho” *Campus* de Botucatu para  
obtenção do Título de Mestre em  
Pesquisa e Desenvolvimento –  
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elenice Deffune

Co-orientador: Prof. Dr. Marcone Lima Sobreira

BOTUCATU

2011

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho, às pessoas que foram as principais responsáveis por sua existência, à minha esposa Ana Paula cujo amor e tolerância sempre fortaleceram e estimularam minhas decisões, por mais difíceis que fossem; ao meu filho Pedro que ainda pequeno, já representa minha maior conquista e a maior luz da minha vida; ao meu pai Orlando (in memoriam) que vislumbrou em mim a esperança de um dia alcançar algo maior; à minha mãe Maria Alzira por sempre ter me apoiado incondicionalmente; à minha irmã Marieli, por me ajudar a vencer as situações mais difíceis; a todos os meus amigos, familiares e professores que me ajudaram a seguir em frente e chegar a este momento.*

## *Agradecimientos*

*Agradeço primeiramente a Deus, por me incluir em seus propósitos.*

*Agradeço a minha esposa, Ana Paula Habermann Bertanha, pela paciência e carinho que tem dedicado à nossa família e pelo amor que compartilhamos. Especialmente por colaborar de maneira certa nas boas e firmes decisões que tomei, as quais me impulsionam rumo ao sonho de me tornar pesquisador, professor e acima de tudo, um homem melhor. Serei eternamente grato por sua ajuda e espero poder retribuir da mesma maneira tudo o que você tem feito por mim.*

*Ao meu filho Pedro, que é a mais perfeita demonstração divina de que a vida vale à pena. Ainda tão pequeno, já é capaz de atrair toda a minha atenção e carinho. Hoje você me encoraja a seguir em busca dos meus objetivos, renova as minhas forças com um só sorriso e faz com que eu tente ser melhor a cada dia para que possa ser um bom exemplo no futuro.*

*Ao meu pai, Orlando Bertanha “in memoriam” cujo exemplo de garra e fé me faz um homem humilde e mais forte a cada dia, cuja vida honesta e honrosa sempre será para mim um porto seguro para continuar frente a todos os obstáculos.*

*À minha mãe, Maria Alzira Kempe Bertanha, a quem devo tudo, minha formação moral e minha vontade infinita de ajudar aos meus semelhantes, cujo carinho e dedicação a família faz com que os dias sejam mais suaves na ausência de meu pai.*

*À minha irmã, Marieli Bertanha, que cede sua força para carregar comigo as atribuições da família, que é braço direito toda vez que preciso e a quem eu devo muito. Desejo que você continue conquistando tudo o que merece e que eu possa um dia retribuir o que você fez por mim.*

*À Professora Dr.<sup>a</sup> Elenice Deffune, minha orientadora, que é uma pessoa excepcional em todos os sentidos, cujo exemplo de vida nos faz sonhar mais alto, cuja extrema sabedoria distribui com prazer, cuja disponibilidade se faz livremente. Certamente, você foi a única pessoa que, em todos os momentos de dúvida e descrença em que me confrontei, sempre me respondeu: “Sim, é possível ...” Agradeço muito por ter me ajudado a realizar um dos maiores propósitos da minha vida profissional, mas te agradeço muito mais por me estimular a ir muito além desse momento.*

*Ao Professor Dr. Marcone Lima Sobreira, meu co-orientador, que é acima de tudo meu amigo, que sempre apoiou minhas idéias e ajudou a tomar boas decisões. Você sempre foi um modelo de inspiração para minha evolução como profissional, pela dedicação incansável aos seus propósitos como cirurgião vascular, inteligência e obstinação aos estudos.*

*Ao Mestre Andrei Moroz, que é meu amigo, cuja paciência foi realmente testada pela convivência comigo durante todo o tempo em que me ajudou a tocar o serviço pesado da pesquisa. Caro, obrigado por compartilhar seu conhecimento e acreditar em mim.*

*Aos professores da Disciplina de Cirurgia Vascular Dr. Hamilton A. Rollo, Winston B. Yoshida, que colaboraram para que eu pudesse realizar um trabalho. Em especial a Dr.<sup>a</sup> Regina Moura, que me cedeu seu conhecimento científico em vasos sanguíneos para aplicação nesta pesquisa. Agradeço a todos vocês pela colaboração efetiva na minha formação como profissional.*

*À Dr.<sup>a</sup> Flávia Cilene M. C. Alves, amiga que vem me ensinando a trilhar os caminhos da ciência, e que eles são tortuosos porém transponíveis, cuja paciência, ajuda e conhecimento foram fundamentais na elaboração desse trabalho, principalmente por aplicar rigor e ética em todas as etapas da pesquisa até a obtenção dos resultados.*

*Aos colegas médicos contratados da Cirurgia Vascular Dr. Rodrigo Gibin Jaldin e Fernando Cordeiro Pimentel por muitas vezes me substituir nas atividades da rotina da Cirurgia Vascular, sou grato pelo que fizeram por mim e espero poder fazer o mesmo por vocês.*

*Aos colegas do Laboratório de Engenharia Celular, que dividiram comigo seus conhecimentos e também ajudaram muito em diversas etapas da pesquisa. Especialmente à Regina Avelina de Moraes Silva por trabalhar na segunda etapa da pesquisa; à Michele Janegitz Acorci Valério, por realizar prontamente todas as etapas envolvendo a Citometria de Fluxo; à Thaianne Cristine Evaristo por compartilhar seus resultados de pesquisa comigo; ao Woner Mion; à Priscila Murador; à Josy Campãinha; à Aparecida Vitória Gonçalves de Souza; à Mariele Gobo; à Fátima Regina Guimarães; à Ondina Silva Cotrim; ao Renan Padron Almeida;*

*Aos professores da pós graduação por compartilharem seu amplo conhecimento e colaborarem para essa conquista. Especialmente à Dra. Maria Inês Pardini; à Dra. Rejane Maria Tommasini*

Grotto; ao Dr. Carlos R. Padovani; à Dra. Rosana Rossi Ferreira; à Dra. Izolete Ap. Thomazini Santos; à Dra. Márcjore de Assis Golim; à Dra. Valéria Alves da Silva;

*A todos os amigos do Hemocentro da FMB. Especialmente à Cleonice De Piere por todo apoio e amizade; à Janisse Pena Bispo por toda competência em ajudar os pós-graduandos; à Dra. Rita de Cassia Alvarado pela amizade e apoio.*

*A todos do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia. Especialmente Ao Ednelson Henrique Bianchi que sempre se prontificou a ajudar no que podia e muitas vezes no que não podia para que as pesquisas não parassem.*

*A todos os amigos do Laboratório Vascular da FMB, por me apoiar, ajudar e torcer por mim, por me agüentar nos bons e maus momentos. Especialmente à Valéria Maria Ricarelli de Oliveira que além de amiga, incentivou minha caminhada na UNESP; à Teresinha de Fátima de Barros; à Paula Maria da Silva M. Pereira; ao Lucas Cornetta Rosa e à Hélia Marques Winkler.*

*À equipe do Departamento de Patologia que sempre me ajudou e acreditou em mim. Especialmente à Dra Maria Aparecida Custódio Domingues por sua disponibilidade em ajudar com as difíceis análises das lâminas; ao Dr. Viciany Enrique Fabris; ao Marcos Roberto Franchi; ao José Carlos Pedroso de Lima; ao Carlos Cesar Ramos; Claudiney Jurandir Figueira e a todos em geral.*

*A toda equipe da enfermaria de Cirurgia Vascular da FMB. Especialmente para Rosana Valéria Santos Baldin.*

*Aos amigos, que sempre estiveram ao meu lado para compartilhar bons e maus momentos, cujo apoio e incentivo fazem com que o trabalho tenha mais valor.*

*Aos pacientes, por serem gentis em se submeterem às minhas observações, cederem parte de suas vidas para me transformar em um médico melhor.*

*Aos animais de pesquisa, cujo sacrificio inevitável se faz necessário para o avanço da ciência humana.*

*À FAPESP, que promoveu o suporte financeiro necessário para conseguirmos melhores resultados e evoluirmos com a pesquisa.*

*A todos do Departamento de Cirurgia e Ortopedia. Em especial ao Douglas; à Mari; à Simone; ao Henrique; ao Eric.*

*Muito Obrigado a todos vocês.*

*Epígrafe*

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

*Albert Einstein (1879 – 1955).*

## *Lista de Abreviações*

<b>3D</b> - tridimensional	<b>HE</b> - Hematoxilina-Eosina
<b>AcMm</b> - anticorpos monoclonais murinos	<b>HLA</b> - <i>human leucocyte antigen hyperpolarizing factor</i>
<b>BSA</b> - <i>Bovine Serum Albumin</i>	<b>IBB</b> - Instituto de Biociências de Botucatu
<b>CD</b> - <i>Clusters of Differentiation</i>	<b>LDL</b> - <i>Low Density Lipide</i>
<b>CE</b> - Células Endoteliais	<b>LEC</b> - Laboratório de Engenharia Celular
<b>CF</b> - Citometria de Fluxo	<b>MC</b> - Meio de Cultura
<b>CO<sub>2</sub></b> - Dióxido de Carbono	<b>MEC</b> – Matriz extra celular
<b>COBEA</b> - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal	<b>MHC</b> - <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>CT</b> - Células-Tronco	<b>MIAMI</b> - <i>Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible</i>
<b>CTMs</b> - Células-Tronco Mesenquimais	<b>MO</b> - Medula Óssea
<b>CTM<sup>ta</sup></b> - Célula-Tronco Mesenquimal do tecido adiposo	<b>NO</b> - Óxido Nítrico
<b>DAB</b> - 3,3-diaminobenzidina	<b>PBS</b> - <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>DAOP</b> - Doença Arterial Obstrutiva Periférica	<b>PDGF</b> – <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
<b>DMEN</b> - <i>Dulbecco`smodifiedEagle`smedium</i>	<b>PDGFR<math>\alpha</math></b> – <i>PDGF receptor alfa</i>
<b>DMSO</b> - Dimetilsulfóxido	<b>PGA</b> - <i>Poliglicolic Acid</i>
<b>DNA</b> - <i>Deoxyribonucleic acid</i>	<b>PGH<sub>2</sub></b> - Prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>DS</b> - Deoxicolato de Sódio	<b>PGI<sub>2</sub></b> - Prostaciclina
<b>EDCFs</b> - endothelium-derived contracting factors	<b>PTFE</b> - Politetrafluoreto
<b>EDHF</b> - endothelium-derived	<b>PVP-I</b> - Polivinilpirrolidona-Iodo
<b>EDRFs</b> - endothelium-derived relaxing factors	<b>rpm</b> - rotações por minuto
<b>EDTA</b> - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	<b>RPMI HEPES</b> - <i>Roswell Park Memorial Institute ácido n-(2-hidroxietilo)-piperazina-n`-2-etanesulfônico</i>
<b>ELAMs</b> - <i>Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule</i>	<b>SDS</b> - Dodecil-Sulfato de Sódio
<b>ET</b> - Engenharia de Tecidos	<b>SFB</b> - Soro Fetal Bovino
<b>ET-1</b> - Endotelina-1	<b>TA</b> - Tecido Adiposo
<b>FC</b> - Fatores de Crescimento	<b>TX-A<sub>2</sub></b> - Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>FGF</b> - <i>Fibroblast Growth Factor</i>	<b>UNESP</b> - Universidade Estadual de São Paulo
<b>FMB</b> - Faculdade Medicina Botucatu	<b>VD</b> - Veia Descelularizada
<b>FvW</b> - Fator de von Willebrand	<b>VEGF</b> - <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>GP</b> - glicoproteínas	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> - Peróxido de Hidrogênio	

## *Lista de Figuras*

<b>Figura 1.</b> Embriologia do Sistema Circulatório .....	pag.25
<b>Figura 2.</b> Plasticidade da Célula Tronco Adulta .....	pag.27
<b>Figura 3.</b> Multipotência das CTM <sup>ta</sup> e MO.....	pag.28
<b>Figura 4.</b> Modelo Tridimensional do vaso sanguíneo.....	pag.29
<b>Figura 5.</b> Artéria Elástica – artéria de médio e grande calibre.....	pag.30
<b>Figura 6.</b> Procedimento de coleta de tecido adiposo de coelho.....	pag.41
<b>Figura 7.</b> Fluxograma da Obtenção e Manipulação das veias de coelho.....	pag.42
<b>Figura 8.</b> Fragmentos de veia para descellularização.....	pag.43
<b>Figura 9.</b> Processamento de descellularização dos fragmentos de veia.....	pag.44
<b>Figura 10.</b> Diagrama de descellularização das veias com 3 detergentes: Triton X-100, DS e SDS, em diferentes concentrações e tempo de exposição variável .....	pag.44
<b>Figura 11.</b> Processo de agitação contínua das veias em contato com o detergente químico, em equipamento <i>Shaker</i> . Detalhe interno, com os tubos cônicos contendo as veias em presença do detergente com fixação dos tubos para agitação orbital.....	pag.45
<b>Figura 12.</b> Representação didática das vias de morte celular.....	pag.46
<b>Figura 13.</b> Processo de expansão celular em frascos de cultura.....	pag.49
<b>Figura 14.</b> Processamento de cultura celular em placa não aderente.....	pag.51
<b>Figura 15.</b> CTM <sup>ta</sup> em microscopia invertida em contraste de fase, aumento 10X. A=48 h de cultura, poucas células aderentes, formação fibroblastóide. B=72 h de cultura, confluência~70%. C=confluência de 100%.....	pag.57
<b>Figura 16.</b> Análise com CF. Gráficos de dispersão das CTM <sup>ta</sup> por tamanho e granulidade.....	pag.57
<b>Figura 17.</b> Análise por CF das CTM <sup>ta</sup> do coelho 1 – controle negativo.....	pag.58
<b>Figura 18.</b> Análise por CF das CTM <sup>ta</sup> do coelho 1 - reatividade com anti-CD90 .....	pag. 58
<b>Figura 19.</b> Análise por CF (CTM <sup>ta</sup> ), terceira passagem, anti-CD90: média de eventos analisados; média da porcentagem de células do controle negativo e média da porcentagem dos testes positivos com anti-CD90.....	pag.59

<b>Figura 20.</b> Desempenho comparativo em CF do anti-CD90 comercial com os AcMm anti-CTM de MO de coelho produzido <i>in house</i> .....	pag.60
<b>Figura 21.</b> Análise histológica das VD com: Triton X-100, DS e SDS em diferentes concentrações e tempos de exposição – quantificação da permanência das células, restos nucleares e padrão da matriz.....	pag.61
<b>Figura 22.</b> Corte histológico corado com HE - veia <i>in natura</i> (controle). Aumento 400X.....	pag.62
<b>Figura 23.</b> Corte histológico corado com HE de VD. Triton X-100. A= Triton X-100 1% 1h; B = Triton X-100 1% 2h; C= Triton X-100 2% 1h e D= Triton X-100 2% 2h. Aumento 400X.....	pag.63
<b>Figura 24.</b> Corte histológico corado com HE de VD com DS. A= DS 1% 1h; B= DS 1% 2h; C= DS 2% 1h e D= DS 2% 2h. Aumento 400X.....	pag.64
<b>Figura 25.</b> Corte histológico corado com HE de VD com SDS. A= SDS 0,1% 1h; B= SDS 1% 1h; C= DS 2% 1h e D= SDS 1% 2h. Aumento 400X.....	pag.65
<b>Figura 26.</b> Viabilidade celular com azul de tripano a 0,4% nas CTM <sup>ta</sup> cultivadas na presença dos <i>scaffolds</i> elencados.....	pag.66
<b>Figura 27.</b> Análise de toxicidade mediada pela anti-Caspase-3 em CF.....	pag.66
<b>Figura 28.</b> Imunofluorescência das CTMs no <i>scaffold</i> (em azul).....	pag.68
<b>Figura 29.</b> Imunofluorescência das CTMs no <i>scaffold</i> (em vermelho).....	pag.68
<b>Figura 30.</b> Aspecto macroscópico das VD tratadas, embebidas em SFB e com CTM <sup>ta</sup> - 3 semanas de cultura.....	pag.69
<b>Figura 31.</b> Zoom Aspecto macroscópico das VD tratadas, embebidas em SFB e com CTM <sup>ta</sup> - 3 semanas de cultura.....	pag.70
<b>Figura 32.</b> Visualização TA sobre VD tratada. A= Microscopia invertida em contraste de fase, sem coloração, aumento 400X. B= Corte histológico corado com HE, aumento 100 X .....	pag. 70
<b>Figura 33.</b> Corte histológico da VD tratada, diferenciada em TA, coloração com <i>oil red</i> , aumento 100X .....	pag.71
<b>Figura 34.</b> Monocamada celular sobre VD - CE. A= observação de CE por microscopia invertida em contraste de fase, aumento 400X. B= corte histológico corado por HE, evidenciando CE, aumento 200X.....	pag.71
<b>Figura 35.</b> Capilar neo formado constituído por 4 células endoteliais, corte histológico corado em HE, aumento de 400X.....	pag.72

- Figura 36.** Corte histológico corado em HE. Músculo cardíaco desenvolvido em cultura sobre o *scaffold* de VD, aumento 1000X.....pag.73
- Figura 37.** Cortes histológicos corados com HE. Aumento 1000X. A= veia controle, *in natura*. B= VD com crescimento de endotélio.....pag.73
- Figura 38.** Cortes histológicos corados com IHQ. Aumento 1000X. A= veia controle negativo,descelularizada. B= VD com crescimento de endotélio com reação positiva com anti-fascin.....pag.74
- Figura 39.** Esquema representativo da dosagem de FvW em cultura.....pag.75

*Resumo & Abstract*

### Resumo

O cultivo de células tronco (CT) e a descoberta de técnicas que promovem a diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a engenharia de tecidos (ET). As limitações da medicina atual encontram na ET uma nova possibilidade terapêutica, com tratamentos regenerativos ou substitutivos para os tecidos danificados. Dentre as limitações médicas encontram-se as doenças arteriais obstrutivas periféricas (DAOP). A DAOP está presente em 5% da população e cerca de 20 a 30% dos casos podem evoluir para amputação do membro inferior acometido, mesmo com os tratamentos hoje existentes. A ET apresenta-se como uma ferramenta promissora para a resolução dos problemas cardiovasculares, particularmente para os que afetam as artérias de pequeno diâmetro (<5 mm), sendo factível a produção de enxertos vasculares autólogos, sob a ótica da medicina personalizada. O objetivo deste trabalho foi construir de um modelo experimental de vaso sanguíneo para enxerto, utilizando técnicas de ET para a diferenciação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM<sup>ta</sup>) em células endoteliais. Inúmeras etapas metodológicas foram necessárias: identificação da melhor forma de descellularizar as veias de animais doadores para confecção do arcabouço (*scaffold*), onde foram comparados 3 diferentes protocolos utilizando os detergentes Triton X-100, deoxicolato de sódio (DS) e dodecil sulfato de sódio (SDS); obtenção, expansão e caracterização por citometria de fluxo com anti-CD90 de CTM<sup>ta</sup>; comprovação da adesão das CTM<sup>ta</sup> sobre o *scaffold* utilizando imunofluorescência e o *kit Qtracker*; estabelecimento do índice de apoptose das CTM<sup>ta</sup> sobre o *scaffold* descellularizado por eventual resíduo químico; análise histológica por HE e realização de imunohistoquímica com anti-fascin dos *scaffolds* povoados com CTM<sup>ta</sup>. Foram obtidos e descellularizados 90 segmentos de veias jugulares e cavas, sendo comparados 11 diferentes protocolos de descellularização. Os protocolos que tiveram melhor desempenho quanto à descellularização foram os com DS a 1% em agitação por 2h, DS 2% por 1h e SDS 1% por 2 h. Os protocolos utilizando Triton X 100 não foram eficazes. Não houve diferença relevante quanto ao índice de apoptose entre os melhores protocolos de descellularização. A caracterização fenotípica das células em cultura mostrou-se positiva com anti-CD90 em mais de 96% das células, o que comprova qualitativamente as CTM<sup>ta</sup> utilizadas nos experimentos. Dois experimentos envolvendo a montagem *ex vivo* dos vasos sanguíneos foram realizados. No primeiro experimento o *scaffold* foi embebido com soro fetal bovino (SFB) antes da colocação das CTMs. Houve a indução da formação de tecido adiposo em grande quantidade. No segundo experimento, sem a adição de SFB, houve insucesso na colonização dos *scaffolds* em 8 amostras (50%), houve colonização nas demais amostras, observando-se a formação de endotélio em 7 amostras (44%) e músculo cardíaco em 1 amostra. Os resultados obtidos estão relacionados a diferentes fatores envolvidos no processo de cultura celular, porém com grande influência do tipo de tratamento aplicado para descellularização do *scaffold*, mesmo assim, estes são promissores e permitem a oportunidade de melhoria no processo de obtenção de auto-enxertos “engenherados”.

**Palavras chave** - Doença Arterial Periférica. Células Tronco. Terapia Celular. Neovasculogênese.

## ABSTRACT

Stem cells (SC) cultivation and the development of new techniques to promote tissue differentiation evolved to new medicine fields of research: cell therapy and tissue engineering (TE). The current limitations in medicine rely on TE for new therapies as they provide regeneration and substitution of the damaged tissue. Within therapeutic limitations are the peripheral arterial obstruction diseases (PAD). PAD affects 5% of population and about 20-30% of cases may progress to amputation of the limb, even if the treatments that exist today. TE is a promising tool for cardiovascular diseases, especially those where the vessel is a small caliber artery (<5 mm), as it is possible to recreate the structure of the vessel with autologous vascular grafts from the perspective of personalized medicine. This research aimed to propose the creation of an experimental blood vessel using TE techniques and adipose-derived stem cell differentiation into endothelium. Several techniques were required: to gather enough veins and remove its cells, using three different protocols with Triton X 100, sodium deoxycholate (SD) and sodium dodecil sulfate (SDS); to obtain, cultivate and characterize adipose-derived stem cells with the CD90 marker and flow citometry; to prove the cells could adhere to the scaffold using immunofluorescence and *Qtracker*® kit; to establish the cell apoptosis on the scaffold for possible chemical residue; histology and immunohistochemistry on the cell seeded scaffold using the fascin marker. Were obtained 90 jugular and cava vein segments and were decellularized, withing 11 different protocols. The best protocols were 2h of 1% SD, 1h of 2% SDS and 2h of 1% SDS. The protocols where triton were used gave no good results. There was no relevant difference between the apoptosis on the best protocols. The characterization of the adipose-derived stem cells in culture was positive with CD90 marker in more than 96%, which confirms qualitatively the type of the cells used in the experiments. Two experiments to obtain cell seeded vein scaffolds were carried out. In the first experiment, the scaffold was soaked with fetal bovine serum (FBS) before the cells were seeded. There was induction of the formation of adipose tissue in large quantities. In the second experiment without the addition of FCS, was unsuccessful in the colonization of scaffolds in 8 samples (50%) were colonized in the other samples, observing the formation of endothelium in 7 samples (44%) and cardiac muscle in a sample. The obtained results are related to different factors involved in cell culture, but with great influence on the choice of type of treatment applied to the scaffold, but are promising but are promising to obtain vessels by cell engineering.

**Key words** - Peripheral Arterial Disease. Stem Cells. Cellular Therapy. Neovasculogenesis.

## *Sumário*

## **Sumário**

Dedicatória	
Agradecimentos	
Epígrafe	
Lista de Abreviações.....	pag.12
Lista de Figuras .....	pag.14
Resumo .....	pag.18
Abstract .....	pag.20
I – Introdução .....	pag.23
I.1 – Aspectos gerais.....	pag.23
I.2 – Células-Tronco.....	pag.26
I.3 – Vaso Sanguíneo.....	pag.29
I.4 – Função Endotelial.....	pag.31
I.5 – Lesão Endotelial e Aterosclerose.....	pag.32
I.6 – Engenharia Celular em Vasos Sanguíneos.....	pag.33
I.7 – Plaquetas e seus Fatores de Crescimento.....	pag.34
I.8 – Descelularização da Veia.....	pag.36
II – Objetivos.....	pag.38
II.1 – Objetivo Geral.....	pag.38
II.2 – Objetivos Específicos.....	pag.38
III – Materiais e Métodos.....	pag.40
IV – Resultados e Discussão.....	pag.56
V – Conclusões.....	pag.77
VI – Perspectivas.....	pag.79
VII – Referências Bibliográficas.....	pag.81
VII – Anexos.....	pag.87

## *Introdução*

## I - Introdução

### I.1- Aspectos Gerais

O cultivo de células tronco (CT) e a descoberta de técnicas que promovem a diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a engenharia de tecidos. Estes novos domínios fazem interface, mais recentemente, com a denominada medicina translacional. As limitações da medicina atual, especialmente nas novas especialidades, encontram na engenharia de tecidos (ET) uma nova possibilidade terapêutica, com tratamentos regenerativos ou substitutivos para os tecidos danificados.

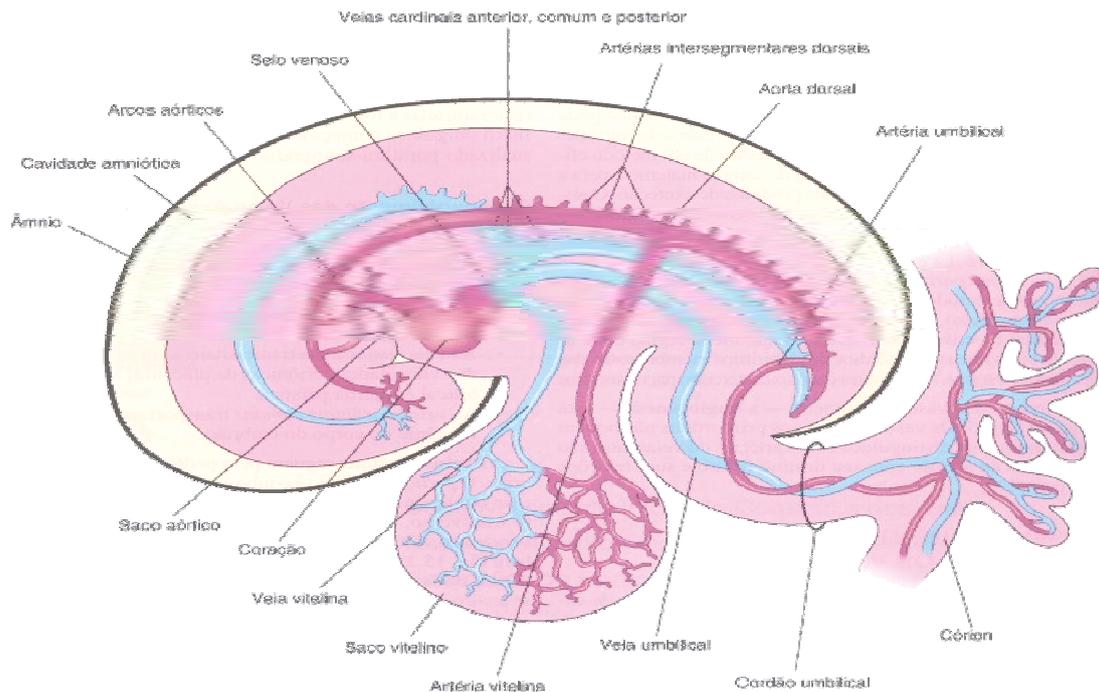
A ET apresenta-se como uma ferramenta promissora para a resolução dos problemas cardiovasculares, particularmente para os que afetam as artérias de pequeno diâmetro (<5 mm), sendo factível a produção de enxertos vasculares autólogos, sob a ótica da medicina personalizada. Isso envolve varias etapas distintas e interligadas, como a captação de veias para a formação de bancos, os processos de descelularização para a descaracterização dos antígenos de histocompatibilidade, conservação dessas estruturas que são denominadas *scaffolds*, coleta de células tronco mesenquimais (CTMs) dos pacientes candidatos a receber um enxerto, seguido de uma fase laboratorial de expansão celular *in vitro* para posteriormente construir-se o modelo *ex vivo* do enxerto. Neste modelo as CTMs do paciente, uma vez expandidas, serão colocadas no *scaffold* que servirá de “andaime” no qual as células vão se aderir, proliferar e diferenciar, secretando os outros componentes da matriz extracelular (MEC), sobre a estrutura de colágeno, recompondo a estrutura da artéria. O arcabouço tridimensional (3D) deve fornecer a força mecânica inicial para resistir a pressão arterial sistêmica *in vivo*, além das forças de tração do tecido aumentadas pela movimentação, até que as células musculares lisas vasculares e os fibroblastos reforcem a MEC da parede do vaso, dando-lhe maior elasticidade. Portanto, a escolha do *scaffold* é crucial para orientar as células na recomposição da MEC, da forma e do tamanho desejado. Vários tipos de *scaffolds* têm sido usados para a reconstrução de vasos sanguíneos que podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Dentre os naturais encontram-se os *scaffolds* biológicos e matrizes descelularizadas, enquanto que os sintéticos possuem uma gama importante de produtos, sendo os mais promissores os denominados poliméricos biodegradáveis.

Em Cirurgia Vascular, a perspectiva de estudos com CT pode apresentar-se como uma alternativa terapêutica para os casos de isquemia arterial periférica. Estima-

se que 5% da população com idade superior a 50 anos seja portadora de doença isquêmica periférica (1, 2). Essa situação clínica decorre do processo degenerativo da parede arterial, sendo mais comumente causada por aterosclerose, sendo então denominada doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (3, 4). Sua etiologia é multicausal e não há tratamento específico, sendo associada com vários fatores de risco, como: idade avançada, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, hiperlipidemia, fatores genéticos entre outros (4). Apresenta-se como uma doença progressiva, evoluindo com a limitação do espaço de deambulação do paciente, chegando ao acamamento e posteriormente, nos seus estágios mais críticos, passando a causar dor em repouso e até gangrenas do membro inferior acometido. Nessa fase de isquemia crítica, quando não tratada corretamente ou quando não há alguma proposta cirúrgica para restaurar a circulação arterial do membro acometido, há alto risco de perda da viabilidade funcional do membro afetado (4). Entre 20 a 30% dos pacientes em estado avançado da doença, o tratamento restaurador por qualquer dos métodos cirúrgicos hoje existentes não é factível. Em geral, isso se deve a gravidade do comprometimento da circulação arterial e a sua extensão até os vasos de calibre reduzido, o que limita a realização de técnicas cirúrgicas restauradoras e a amputação acaba sendo o único tratamento possível (1, 5). Nos casos onde é possível a realização de uma cirurgia restauradora através da confecção de uma ponte, ainda há casos de difícil solução, principalmente quando o paciente não dispõe da veia autóloga para sua confecção. Em alguns casos podem-se utilizar materiais sintéticos como o politetrafluoreto expandido (PTFE) ou o Dacron. Porém, é conhecido que estes materiais sintéticos apresentam baixa tolerância a infecções e desfecho muito desfavorável quando isso ocorre, além da menor patência destes enxertos quando realizados em derivações longas, abaixo do joelho, que acabam por evoluir com trombose precoce (5, 6). Surgem, então, os desafios para se desenvolver novos substitutos arteriais para os casos onde a ponte precisa ser implantada abaixo do joelho e que apresente maior tolerância às infecções. Produzir enxertos para solucionar estas lacunas, é uma realidade em ET graças aos avanços conseguidos nas pesquisas com células tronco.

O processo embriológico de formação dos vasos sanguíneos é a fonte inspiradora para os modelos de engenharia celular (Figura 1). Durante o período embrionário, a formação dos vasos sanguíneos tem origem do mesoderma. Inicialmente são formadas pequenas ilhotas totalmente isoladas de tecido endotelial. Tem início a

formação de células sanguíneas a partir das células imaturas presentes no interior das ilhotas primitivas, sendo estas as primeiras hemácias fetais. As ilhotas se desenvolvem por mitose e aos poucos se fundem, dando início ao sistema vascular fechado. Em seguida formar-se-ão as camadas musculares e serosas das paredes vasculares, derivadas das células pouco diferenciadas do mesoderma circundante, o que vem conferir resistência às artérias e complacência às veias (7).



**Figura 1.** Embriologia do Sistema Circulatório  
 Fonte: <http://www.forp.usp.br/mef/embriologia/circulatorio.htm>

Historicamente, Asahara *et al.* publicaram em 1997 a descrição detalhada do isolamento das células progenitoras endoteliais para angiogênese, o que se apresentou como uma nova fonte para pesquisas da neoangiogênese e neovasculogênese (8).

Estudos têm demonstrado que é possível realizar *in vitro* a diferenciação das CT adultas, nos tecidos da parede do vaso sanguíneo como o endotelial e o músculo liso (9-13). Weinberg & Bell (1986) produziram o primeiro protótipo de vaso sanguíneo produzido através de engenharia de tecidos (ET), e desde então se tem buscado formas para unir as técnicas de engenharia celular com os conhecimentos de diferenciação das CT (14).

Frente aos desafios da terapêutica clínica e cirúrgica do paciente portador de aterosclerose, dos conhecimentos atuais da pesquisa com ET, das limitações ainda não

vencidas na busca de proporcionar novas alternativas de tratamento, será apresentada uma revisão sobre o assunto e as técnicas por nós desenvolvidas nessa linha.

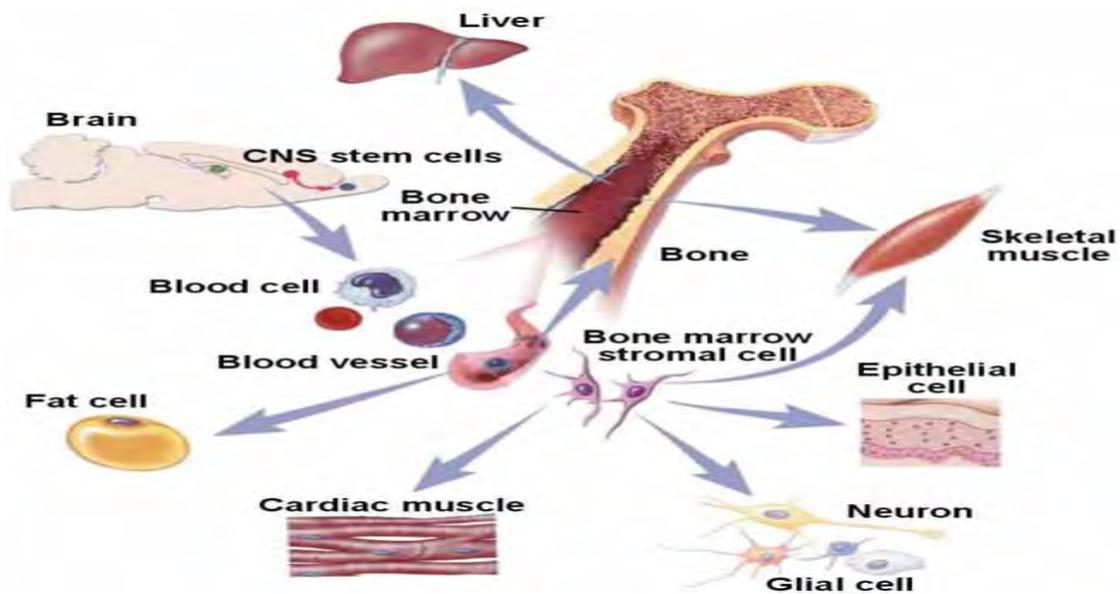
Espera-se, com isso, que futuramente possa ser produzido, através do desenvolvimento de técnicas complementares de ET, um substituto arterial autólogo, com qualidades semelhantes ao vaso sanguíneo original para o uso clínico (10, 15).

## **I-2. Células Tronco**

As CT foram primeiramente descritas por Friedenstein *et al* (1966) (16). Descobriu-se que estas células aderem a placas de cultura, assemelham-se a fibroblastos e formam colônias *in vitro* (17). Estas células são imaturas, multipotentes, de população heterogênea e apresentam como características essenciais a auto-replicação, a capacidade de dar origem a vários tipos de tecidos do organismo, além de apresentar notável capacidade regenerativa e proliferativa (18). Todas essas características fazem delas uma fonte potencial para a ET (19-21).

A medula óssea possui as CT hematopoiéticas adultas, que originam progenitores linfóides e mielóides, e as CT não hematopoiéticas adultas, dentre as quais se encontram as células progenitoras endoteliais, as células tronco mesenquimais, as células progenitoras multipotentes, as *marrow-isolated adult multilineage inducible* (MIAMI) e CT muito pequenas semelhantes às embrionárias (19).

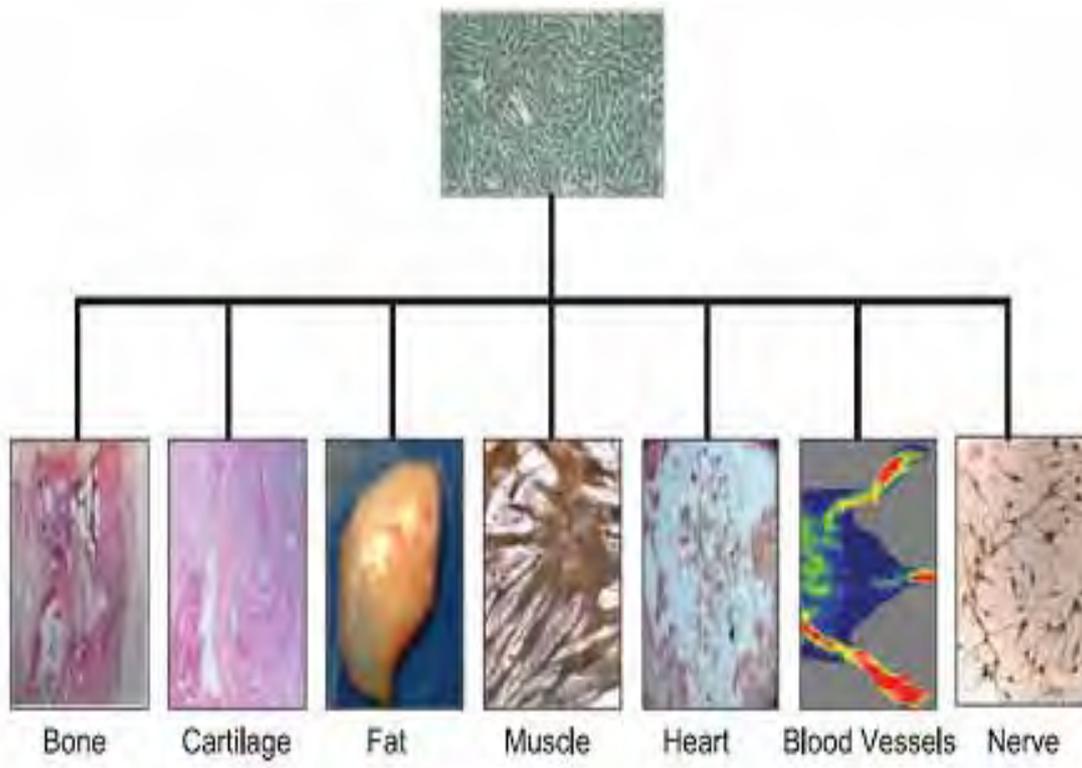
As CTMs já foram obtidas de quase todos os tecidos conjuntivos, sendo que primariamente foram caracterizadas na medula óssea (MO). Estas têm a capacidade de se diferenciar em várias linhagens mesodérmicas quando mantidas em cultura celular e estimuladas com fatores de crescimento e diferenciação específicos, como osteócitos, adipócitos e condrócitos, bem como, células endoteliais e musculares lisas, revelando potencial de plasticidade (18, 22) (Figura 2).



**Figura 2.** Plasticidade da Célula Tronco Adulta.

From: <http://stemcells.nih.gov/info/>. (© 2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall).  
Acessado em 8/5/2010

A fração estromal do tecido adiposo (TA) representa uma fonte alternativa para obtenção de CTMs e de células progenitoras endoteliais. Estas têm se tornado foco de investigações para comprovar sua equivalência com as obtidas de medula óssea. Confirmou-se que as CTMs estão presentes no TA em grande quantidade, chamadas de células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM<sup>ta</sup>), que são multipotentes, têm alta capacidade de replicação e formação de colônias, com vantagens potenciais em sua obtenção, visto que o procedimento de coleta requer técnica cirúrgica mais simples, além da confirmação da sua aplicabilidade em engenharia de tecidos (9). Contudo, a metodologia laboratorial de processamento para obtenção das CTMs depende do tecido de origem, portanto trabalhar com tecido adiposo requer o aprimoramento de processos de forma diferente daquele empregado para medula óssea. São descritas duas técnicas para a manipulação do TA que são a digestão enzimática e a dissociação mecânica. Para a técnica de digestão, a enzima de eleição é a colagenase. O método de dissociação mecânica, apesar de estar descrito a muito tempo, tem sido pouco usado. A população de CTMs obtidas podem ser expandidas e posteriormente utilizadas para diferenciação e regeneração tecidual (Figura 3).



**Figura 3.** Multipotência das CTM<sup>ta</sup> e MO

*From: Lee RM, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. Cel. Physiol. Biochem. 2004; 14: 311-24*

A Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu os critérios de definição laboratorial para caracterização das células como CTM, ter as seguintes características obrigatórias: ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens; ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo. Devem expressar os seguintes antígenos de superfície de membrana (*clusters of differentiation* – CD) CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166, e não devem expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  e os antígenos leucocitários humanos (*human leukocyte antigen* - HLA-DR) (18, 20, 23). A expressão desses marcadores é variável e isso ocorre em função da origem tecidual, do método de isolamento e cultura e da espécie estudada (24).

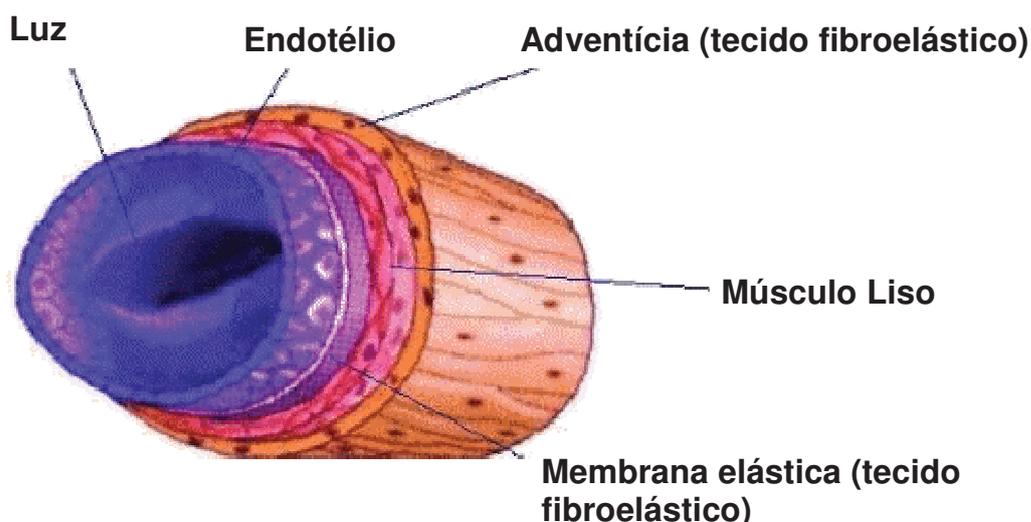
O uso dessas células em medicina regenerativa implica em isolamento e expansão sem a perda da capacidade de pluripotência, além da proliferação no estado de diferenciação (25, 26). Muitos estudos têm isolado as CTMs e tem controlado *in vitro* a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso utilizando fatores de crescimento

específicos, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo desses tecidos quando lesados (27).

A diferenciação celular é um processo que leva à expressão de características fenotípicas de células maduras *in vivo* e isso não é um fato irreversível (28). A diferenciação celular é um processo natural pelo qual é mantida uma constante renovação tecidual ou em resposta a lesões que requerem reparação tecidual. Fisiologicamente a diferenciação se faz pela indução de condições locais como alta densidade celular, interações célula-célula e célula-matriz, além da presença dos fatores de diferenciação endógenos. Está claro que são necessárias condições apropriadas de meio ambiente, além dos fatores de diferenciação para que esse processo possa ocorrer também *in vitro* assemelhando-se ao natural (28).

### I.3 – Vaso Sanguíneo

Os vasos sanguíneos são histologicamente formados por três camadas, sendo chamadas, da face luminal para fora, de túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. A composição de cada camada é variável de acordo com o tipo e calibre do vaso. A parede vascular, com exceção dos capilares, apresenta uma arquitetura complexa e propriedade mecânica única, estruturada a partir de três tipos de células: células endoteliais (CE) na túnica íntima; células musculares lisas (CML) na túnica média; e fibroblastos na túnica adventícia. Dentre elas, as CE e as CML têm papel principal na manutenção da integridade do vaso sanguíneo e das suas propriedades mecânicas (29) (Figura 4).

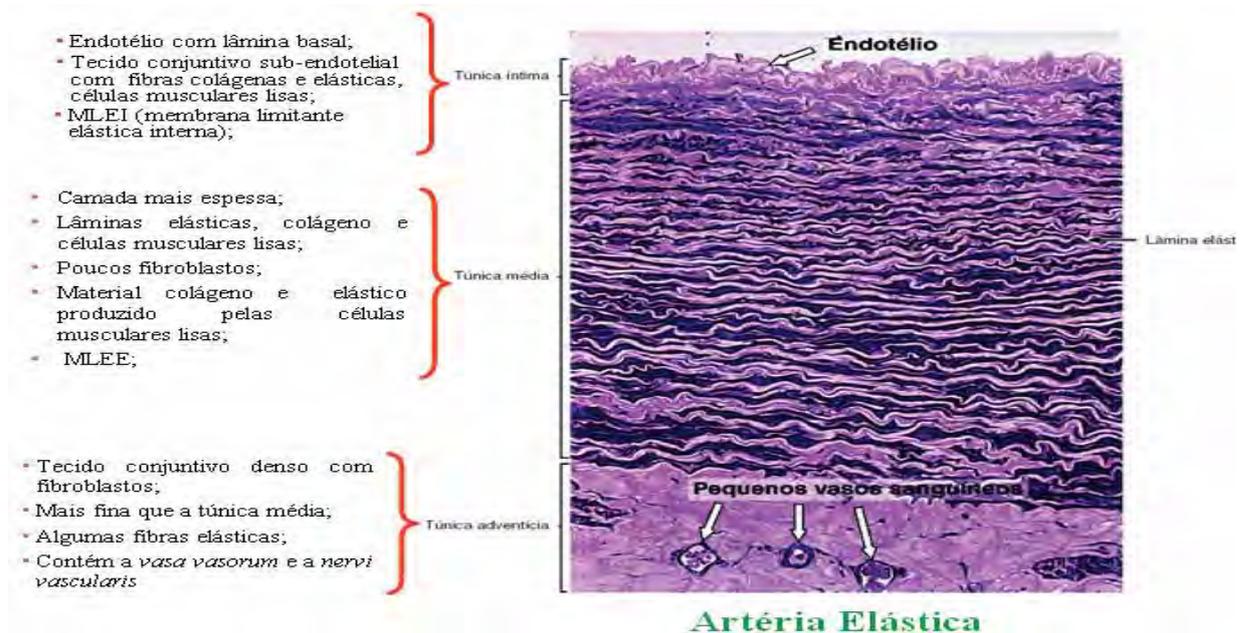


**Figura 4.** Modelo Tridimensional do vaso sanguíneo

Fonte: <http://greenfield.fortunecity.com/rattler/46/veins.htm>

As CE são poligonais, uniformes, arranjadas em monocamada (como ladrilhos alongados), paralelas ao fluxo sanguíneo, medindo entre 25 e 50µm de largura, são achatadas podendo medir até 3µm de espessura na região que contém o núcleo. Como característica diferencial, as CE além de conter todas as organelas comuns a todas as células, apresentam uma organela especial chamada de corpúsculo de Weibel-Palade, que armazena o Fator de von Willebrand (FvW) e a p-selectina. Convém salientar que as CE contém microfilamentos de actina e miosina em seu citoesqueleto, o que lhe confere contratilidade (4).

Certamente, a característica histológica dos vasos sanguíneos depende de sua localização no organismo, seu calibre e sua função. Porém, levando em consideração as artérias de médio e grande calibre, conhecidas por artérias elásticas, 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), 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 (29) (Figura 5).



**Figura 5.** Artéria Elástica – artéria de médio e grande calibre

Fonte: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10 th ed. RJ. 2004

#### I.4 – Função Endotelial

Inicialmente, a célula endotelial foi considerada uma barreira anatômica de prevenção para o extravasamento do sangue para o meio externo. Sabe-se que o endotélio vascular representa um sistema complexo, metabolicamente ativo e que mantém a homeostase do organismo através do controle do tono vascular, da regulação do transporte de solutos, do controle do crescimento celular local, deposição da matriz extracelular, protegendo o vaso sanguíneo contra injúrias das substâncias transportadas pelo sangue e regula respostas hemostáticas, inflamatórias e reparativas locais. Avanço fundamental para compreensão da fisiologia vascular foi quando se demonstrou que as CE contribuem ativamente na modulação do tono vascular atuando sobre o músculo liso da parede, através da produção e liberação de: fatores de contração (EDCFs) como endotelina-1 (ET-1), tromboxano A<sub>2</sub> (TX-A<sub>2</sub>), prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), e ânions superóxido; e fatores de relaxamento (EDRFs) como prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), e óxido nítrico (NO) (4).

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. O NO é o mediador primário da vasodilatação (30, 31). 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 *feed back* negativo (4).

As CE, além de sua interface com carga negativa antitrombosante, produzem ainda substâncias que atuam na regulação da trombose como a substância ativadora do fator VII, Fator de von Willebrand (FvW), anti trombina III, macroglobulina- $\alpha$ 2, tromboplastina inativada e possui em seu glicocálice sulfato de heparan. 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 (4, 32, 33).

## **I.5 – Lesão Endotelial e Aterosclerose.**

A formação da placa ateromatosa tem seu início com uma lesão endotelial crônica motivada por um fator de risco, seguida pelo aumento da permeabilidade endotelial. Uma crescente lista de fatores clínicos vem sendo implicados na disfunção endotelial: dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, aterosclerose, *diabetes mellitus*, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão pulmonar, deficiência de estrógeno e o processo de envelhecimento propriamente dito, entre outros (4). A disfunção endotelial é um estado de que envolve a ativação de diferentes sistemas, nos quais as CE promovem a produção de moléculas de adesão a plaquetas e monócitos, desequilíbrio das substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e a produção de fatores de crescimento. Isso se deve ao estresse oxidativo, elevado pela presença de altos níveis de LDL (*low density lipide*) oxidados na parede arterial, causando prejuízo na produção de fatores vasodilatadores como o NO e a PG I<sub>2</sub>, com conseqüente espasmo arterial. A LDL oxidada é quimiotática para monócitos e leucócitos e estimula a proliferação de músculo liso, originando auto-anticorpos e imunocomplexos que favorecem a migração para a íntima. Estas se transformam em macrófagos e células espumosas ao promoverem fagocitose de LDL, dando assim início a formação do depósito lipídico na parede do vaso (34-39). Ocorre também agregação plaquetária nas áreas desnudas de endotélio, migração das CML da média para íntima onde se proliferam e produzem matriz extracelular. Incorpora-se a restos lipídicos, além de ocorrer queda das substâncias antioxidantes, permitindo que os radicais livres atuem de forma viciosa na peroxidação lipídica (40).

A doença aterosclerótica pode apresentar-se em qualquer parte do sistema circulatório, com maior ou menor gravidade. Quando acomete o sistema circulatório arterial periférico, mais comumente os membros inferiores, onde se caracteriza por DAOP. Clinicamente, decorre da diminuição da oferta de nutrientes e oxigênio para os tecidos distais ao segmento arterial obstruído. Manifesta-se de forma gradual, com evolução progressiva, de forma lenta ou rápida e pode ter sintomas de intensidade variável. O paciente passa a apresentar dor ao deambular, o que se caracteriza pela claudicação intermitente, ou seja, dor referida na panturrilha ao caminhar determinada distância e que melhora com um intervalo de tempo em repouso. Seu último estágio clínico se caracteriza por isquemia crítica do membro acometido, passando a apresentar claudicação incapacitante, dor em repouso, lesões tróficas e finalmente gangrenas, o que geralmente requer alguma intervenção cirúrgica. Nos casos mais complexos, onde se esgotam as possibilidades de revascularização, freqüentemente são necessárias

amputações nos seus mais diversos níveis, o que se apresenta como uma debilitação para o paciente, que perde tanto em qualidade de vida como também passa a apresentar limitações para o trabalho, aumentando o custo social e finalmente pode levar a morte, por razões diretas ou indiretas. Segundo o último consenso internacional TASC II (*Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*) (5, 41), as taxas de patência dos enxertos em cinco anos são variáveis e dependem do território arterial tratado e o tipo de material empregado na revascularização. Porém, para os casos de oclusão do segmento femoro-poplíteo abaixo do joelho, onde são necessários enxertos longos, os que são realizados com veia autóloga mantêm 74-76% de patência em cinco anos contra 39-52% quando realizados com PTFE e, portanto há um número significativo de complicações tardias no seguimento desses pacientes (5, 41). Portanto, todo investimento em tecnologias para a recuperação da circulação desses pacientes beneficiam todas as esferas sociais, justificando pesquisas que buscam a melhoria das opções disponíveis.

## **I.6 – Engenharia Celular em Vasos Sangüíneos**

Desde o modelo proposto por Weinberg & Bell (1986) para confecção de um vaso sanguíneo através de ET, com a utilização de cultura de músculo liso e endotélio, coletados de veia nativa e expandidos em laboratório, tem-se buscado novas alternativas através da diferenciação de CT nos tecidos que compõe o vaso sanguíneo (14).

As características de um bom arcabouço 3D devem incluir a biocompatibilidade, manter estrutura tubular, fornecer resistência de parede para suportar as tensões mecânicas de tração e hemodinâmicas a fim de manter-se íntegro após sua implantação. Além disso, é interessante que seja um bom carreador, permitindo a liberação e o transporte de substâncias sinalizadoras, facilite a adesão celular, apresente biodegradabilidade, mantenha uma boa integração com os tecidos nativos, tenha elasticidade e porosidade para permitir a migração celular (42).

Alguns estudos suportam a idéia de usar a VD como *scaffold* para implantar CT e desenvolver um vaso sanguíneo biocompatível a partir da diferenciação de CT em endotélio, porém na literatura observa-se prevalência do uso de biopolímeros degradáveis com essa finalidade (42-46).

Estudos recentes têm procurado associar o uso de fatores de crescimento (FC) para a diferenciação de CTMs em endotélio. Os FC mais comumente utilizados como

aditivos para o meio de cultura são o fator de crescimento de endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos ( $\beta$  *fibroblast growth factor* - FGF) (36). Entretanto, uma série de combinações de fatores de crescimento pode ser encontrada na literatura, fazendo-se necessário a realização de mais estudos para real compreensão das suas funções em cada situação.(47)

A caracterização das CE produzidas pode ser feita por imunohistoquímica e citometria de fluxo, usando um amplo painel de marcadores anti CD14, CD31, CD34, CD54, CD105, CD133, CD141, CD143, CD144, CD145, CD146 entre outros (48-50). Entretanto, a maioria desses marcadores monoclonais não está disponível para o modelo utilizando coelhos, o que é um fator limitante para as pesquisas experimentais com esse animal.

### **I.7 – Plaquetas e seus Fatores de Crescimento**

A plaqueta sanguínea ou trombócito é um fragmento citoplasmático anucleado derivado do megacariócito, formado na medula óssea como as demais células do sangue. No ser humano normal, há entre 150.000 a 400.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue. Seu diâmetro é de 1,5 a 3,0 $\mu$ m e o seu tempo médio de vida é de cinco dias, sendo depois desse período destruída no baço. Sua principal função é a de atuar no processo de coagulação sanguínea, aderindo inicialmente ao subendotélio do tecido lesado que expõe colágeno. É ativada pelo FvW secretado pelas CE, aderindo-se entre si, mudando sua conformação com a emissão de pseudópodes e liberando o conteúdo de seus grânulos. Forma-se então, no processo inicial de coagulação, um trombo branco que será posteriormente estabilizado (4, 51).

A plaqueta é estruturalmente dividida em: 1- zona periférica, que é constituída pela membrana plasmática, pelo citoplasma cortical e estruturas associadas. Aí estão presentes as glicoproteínas (GP): integrinas e selectinas; 2- zona sol gel, que é constituída pela matriz do citoplasma plaquetário, incluindo seu citoesqueleto; 3- zona das organelas, onde encontram-se as organelas subcelulares envolvidas nos processos metabólicos e no estoque de enzimas. Especificamente em seus grânulos alfa, são encontrados os fatores mitogênicos, como o PDGF, VEGF, TGF $\beta$ , FGF, EGF, IGF, além de outras proteínas. Possuem ainda os corpos densos, lisossomos, peroxissomos entre outras organelas (52-55). Dois dos fatores de crescimento acima citados, o PDGF e o VEGF tem papel crucial na regulação das células endoteliais durante a constituição

da parede do vaso, porém seu envolvimento na regulação das CTMs durante a vasculogênese não é bem conhecido em função da extrema complexidade do tema (56).

As proteínas da família dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (*platelet derived growth factor* – PDGF) constituem um sistema de sinalização versátil composto por quatro ligantes reconhecidos pelas letras A, B, C e D, produzidos e armazenados nos grânulos  $\alpha$ . Dentro dos grânulos plaquetários estas moléculas estão na forma inativa. A ativação das moléculas de PDGF está relacionada com a sua liberação e interação com receptores de membrana tirosina-quinase (PDGFR $\alpha$ ). Durante o desenvolvimento embrionário e mesmo de reparação de lesões teciduais, o conjunto de sinalizadores PDGF/PDGFR $\alpha$  tem sido apontado como mediador de amplo espectro para funções críticas na embriogênese, organogênese e vasculogênese. É conhecido que, *in vivo*, os fatores de crescimento vasculares (VEGF) se apresentam em níveis muito baixos nos tecidos normais, mas em situações de reparo e regeneração tissular, a expressão desses fatores sofre um *up-regulation*.

Estudos recentes têm levado em consideração a complexidade da composição plaquetária e que ela apresenta-se como importante fonte de produção e armazenamento de fatores de crescimento para reparação tecidual. Têm-se buscando ampliar a sua utilidade como aditivo para curativos em busca da cicatrização de feridas, auxílio em cirurgias ortopédicas, cirurgias plásticas, odontologia entre outros. O LEC do Hemocentro de Botucatu tem mantido uma linha de pesquisa baseado na purificação dos hormônios plaquetários para a composição de gel laminar de uso em curativo tópico, o qual se comprovou como promotor de cicatrização, induzindo a neovascularização. Além disso, produziu-se um *scaffolds 3D* na forma de tapete de micro grânulos, onde foi possível incorporar CTMs para indução de diferenciação em tecido adiposo e condrócitos. (19) Acredita-se que os hormônios derivados de plaquetas possam ter a capacidade de regenerar o endotélio vascular a partir de células tronco por ter, entre seus fatores de crescimento, quantidade significativa de VEGF e FGF, justificando parte do presente estudo(55).

## **I.8 – Descelularização da Veia**

Atualmente, tem-se usado suportes biológicos derivados de tecido e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais, além de algumas aplicações

clínicas em humanos (57, 58). A utilização desses materiais naturais apresenta vantagens biológicas, porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso para garantir a descelularização dos mesmos e assim evitar a reação imunológica no receptor (59, 60).

Segundo Lopes (2009) “a descelularização de matrizes homólogas ou heterólogas são técnicas promissoras para evitar a falência do enxerto induzida pela resposta imunológica. Recentes estudos sugerem que heteroenxertos descelularizados induzem a uma resposta inflamatória diminuída por parte do receptor e são capazes de progressivamente serem repovoadas por células autólogas. Esses fatores possibilitam, pelo menos em teoria, melhorar a sobrevida tardia dos enxertos implantados” (61).

Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim induzem uma resposta inflamatória ou uma rejeição imuno-mediada ao tecido (33). Portanto, o objetivo dos processos de descelularização é remover todo o material celular e nuclear, porém preservando a estrutura tridimensional, a atividade biológica e a integridade mecânica da matriz extracelular restante (42, 57, 59, 60, 62). O desafio das técnicas de descelularização está na escolha das substâncias químicas, para que estas tenham um efeito residual mínimo e com isso não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo (60). Os melhores protocolos descritos na literatura especializada incluem a combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas usadas separadamente ou em conjunto a depender do tipo de tecido que espera-se descelularizar (60).

A utilização de tecidos descelularizados, hlogênicos ou xelogênicos, como arcabouço (*scaffold*) para o implante de células tem como objetivo mimetizar o tecido ou estrutura original. Em pesquisas recentes, esta técnica vem apresentando algumas vantagens técnicas em relação aos materiais sintéticos, e dessa forma, isso também pode ser investigado como uma alternativa para regeneração de vasos sanguíneos (63-67).

## *Objetivos*

## II – Objetivos

### II.1 – Objetivo Geral

Propor a construção de um modelo experimental de vaso sanguíneo para enxerto utilizando técnicas de engenharia de tecidos com a diferenciação de CTM<sup>ta</sup> em CE.

### II.2 – Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar técnicas para descelularização de veias retiradas dos animais doadores;
- Analisar a toxicidade dos diferentes métodos de descelularização empregados pela determinação do índice de apoptose pela caspase-3;
- Obter, expandir e caracterizar CTMs a partir de tecido adiposo de coelho;
- Comprovar a adesão das CTM<sup>ta</sup> sobre o *scaffold*;
- Construir um modelo tridimensional (3D) a partir das veias descelularizadas como *scaffold* para a adesão de CTM<sup>ta</sup>;
- Diferenciar células endoteliais vasculares a partir de CTM<sup>ta</sup> sobre o *scaffold* 3D como modelo de enxerto vascular.
- Realizar a caracterização histológica das células endoteliais aderidas ao *scaffold*.

## *Materiais & Métodos*

### III - Materiais e Métodos

Este projeto foi desenvolvido com estrita colaboração da equipe de Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu (FMB); do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Ortopedia; do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu (LEC), do Serviço de Anatomia Patológica da FMB; e do Serviço de Morfologia do Laboratório de Imunohistoquímica do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (IBB). Esta parceria mostra que trabalhos de engenharia celular com vistas à Terapia Celular necessitam equipes multidisciplinares unidas em prol de objetivos claramente definidos.

#### Animais

Foram utilizados 15 coelhos adultos, fêmeas não prenhas da raça Nova Zelândia, linhagem Botucatu, com peso entre 2,5 e 3 kg para a realização de todos os experimentos. Os animais foram previamente anestesiados por via intramuscular com Zoletil<sup>®</sup> na dose de 15,0 – 30,0 mg/kg de peso associado ao cloridrato de xilazina (Anasedan<sup>®</sup>) a 2% na dose de 4 mg/kg de peso. As áreas de acesso para retirada de tecidos foram previamente tricotomizadas e em seguida submetidas à assepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I). Todos os procedimentos foram realizados utilizando campos cirúrgicos, luvas e materiais cirúrgicos estéreis.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado conforme protocolo de aprovação nº 711.

Para atender os objetivos traçados, etapas bem definidas foram estabelecidas. Para o desenvolvimento das técnicas empregadas, etapas distintas foram necessárias:

- 1- Obtenção das veias e das amostras de tecidos adiposos dos coelhos;
- 2- Protocolos de descélularização da veia para obtenção do *scaffold* e processamento histológico;
- 3- Testes de toxicidade residual dos *scaffolds*;
- 4- Preparo e expansão das CTMs derivadas de TA;

- 5- Caracterização por Citometria de Fluxo das CTM<sup>ta</sup>;
- 6- Testes de marcação e adesão das CTM<sup>ta</sup> ao *Scaffold*;
- 7- Diferenciação e caracterização celular;
- 8- Dosagem do FvW do sobrenadante das culturas.

### **Etapa 1 – Obtenção das veias e das amostras de tecidos adiposos dos coelhos**

Após o procedimento de anestesia, conforme descrito anteriormente, foram retiradas cirurgicamente amostras de TA interescapular, veias jugulares e as veias cava dos cinco animais. Os fragmentos de TA foram colocados individualmente em tubos Falcon® de 50ml com tampão *Roswell Park Memorial Institute* ácido n-(2-hidroxietilo)-piperazina-n`-2-etanesulfônico (RPMI HEPES - Invitrogen®) com antibiótico e antimicótico (Estreptomicina e Anfotericina B) (Figura 6). As veias foram lavadas interna e externamente com soro fisiológico 0,9% e heparina não fracionada 1000UI/100ml para retirada criteriosa do sangue e colocadas em tubo Falcon® estéril com meio de transporte, sendo que no total foram processados 90 fragmentos de 2 cm, conforme detalhado no fluxograma abaixo (Figura 7). Os materiais coletados foram encaminhados para o LEC e mantidos em geladeira durante 24 horas (+4°C) com objetivo de minimizar a contaminação bacteriana do procedimento de cultura celular. Posteriormente, os materiais foram submetidos aos protocolos de digestão enzimática ou descelularização respectivamente.



**Figura 6.** Procedimento de coleta de tecido adiposo de coelho.

Foto: arquivo pessoal, 2011.



**Figura 7.** Fluxograma da Obtenção e Manipulação das veias de coelho.

Após a retirada do material biológico de interesse, os animais foram submetidos à eutanásia, conforme previsto e aprovado pelo COBEA com injeção letal, intravenosa de pentobarbital.

## **Etapa 2 – Protocolos de descelularização da veia para obtenção do *scaffold* e processamento histológico.**

No LEC, em câmara de fluxo laminar, ambiente estéril, as veias, tanto jugulares como cavas, foram separadas em fragmentos de aproximadamente 2cm de comprimento para em seguida serem submetidas aos protocolos de descelularização, isto é, a remoção das células e de seus antígenos (HLA – *human leucocyte antigen* e MHC - *major histocompatibility complex*) oriundos dos animais doadores. (Figura 8)



**Figura 8.** Fragmentos de veia para descelularização.

Foto: arquivo pessoal, 2011

Os fragmentos de veia foram então submetidos aos protocolos de descelularização, por passagens em soluções de detergentes químicos pré-definidos, baseando-se nos achados adaptados de Evaristo (2011) (68). Levou-se em consideração que o trabalho citado utilizou a traquéia como modelo, sendo a resistência da estrutura, maior à ação dos diferentes agentes químicos em comparação com a veia, e dos achados publicados por Schaner (2004) (42) que validou o tratamento de veias com SDS para produção de *scaffolds* venosos (Figura 9). Foram descelularizados 83 segmentos de veias de 2cm, conforme fluxograma abaixo (Figura 10).



**Figura 9.** Processamento de descelularização dos fragmentos de veia.

*Foto: arquivo pessoal, 2011*

Foram testados três agentes químicos que atuam como detergentes: Triton X-100; deoxicolato de sódio (DS); e duododecil sulfato de sódio (SDS), testados em 11 diferentes protocolos que variaram tanto a concentração do agente químico quanto o tempo de exposição ao mesmo (Figura 10). Para cada protocolo utilizou-se 3 fragmentos de veia além do controle. Nesta etapa foram utilizados 44 segmentos de veias de 2 cm.

TRITON X-100	Deoxicolato de Sódio (DS)	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
• 1% - 1 h	• 1% - 1 h	• 0,1% - 1 h
• 1% - 2 h	• 1% - 2 h	• 1% - 1 h
• 2% - 1 h	• 2% - 1 h	• 1% - 2 h
• 2% - 2 h	• 2% - 2 h	

**Figura 10.** Diagrama de descelularização das veias com 3 detergentes: Triton X 100, DS e SDS, em diferentes concentrações e tempo de exposição variável.

Os procedimentos de descelularização respeitaram protocolo pré-estabelecido como descrito abaixo:

1. **Triton X-100** – concentração de 1% em agitador por uma hora; concentração de 1% em agitador por 2 horas; concentração de 2% em agitador por 1 hora; e concentração de 2% em agitador por duas horas.

2. **Deoxicolato de Sódio (DS)** – concentração de 1% em agitador por 1 hora; concentração de 1% em agitador por 2 horas; concentração de 2% em agitador por 1 hora; e concentração de 2% em agitador por duas horas.
3. **Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)** – concentração de 0,1% em agitador por 1 hora; concentração de 1% em agitador por 1 hora; e concentração de 1% em agitador por 2 horas.

Para a otimização dos agentes químicos detergentes, etapas de agitação foram necessárias. Para esta etapa foi utilizado equipamento *Shaker News Brunswick Scientific*® (Figura 11).



**Figura 11.** Processo de agitação contínua das veias em contato com o detergente químico, em equipamento *Shaker*. Detalhe interno, com os tubos cônicos contendo as veias em presença do detergente com fixação dos tubos para agitação orbital.  
*Foto: arquivo do LEC, 2011*

Após a realização de todos os processos de descellularização, os mesmos foram submetidos a processamento histológico com HE, no Departamento de Morfologia do IBB.

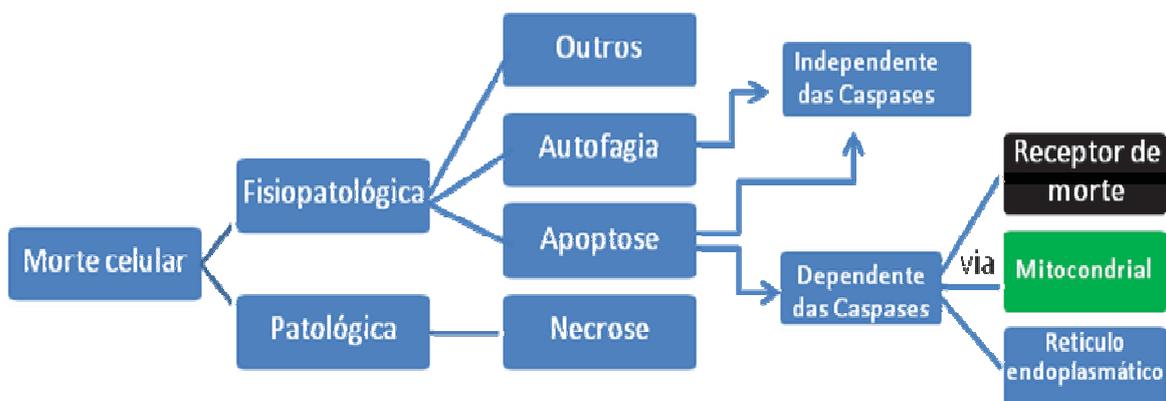
A técnica para obtenção das lâminas constituiu-se na fixação dos fragmentos descellularizados em formol 10% para posterior inclusão em historresina. Após o ajuste do micrótomo para realizar cortes de 5 $\mu$ m de espessura, os foram realizados os cortes histológicos. Os cortes foram corados com HE da seguinte forma: imersão das lâminas em hematoxilina de Harris por 30 minutos; lavagem em água corrente por 10 minutos; imersão em solução diferencial por 1 minuto; imersão em eosina por 5 minutos;

lavagem em água corrente por 10 segundos; e montagem da lâmina em *permout* e lamínula (19).

### Etapa 3 – Testes de toxicidade residual dos *scaffolds*

Apoptose é um termo usado para diferenciar a morte celular por necrose da morte fisiológica programada. Segundo Kerr *et al.* (1972), a morte celular por apoptose foi designada como a morte natural e programada das células (69). Este fenômeno se distingue da necrose, sendo sua classificação inicial baseada nas características morfológicas das células. Na apoptose, a célula torna-se progressivamente picnótica e perde suas organelas, enquanto na necrose, formam-se poros na membrana que permitem a entrada de líquido de forma não controlada, aumentando o volume celular e destruindo secundariamente as organelas intracelulares. Propôs-se que estas modificações são parte de um programa de morte com regulação intracelular, que pode ser inibido ou ativado a depender de estímulos fisiológicos ou patológicos (70). A morte celular por apoptose também pode ser controlada por sinais extracelulares. No entanto, os mecanismos de sinalização envolvidos na indução de morte por essa via ainda não foram bem elucidados. O mais provável deve ser uma combinação de fatores ativadores e inibidores que determine a condição de morte ou vida da célula (70-72).

A injúria que leva ao desencadeamento da morte celular pode ser determinada por inúmeros fatores como: hipóxia tissular, agressão infecciosa, imunológica, tóxica entre outros, além de danos de DNA. O fluxograma abaixo representa didaticamente as vias de morte celular (Figura 12).



**Figura 12.** Representação didática das vias de morte celular.

A literatura aponta duas formas de morte celular: a programada denominada fisiopatológica e a patológica. A primeira apresenta 3 vias: apoptose, autofagia e outros mecanismos. A morte celular fisiopatológica do tipo autofágica é sempre independente da via das caspases enquanto que a do tipo apoptose pode ser independente ou dependente, esta última pode estar relacionada a receptores de morte, aos mecanismos respiratórios mitocondriais ou a mecanismos ligados ao retículo endoplasmático. A segunda forma de morte celular, a patológica determina sempre a necrose. Esta pode ser secundária à injúria celular por inúmeros fatores como: hipóxia tissular, agressão infecciosa, imunológica, tóxica entre outros, além de danos de DNA.

A morte celular fisiológica, ocorrida por autofagia das células, determinada por alterações citoplasmáticas, e posterior condensação da cromatina e diminuição do volume celular seguido com a formação dos autofagossomos. Pode ser medida tecnicamente de duas formas: testes de viabilidade e determinação da exposição das fosfatidilserinas (proteínas intrínsecas da parede interna da membrana). Na apoptose mediada pelas caspases, os testes são mais complexos e devem evidenciar o comprometimento dos receptores de morte, do retículo endoplasmático e da via respiratória mitocondrial. Esta via de apoptose pode ser identificada por testes de citometria de fluxo medindo a Caspase-3. A Caspase-3 é uma protease chave que é ativada durante o estágio inicial da apoptose e, como ocorre com outros membros da família das caspases, é sintetizada como uma enzima pró-inativa que é processada em células em apoptose pela auto-proteólise e/ou por outra clivagem da protease (73, 74).

Para o teste de toxicidade residual dos detergentes elencados na pesquisa, foi elaborado um protocolo para estabelecer o grau de apoptose que estes *scaffolds* de veia descelularizadas provocariam nas CTM<sup>ta</sup> quando expostas a eles. Tal método foi realizado com o kit Caspase-3 para citometria de fluxo. Utilizou-se então uma cultura de CTM<sup>ta</sup> previamente expandida, que foi submetida ao tratamento com tripsina-EDTA para destacar do frasco de cultura e proceder a contagem. Alíquotas de  $1 \times 10^6$  células foram separadas para aplicação em seis poços de placa não aderente contendo os fragmentos de veias descelularizadas pelos 3 métodos: DS 1% 2h; DS 2% 1h e SDS 1% 2h. O conjunto foi mantido em cultura por 48h, a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub>. Nesta etapa foram realizadas as técnicas de:

1. Viabilidade com corante azul de tripano;

2. Determinação da Caspase-3 por citometria de Fluxo utilizando equipamento *FacsCalibur BD™*.

Para a determinação da viabilidade, 50µL de uma concentração de  $1 \times 10^6$  células foi colocado na presença de 50µL de azul de tripano a 0,4%. Aspirou-se o conjunto depositando sobre câmara de Neubauer procedendo-se a contagem das células vivas (brilhantes) e células mortas (coradas de azul forte).

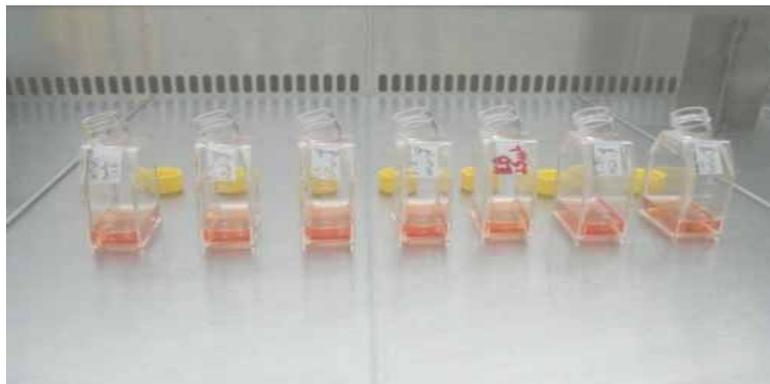
Para a determinação da marcação intracelular com anti-Caspase-3 por citometria de fluxo, incubou-se  $1 \times 10^6$  células com a solução permeabilização por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram lavadas e uma nova incubação foi realizada com 20µL de anticorpo monoclonal anti-caspase-3 na presença de 100 µL de solução de permeabilização por 45 minutos no escuro. Os protocolos foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes do Kit. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento FACsCalibur da BD® e a reação analisada com auxílio do software Cell Quest™ da BD.

#### **Etapa 4 – Preparo e expansão das CTMs derivadas de TA**

Após coleta, o tecido adiposo foi transportado ao LEC. O processo utilizado para dissociação do tecido foi o enzimático com o uso da enzima (colagenase Invitrogen™).

Para o processo de digestão enzimática a amostra de TA foi colocada em solução de colagenase tipo I (Invitrogen™), incubada a 37°C durante 15 horas em ambiente de estufa com jaqueta de água a 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Após este período a ação da enzima foi neutralizada pela adição de SFB e o conteúdo centrifugado a 1200rpm durante 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensão novamente em SFB e procedida nova centrifugação. O *pellet* foi ressuspensão em 1mL de meio de cultura (*Dulbecco`smodifiedEagle`smedium* – DMEM-F12) retirando-se alíquota de 30uL para contagem em câmara de Neubauer. Essa contagem tem como finalidade a verificação da viabilidade celular e estimar o número de células totais para então proceder ao plaqueamento em frascos de 25 cm<sup>2</sup> de área de cultura (Nunc®) e dar seguimento à cultura, com Meio de Cultura (MC) específico para CTMs – DMEM-F12. As células permaneceram em estufa à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Class 100®) (75). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Ao identificar, no monitoramento por microscopia

invertida (microscópio Axiovert 200<sup>®</sup>, Zeiss<sup>™</sup>), que os frascos apresentavam confluência superior a 80% da área da placa, as células foram destacadas com 0,25% de tripsina/1mm de (Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) (Invitrogen<sup>™</sup>), contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> (Nunc<sup>™</sup>) (19, 75). Após a terceira passagem em tripsina, as células foram criopreservadas em dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnologia<sup>™</sup>) 10% SFB, em nitrogênio líquido na temperatura de -196°C, ou utilizadas para os procedimentos de diferenciação celular.



**Figura 13.** Processo de expansão celular em frascos de cultura.

Foto: arquivo pessoal, 2011.

### **Etapa 5 – Caracterização por Citometria de Fluxo das CTM<sup>ta</sup>**

A caracterização das CTM<sup>ta</sup> foi realizada após terceira passagem em cultura, com os marcadores (proteínas) de superfície, através do uso de anticorpos específicos para CF, técnica que mede características físico-químicas de células individualmente, as quais passam por um sistema fluido e são detectadas por um ou mais sensores óticos e eletrônicos. As análises foram processadas no equipamento *FacsCalibur* da BD<sup>™</sup> utilizando o software CellQuest Pro<sup>®</sup>, levando em consideração, tamanho, granulosidade e média da intensidade de fluorescência. Após esta confirmação, foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.

Tendo em vista, que não havia no mercado anticorpos específicos para o reconhecimento de antígenos expressos nas células de coelho, foi usado um anticorpo *anti-rat* como controle positivo para as CTMs: Anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) - Biolegend<sup>®</sup>; sendo que a bula do anticorpo da Biolegend<sup>®</sup> garante reação cruzada com coelho.

Além disso, foram utilizados dois anticorpos monoclonais (AcMm) do protocolo MSC, produzidos no LEC do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, que foram obtidos conforme descrição apresentada na dissertação de Moroz (2009) (19). Esses clones foram produzidos a partir de CTMs de medula óssea de coelho. Os AcMm obtidos *home made* utilizados foram: MSC1-160A69 (com positividade apresentada de 78,8% para CTMs de medula óssea de coelho) e MSC1-160A30 (com positividade apresentada de 84,57% para CTMs de medula óssea de coelho).

A produção de AcMm segue as seguintes etapas: imunização, fusão celular, *screening*, clonagem, novo *screening*, amplificação dos clones, determinação de classe e subclasse de imunoglobulina e confirmação da monoclonalidade. Utiliza-se CTMs isoladas de medula óssea de coelho, expandidas *in vitro*, cultivadas por duas semanas e criopreservadas; então os antígenos, proteínas de membrana, são apresentados em sua forma integral. Quando se deseja anticorpos da classe IgG para utilização em citometria de fluxo, adota-se o protocolo longo de imunização (19).

#### **Etapa 6 - Teste de marcação e adesão das CTM<sup>ta</sup> ao Scaffold**

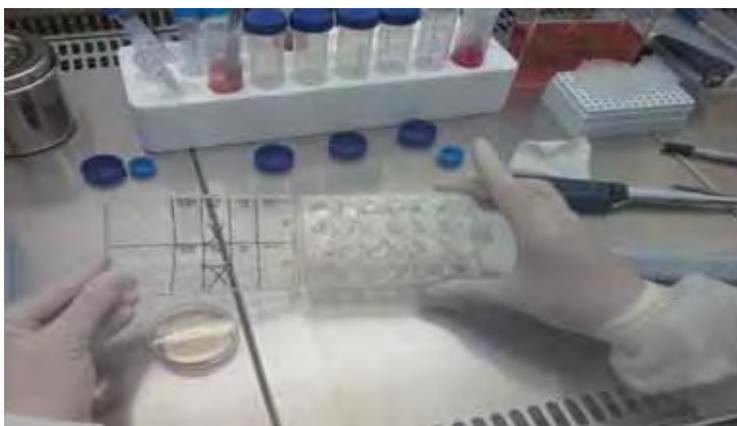
Para garantir a fidelidade dos resultados obtidos com o procedimento de cultura, um teste de marcação e adesão das CTM<sup>ta</sup> ao *scaffold* foi realizado. Utilizou-se uma amostra de CTM<sup>ta</sup> previamente crio-preservada em nitrogênio líquido a -196°C. Após descongelamento lento, foi procedida a contagem das células viáveis com uso de azul trípiano em câmara de Neubauer, seguido de centrifugação à 1200rpm por 10 minutos para remoção do MC e obtenção do botão celular. Para marcação das células foi aplicado o marcador *Qtracker® Cell Labeling Kits* - Invitrogen® conforme instruções do fabricante, homogeneizando 1µL do componente A + 1 µL do componente B seguido de incubação por 5 minutos. Após este procedimento foi adicionado 200 µL de MC e homogeneizado no vórtex por 30 segundos. Sobre o volume de 200 µl da solução A+B foram colocadas as CTM<sup>ta</sup> e incubado à 37°C por 45 a 60 minutos. Foi acrescentado 1 mL de MC e centrifugado por duas vezes a 1200rpm durante 10 minutos, removido o MC e ressuspenso o *pellet* com 10 µL de solução de sacarose 10% (preparada no protocolo Puramatrix® conforme especificações do fabricante – BD Puramatrix Peptide Hydrogel). Foi acrescentada sempre a mesma quantidade em volume da solução de Puramatrix® acrescida de sacarose, para então adicionar MC que é o promotor da gelificação do Puramatrix® já contendo as células. Após aspiração de

20 $\mu$ L da solução preparada, as células foram aplicadas na luz interna do *scaffold* descelularizado. Este último procedimento foi repetido três vezes.

Após 30 minutos de incubação, as veias contendo a solução de Puramatrix e CTM<sup>ta</sup> previamente marcadas foram transportadas *in natura* para o Departamento de Patologia da FMB para realizar técnica de congelação e cortes histológicos. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX41 acoplado a câmera digital Olympus Camedia C-7070 do mesmo departamento.

### **Etapa 7 – Diferenciação e caracterização celular**

As CTM<sup>ta</sup> previamente expandidas, como descrito anteriormente, foram submetidas ao tratamento com tripsina-EDTA e ressuspendidas em meio de cultura M199 na proporção de  $1 \times 10^5$  células/100 $\mu$ L. Os procedimentos foram testados de duas formas diferentes, sendo reproduzidos cinco vezes no primeiro experimento e quatro vezes no segundo experimento.



**Figura 14.** Processamento de cultura celular em placa não aderente.

Foto: arquivo pessoal, 2011

O suplemento de hormônios derivados de plaqueta foi obtido de 6 bolsas de concentrados de plaquetas humanas do estoque excedente do Hemocentro de Botucatu, *in natura* e não congelados contendo em média 50 a 60 mL de volume em uma concentração média de  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas e foi repetido duas vezes, uma para cada experimento. Estes foram centrifugados a 9000rpm para concentrar as plaquetas. O sobrenadante foi descartado. As plaquetas foram lavadas duas vezes com meio HEPES. Em seguida as plaquetas foram lisadas com água para injeção no volume de 20

mL/unidade e agitadas em *shaker* por 5 minutos. O produto foi novamente centrifugado e desta vez coletou-se o sobrenadante. Este sobrenadante foi usado como suplemento de fatores de crescimento derivados de plaquetas, contendo em média 35.000pg/dl de PDGF e 350pg/dl de VEGF, sendo estas concentrações médias previamente determinadas pelo método ELISA utilizando kits R&D Systems® no LEC do Hemocentro da FMB.

Os *scaffolds* descellularizados pelo protocolo **SDS 1% 2h**, por terem sido considerados histologicamente os melhores antes da realização dos testes de Caspase-3 e por já terem sido descritos previamente na literatura, foram utilizados nos dois experimentos realizados (42).

No **primeiro experimento**, todas as 15 amostras do *scaffold* de veia descellularizada de aproximadamente 2cm, foram embebidas por 30 minutos em SFB. Então, os fragmentos foram colocados um a um em diferentes poços de uma placa não aderente de 24 *wells* (Costar® - *ultra low cluster plate*). Sobre cada um dos espécimes foi aplicada uma alíquota de 100µL de MC contendo  $1 \times 10^5$  CTM<sup>ta</sup>, com exceção do controle que recebeu apenas MC. O conjunto foi mantido sob incubação por uma hora para pré-aderência. Após este período foram adicionados 1,5 mL de MC em cada poço da seguinte forma:

- 1) controle contendo VD + MC M199;
- 2) VD+CTM<sup>ta</sup> + MC M199;
- 3) VD+CTM<sup>ta</sup> + MC M199 + 10% de hormônios derivados de plaquetas.

A cultura teve troca de meio respeitando o protocolo acima descrito, de cada 48 em 48 h e mantida em expansão por 3 semanas em condições ideais de cultivo. Após 3 semanas de cultivo, as veias foram encaminhadas para análise histológica com as colorações: HE e *Oil Red*.

Foi procedida a coloração com Hematoxilina-eosina respeitando o procedimento padrão, sendo utilizada metade de cada segmento de veia cultivada ao processamento histológico padrão para HE: fixação em formol 10% tamponado durante 24 horas; lavagem por 24 horas em água corrente; aplicação da bateria de desidratação em etanol (70%, 80%, 90%, 95%, 100% I, 100% II e 100% III) durante 30 minutos por solução; após a desidratação o material foi diafanizado (Álcool/Xilol, Xilol I, Xilol II e Xilol III) durante 10 minutos por solução; seguiu-se a inclusão em Paraplast<sup>R</sup>; e por fim foi

realizada a microtomia (5µM). Procedeu-se coloração com HE e montagem das lâminas para posterior avaliação histomorfológica.

A outra metade de cada fragmento foi submetida à coloração com *Oil Red* após técnica de congelamento em nitrogênio líquido, transferência para a câmara de criostato do Departamento de Patologia da FMB (*International Equipament Company*) a -20°C, onde os fragmentos foram fixadas em suporte metálico com Tissue-Tek® - O.C.T.™ e foram procedidos os cortes histológicos com 6 µm de espessura para seqüência para coloração: fixação em formol 10%; lavagem em água corrente por 10 minutos; enxágüe com isopropanol 60%; aplicação de *Oil Red* (Sigma código O9755) por 15 minutos; enxágüe com isopropanol 60%; coloração dos núcleos com hematoxilina com 5 imersões rápidas; enxágüe com água destilada; e finalmente foram montadas as lâminas com *permout* para posterior avaliação histomorfológica. Esta coloração foi necessária, pois a observação macroscópica identificou a formação de tecido gorduroso na maioria das culturas.

No **segundo experimento** foram ajustados alguns parâmetros em relação ao primeiro experimento, para tentar obter resultados ainda melhores. Foram processadas 3 amostras de 4 coelhos diferentes. Este protocolo foi feito em duplicata, desta forma, o número de VD deste experimento foi no total de 24. Não houve alteração na concentração de  $1 \times 10^5$  células/100µL, mantendo o *scaffold* como sendo um fragmento de VD de 2cm utilizando o protocolo de descelularização com SDS 1% 2 horas. As modificações foram: os *scaffolds* não foram previamente embebidos em SFB; o tempo de incubação para pré aderência que foi de 4 horas; as CTM<sup>ta</sup> foram aplicadas na face interna do *scaffold* (luz); e a proporção do volume de hormônios derivados de plaquetas foi de 30% (3 vezes superior ao utilizado no experimento precedente, para aumentar as concentrações de PDGF e VEGF).

Cada fragmento de VD foi então colocado em cada poço de uma placa de cultura não aderente de 24 poços (Costar® - *ultra low cluster plate*) e aplicada uma alíquota de 100µL de MC contendo  $1 \times 10^5$  CTM<sup>ta</sup> na face interna (luz) do *scaffold*, com exceção do controle que recebeu apenas MC e incubadas por 4 h. Em seguida foi acrescido 1,5mL de MC em cada poço da seguinte maneira:

- 1) controle contendo VD + MC M199;
- 2) VD+CTM<sup>ta</sup> + MC M199;
- 3) VD+CTM<sup>ta</sup> + MC M199 +30% de hormônio derivado de plaquetas.

A cultura foi mantida por 3 semanas, sendo trocados os meios de acordo com o pré estabelecido de 48 em 48 h. A veia tratada foi então coletada para análise histológica e caracterização imunohistoquímica (IHQ).

A **caracterização IHQ** foi realizada no Departamento de Patologia da FMB, utilizando-se o protocolo técnico padrão (vide em anexos 1), partindo-se de cortes histológicos de blocos previamente montados com Paraplast<sup>R</sup> em lâminas de vidro revestidas com Poli-L-Lisina (*Sigma Chemical Co*®). Para estes procedimentos foram utilizados os dois anticorpos monoclonais murinos produzidos home made: MSC1-160A69 e MSC1-160A30, específicos para o reconhecimento de CTMs de coelho e um AcMm *anti human fascin*.

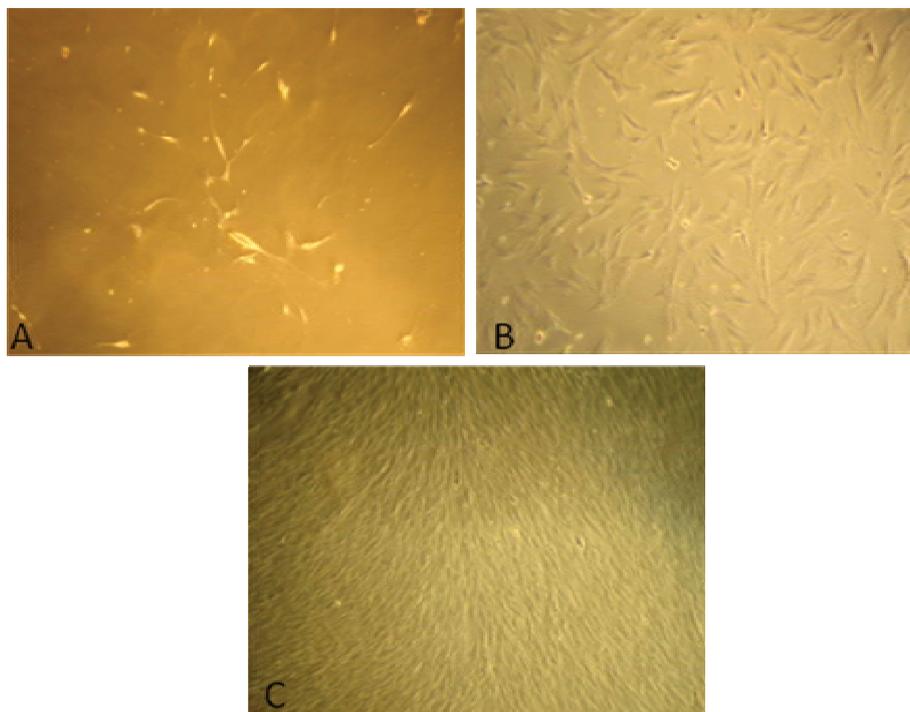
### **Etapa 9 – Dosagem do Fator de von Willebrand do sobrenadante das culturas**

Ao final da terceira semana de cultura no segundo experimento, foi coletada alíquota de 200µL de sobrenadante de cada poço da cultura e colocado em recipientes identificados para dosagem de FvW, onde ocorreu a perda de um conjunto de amostras, restando então 7 amostras. Para tal, os recipientes foram transportados para o Laboratório de Anticoagulação do Hemocentro da FMB e armazenados em *freezer* até que pudessem ser processadas na semana seguinte. No momento da dosagem do FvW foi realizado o descongelamento do sobrenadante e posteriormente aplicado o método ELISA, utilizando-se o *Von Willebrand Antigen test kit* conforme instruções do fabricante (Corgenix, Inc.) *Reaads*®. A leitura foi feita traçando-se uma curva de absorbância *versus* atividade resposta, tendo como resultados valores em porcentagem.

## *Resultados & Discussão*

#### IV – Resultados e Discussão

Foram obtidos fragmentos de tecido gorduroso de 15 coelhos, sendo que 10 coelhos foram obtidos por colaboração com outros alunos da pós-graduação e que seriam submetidos a eutanásia. O peso médio de cada fragmento foi de 1,75g. Após os procedimentos de digestão enzimática com tripsina, as células foram contadas e plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células linfomononucleares/frasco de  $25 \text{ cm}^2$ , estando entre elas as CTM<sup>ta</sup>. Após dois dias de cultura, observaram-se duas populações celulares: células não aderentes, que foram descartadas pela troca do meio de cultura e células aderentes, que foram expandidas. A adesão de células no fundo do frasco, inicialmente vistas em microscopia invertida com baixa densidade (Figura 15 A.), iniciando nos dias seguintes a formação de colônias dispersas conforme descrito na literatura, apontam para o crescimento de CTM<sup>ta</sup> ( Figura 15 B) (24). As células foram mantidas em cultura e passaram a apresentar a formação de colônias (clusters) e, após sete dias já apresentavam confluência maior que 90% (Figura 15C).

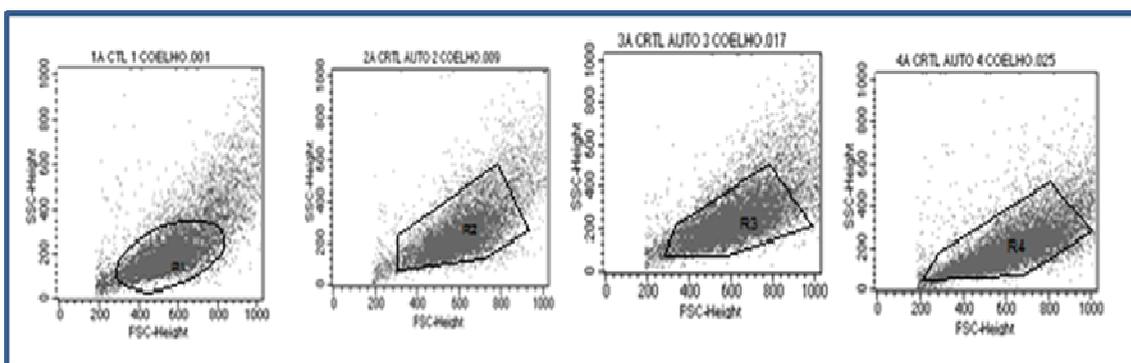


**Figura 15** – CTM<sup>ta</sup> em microscopia invertida em contraste de fase, aumento 10X. A=48 h de cultura, poucas células aderentes, formação fibroblastóide. B=72 h de cultura, confluência ~70%. C=confluência de 100%.

*Foto: arquivo pessoal, 2011*

Morfologicamente, apesar de heterogeneidade da população celular, as células em cultura mantiveram as características de CTMs, apresentando-se alongadas, justapostas, providas de prolongamentos (pseudópodes), com aspecto fibroblastóide e presença de dois nucléolos na região nuclear, corroborando com os achados da literatura (24).

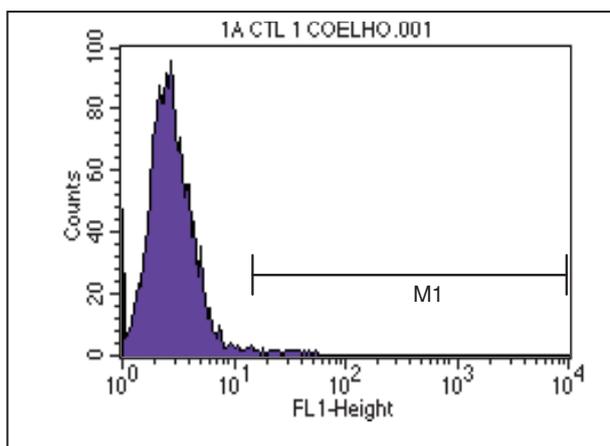
As células mantiveram estas características até a terceira passagem da cultura, correspondendo ao período em que apresentam confluência  $\geq 80\%$ . Na terceira passagem, as células apresentavam uniformidade, além de quantitativamente ter sido possível analisá-las e realizar a caracterização fenotípica por Citometria de Fluxo. Tendo em vista que as características observadas por microscopia não são exclusivas de CTM<sup>ta</sup>, faz-se necessária a realização destes métodos complementares por CF. Esta etapa encontrou uma dificuldade adicional frente ao fato de que no mercado não estavam disponíveis, no início das análises, marcadores específicos para a espécie em estudo (coelho). Optou-se pela utilização de anticorpo anti-CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit* - Biolegend®), que apresentou boa sensibilidade (variou de 95-98% - com média de 96,5%), além de dos dois clones produzidos *home made* (MSC1-160A69 e MSC1-160A30). Amostras provenientes de 4 coelhos diferentes foram escolhidas aleatoriamente entre as 5 plaqueadas. As análises do padrão de contagem total de células mononucleares aderentes mostrou distribuição muito semelhante, apontando que na terceira passagem (ao redor de 21 dias de cultura) as CTM<sup>ta</sup> foram “purificadas”, por sua característica de adesão ao plástico. Na leitura com CF, as células são distribuídas no gráfico levando em consideração tamanho e granulosidade (Figura 16).



**Figura 16.** Análise com CF. Gráficos de dispersão das CTM<sup>ta</sup> por tamanho e granulosidade.

O número médio de células analisadas nos 20 experimentos foi de 10.423 células. Os controles negativos mostrou em média 0,25 % de positividade

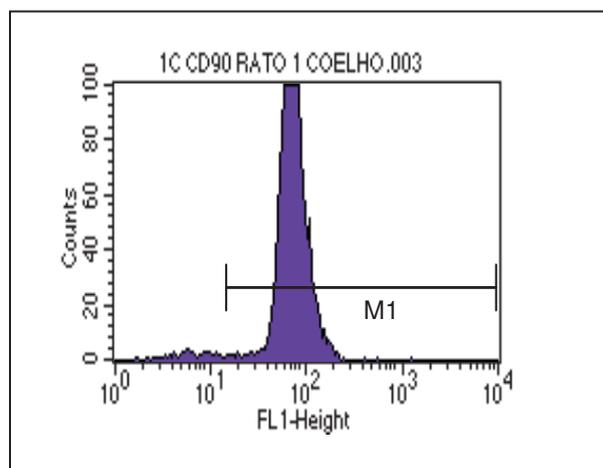
correspondendo ao que se denomina auto-fluorescência. No histograma abaixo estão os resultados das análises das amostras do controle negativo de um dos coelhos, onde 10.777 células foram analisadas, com 0,35% de positividade (autofluorescência), com mediana de 23,29. Observa-se ainda que o pico de células se encontra próximo ao eixo correspondendo à reação negativa.



File: 1A CTL 1 COELHC  
 Acquisition Date: 24-Ma  
 Gate: G1  
 Gated Events: 8049  
 Total Events: 10777

Marker	Events	%Gated	% Total	Median
All	10777	100	74,69	2,59
M1	28	0,35	0,26	23,29

**Figura 17.** Análise por CD das CTM<sup>ta</sup> do coelho 1 – controle negativo.



File: 1C CD90 RATO 1 COELHO.003  
 Acquisition Date: 24-Mar-11  
 Gate: G1  
 Gated Events: 8460  
 Total Events: 10461

Marker	Events	%Gated	% Total	Median
All	10461	100	80,8	67,5
M1	820	97	79,06	67,3

**Figura 18.** Análise por CF das CTM<sup>ta</sup> do coelho 1 - reatividade com anti-CD90

Após as análises das células, sua distribuição e granulosidade, procedeu-se as leituras do percentual de reconhecimento com o anticorpo de especificidade anti-CD90 (Figura 18). A média de eventos (número de células e outras partículas que passam pelo *laser* do equipamento), nas quatro amostras analisadas para cada animal, foi de 10.101 enquanto que o padrão do controle negativo tece média de 0,17%. O anti-CD90

reconheceu em média 96,5% das células na terceira passagem, reforçando seu fenótipo como CTM<sup>ta</sup>, uma vez, que suas características na cultura corroboram com o desempenho na citometria de fluxo. (Figura 19)

Animal	Média de Eventos (Média do N° de células)	Média da % de células no <i>gate</i> do controle negativo	Média da % de células no <i>gate</i> M1 (positividade)-CD90
Coelho 1	8.049	0,35	97
Coelho 2	10.758	0,08	96
Coelho 3	11.235	0,05	98
Coelho 4	10.364	0,18	95
Média	10.101	0,16	96,5

**Figura 19.** Análise por CF (CTM<sup>ta</sup>), terceira passagem, anti-CD90: média de eventos analisados; média da porcentagem de células do controle negativo e média da porcentagem dos testes positivos com anti-CD90.

Com relação aos anticorpos monoclonais produzidos *home made*, ambos apresentaram baixa sensibilidade, sendo que o anticorpo MSC1-160A69 (variou de 7,71-51,53% - com média de 28,29%) apresentou maior expressão nas células testadas quando comparada com o MSC1-160A30 (variou de 7,3-51,53% - com média de 24,21%), porém ambos não se caracterizaram como perfil superponível ao anti-CD90 comercial, o que pode ser justificado pela origem das CTMs para estes protocolos, que foram de medula óssea e não de tecido adiposo, portanto os mesmos não foram bons marcadores para CTM<sup>ta</sup>, o que corrobora com achados preliminares (19, 68). Estes anticorpos deverão ser testados em paralelo com outros anticorpos monoclonais disponíveis no mercado no sentido de se identificar precisamente sua especificidade (Figura 20).

	Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3	Coelho 4
Controle 1	0,35%	0,08%	0,05%	0,18%
Controle 2	0,50%	0,12%	0,07%	0,37%
Controle Secundário	1,29%	1,09%	1,90%	5,68%
Anti-CD90 rato	97,00%	96,00%	98,00%	95,00%
MSC1-160A69	7,71%	29,31%	24,63%	51,53%
MSC1-160A30	22,22%	7,30%	20,19%	47,15%

**Figura 20.** Desempenho comparativo em CF do anti-CD90 comercial com os AcMm anti-CTM de MO de coelho produzido *in house*.

Concomitante ao procedimento de expansão das CTM<sup>ta</sup>, expansão em cultura e caracterização por citometria de fluxo, formou-se um banco com 90 fragmentos de veias (jugulares e cavas) com 2cm, que foram utilizadas para os testes de descclularização e validação do *scaffold*. O procedimento foi se consolidando e mais amostras de veias foram obtidas de coelhos com eutanásia já marcada de diferentes outros alunos da pós graduação.

Independentemente do tratamento a que as veias foram expostas, elas adquiriram algumas características comuns: opacidade acentuada, alongamento em relação ao *status* depois da retirada do animal e maior fragilidade, além de se tornarem mais friáveis quando comparadas com a veia *in natura*. Estas características que os *scaffolds* adquiriram serão importantes para os testes futuros, quando se pretende implantar as VD tratadas no coelho como modelo *in vivo*. Os protocolos usando diferentes detergentes, em concentrações e com variação no tempo de exposição não determinaram diferenças significativas nessas características entre si, contrariamente aos observados em traquéia por Evaristo (2011) (68).

As análises histológicas com cortes corados por HE permitiram a comparação do padrão histológico após cada um dos tratamentos e da veia *in natura*. As observações foram realizadas com aumento de 400X. A descclularização com **Triton X-100** nas concentrações utilizadas e nas duas variações de tempo realizadas mostrou que não ocorreu suficiente destruição dos componentes celulares e, portanto, não se pode afirmar que este agente, nas concentrações e tempos testados, possa ser utilizado com a finalidade de promover a descclularização das veias para utilização como *scaffold*, com finalidade terapêutica (Figura 21).

Quando se aplicou o **DS**, foi observou-se melhor atuação do agente descelularizador dependente da concentração e do tempo de exposição. Na concentração de 1% no tempo de agitação de 1 hora, pode-se observar que ocorreu destruição dos componentes celulares, porém ainda mantendo alguns núcleos parcialmente corados. Na concentração de 1% no tempo de agitação de 2 horas e na concentração de 2% no tempo de agitação de 1 hora, pode-se observar uma completa remoção de todos os componentes celulares, restando apenas a matriz colágena que se manteve íntegra, portanto apresentando-se como bom protocolo de descelularização. Na concentração de 2% no tempo de agitação de 2 horas, pode-se observar uma completa remoção de todos os componentes celulares, porém a matriz colágena apresentou-se bastante desestruturada, o que não se caracteriza como um bom modelo de *scaffold*.

Características	[ ] e tempo de exposição em horas	Permanência de células/núcleos	Matriz
Detergentes			
Triton X - 100	[ ] 1% - 1 h	+++ /++++	Organizada
	[ ] 1% - 2 h	++ /+++	+ frouxa
	[ ] 2% - 1 h	++ /++	+ frouxa
	[ ] 2% - 2 h	+ /+	Desestruturada
Deoxicolato de Sódio (DS)	[ ] 1% - 1 h	+ /+	Organizada
	[ ] <b>1% - 2 h</b>	<b>0/0</b>	<b>Organizada</b>
	[ ] <b>2% - 1 h</b>	<b>0/0</b>	<b>Organizada</b>
	[ ] 2% - 2 h	0/0	Desestruturada
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	[ ] 0,1% - 1 h	+ /+	Organizada
	[ ] 1% - 1 h	+ /+	Organizada
	[ ] <b>1% - 2 h</b>	<b>0/0</b>	<b>Organizada</b>

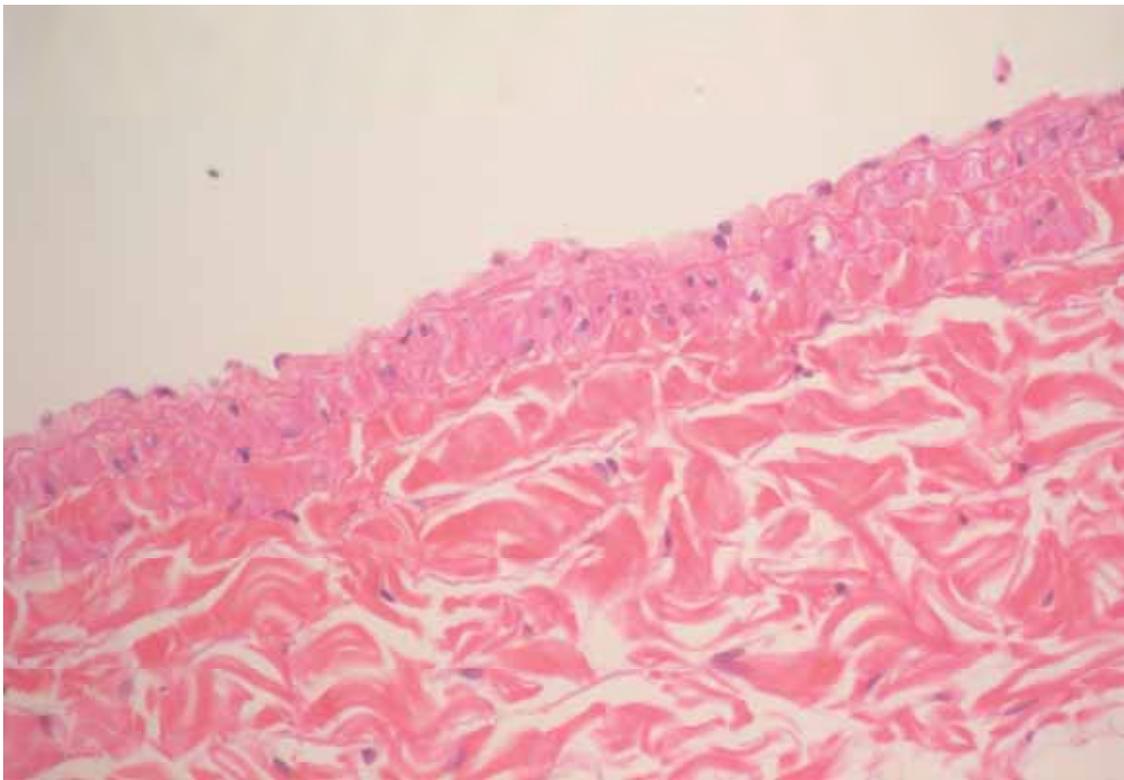
N=33 (10 amostras em cada protocolo)

**Figura 21.** Análise histológica das VD com: Triton X-100, DS e SDS em diferentes concentrações e tempos de exposição – quantificação da permanência das células, restos nucleares e padrão da matriz.

Quando se aplicou o **SDS**, observou-se melhor atuação do agente descelularizador dependente da concentração e do tempo de exposição. Na concentração de 0,1% e com tempo de agitação de 1 hora, pode-se observar que ocorreu destruição parcial dos componentes celulares, ainda mantendo alguns núcleos parcialmente corados. Na

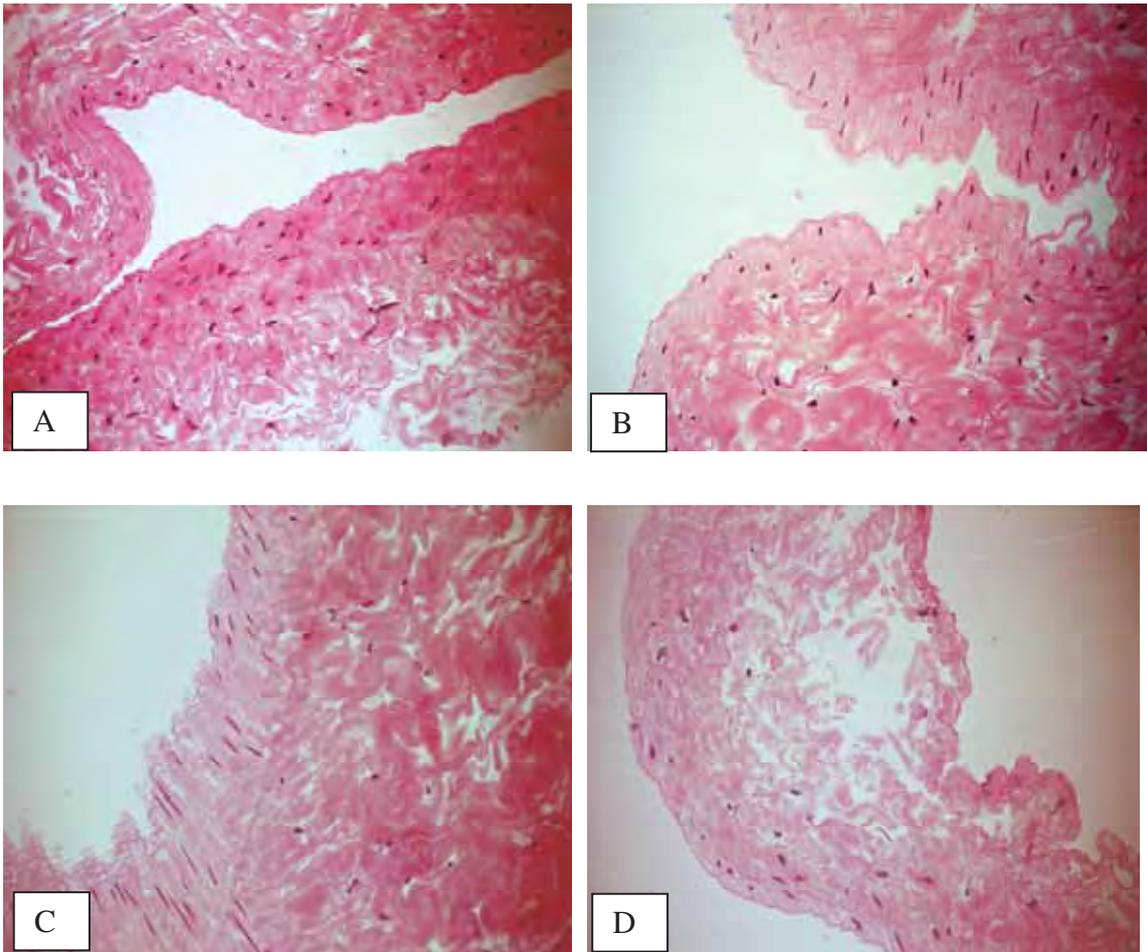
concentração de 1% no tempo de agitação de 1 hora, pode-se observar uma razoável remoção dos componentes celulares e a matriz colágena manteve íntegra, porém não foi considerado suficiente para se eleger esse protocolo de descelularização. Na concentração de 1% com tempo de agitação de 2 horas, pode-se observar uma completa remoção de todos os componentes celulares, porém com algum grau de desarranjo da matriz colágena da adventícia, o que não se caracterizou como problema relevante no momento da análise geral dos resultados, caracterizando-se como um bom modelo de *scaffold* (resultados apresentados esquematicamente na Figura 21).

As figuras 22,23, 24 e 25 correspondem a fotomicrografias da veia normal *in natura* (controle) e das veias tratadas com triton X-100, DS e SDS respectivamente.



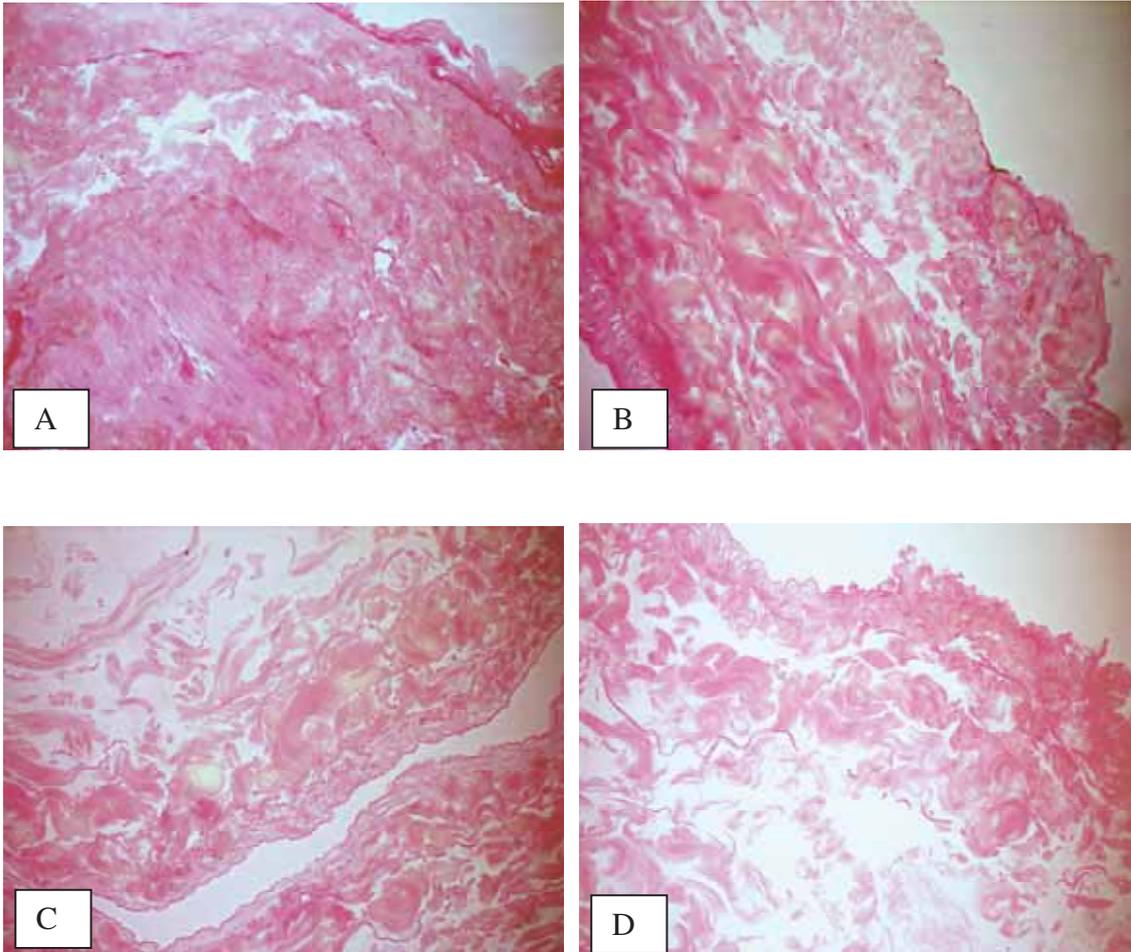
**Figura 22.** Corte histológico corado com HE - veia *in natura* (controle). Aumento 400X.

Foto: arquivo pessoal, 2011



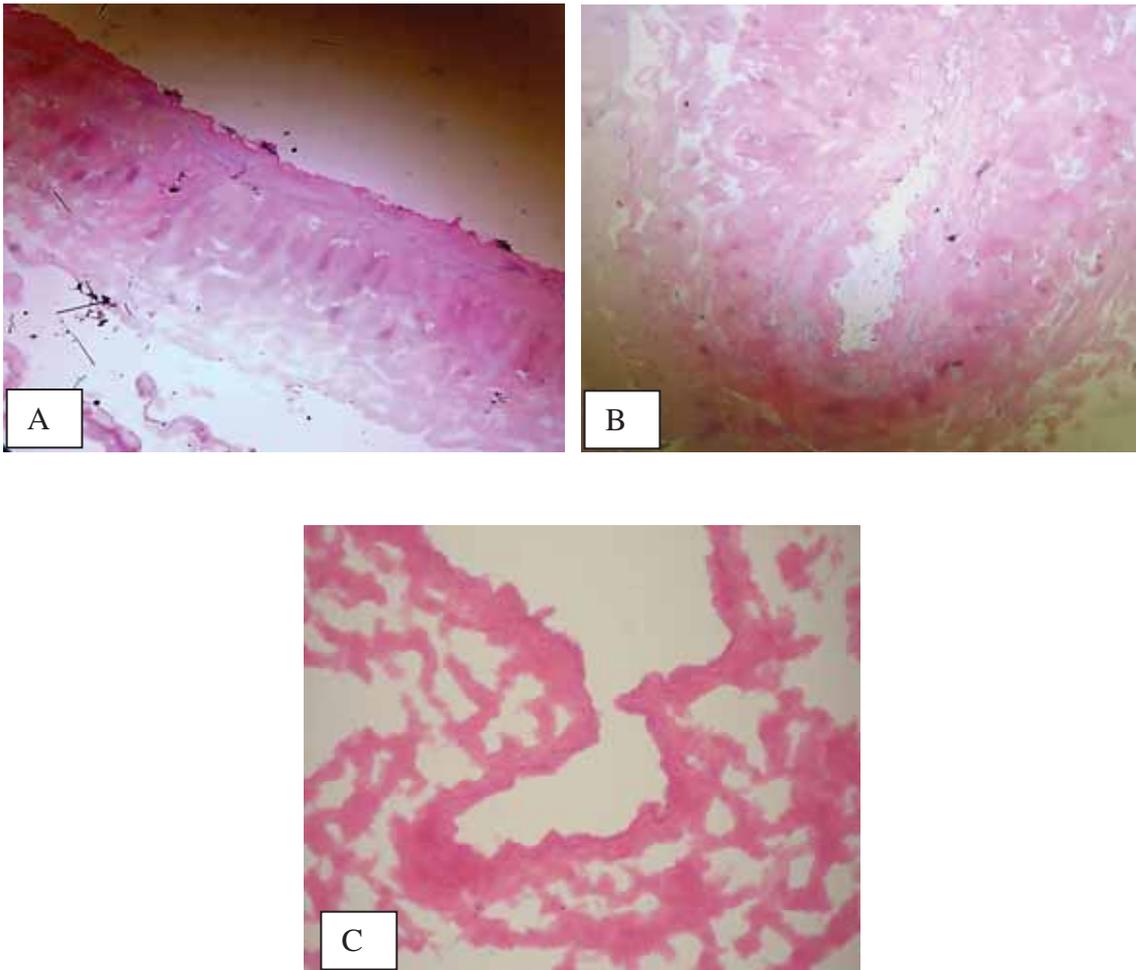
**Figura 23.** Corte histológico corado com HE de VD. Triton X-100. A= Triton X-100 1% 1h; B = Triton X-100 1% 2h; C= Triton X-100 2% 1h e D= Triton X-100 2% 2h. Aumento 400X.

*Foto: arquivo pessoal, 2011*



**Figura 24.** Corte histológico corado com HE de VD com DS. A= DS 1% 1h; B= DS 1% 2h; C= DS 2% 1h e D= DS 2% 2h. Aumento 400X.

*Foto: arquivo pessoal, 2011*



**Figura 25.** Corte histológico corado com HE de VD com SDS. A= SDS 0,1% 1h; B= SDS 1% 1h; C= DS 2% 1h e D= SDS 1% 2h. Aumento 400X.

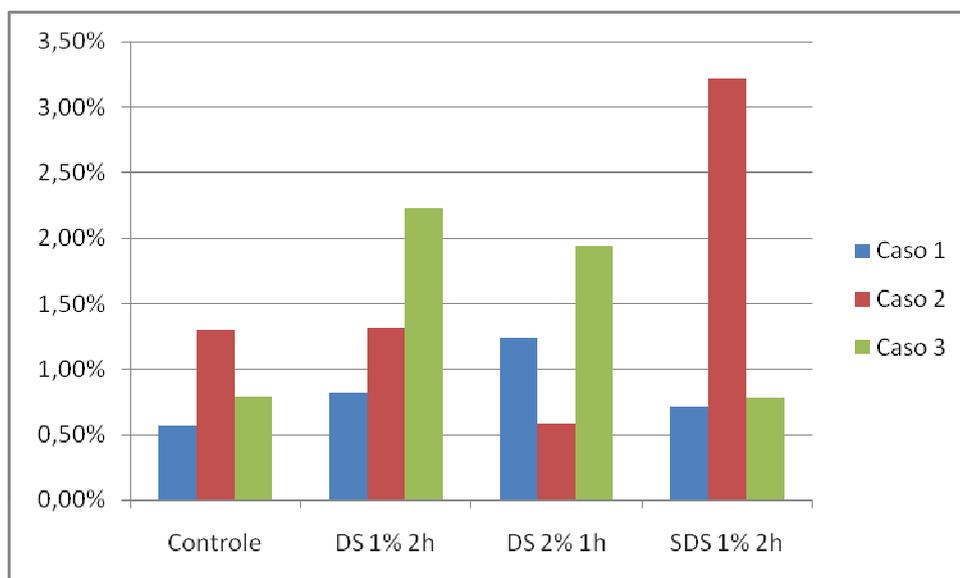
Diante dos resultados obtidos constatou-se, que os protocolos de descelularização validados entre os métodos testados, sob o ponto de vista histológico, foram: DS 1% sob agitação por 2 horas e a 2% sob agitação por 1 hora e SDS 1% sob agitação por 2 horas.

Com intuito de estabelecer a supremacia de um destes protocolos, os testes de toxicidade residual foram realizados, para excluir essa possibilidade. Foram testados os 3 protocolos elencados anteriormente. Para tal, as VD elencadas foram colocadas em poços de cultura não aderentes em conjunto com uma alíquota de  $1 \times 10^6$  CTM<sup>ta</sup>. O *scaffold* foi previamente lavado por um período de 48h em meio de cultura DMEN F12, para em seguida receber as células. Após cultivo de 48 horas, foi realizado o teste de viabilidade com azul de trípano a 0,4% e citometria de fluxo com anti-Caspase-3. Os resultados da viabilidade evidenciam que o tratamento com DS 2% por 1 hora foi o que menos interferiu na viabilidade celular, seguido do SDS 1%, 2 h. (Figura 26).

	Controle (%)	DS 1% 2h (%)	DS 2% 1h (%)	SDS 1% 2h (%)
<i>Scaffold 1</i>	67,5%	88,8%	<b>82,8%</b>	<b>85,7%</b>
<i>Scaffold 2</i>	90,7%	66,6%	<b>88,8%</b>	<b>83,3%</b>
<i>Scaffold 3</i>	66,6%	75,6%	<b>92,8%</b>	<b>82,3%</b>
<b>Média</b>	74,9%	77%	88,1%	83,7%

**Figura 26.** Viabilidade celular com azul de tripano a 0,4% nas CTM<sup>la</sup> cultivadas na presença dos *scaffolds* elencados.

No teste de toxicidade mediado pela anti-Caspase-3, evidenciou-se que os resultados mais homogêneos correspondem ao protocolo utilizando DS a 2% durante 1 hora, sendo este resultado concordante com aquele obtido com a viabilidade em azul de tripano (Figura 27).



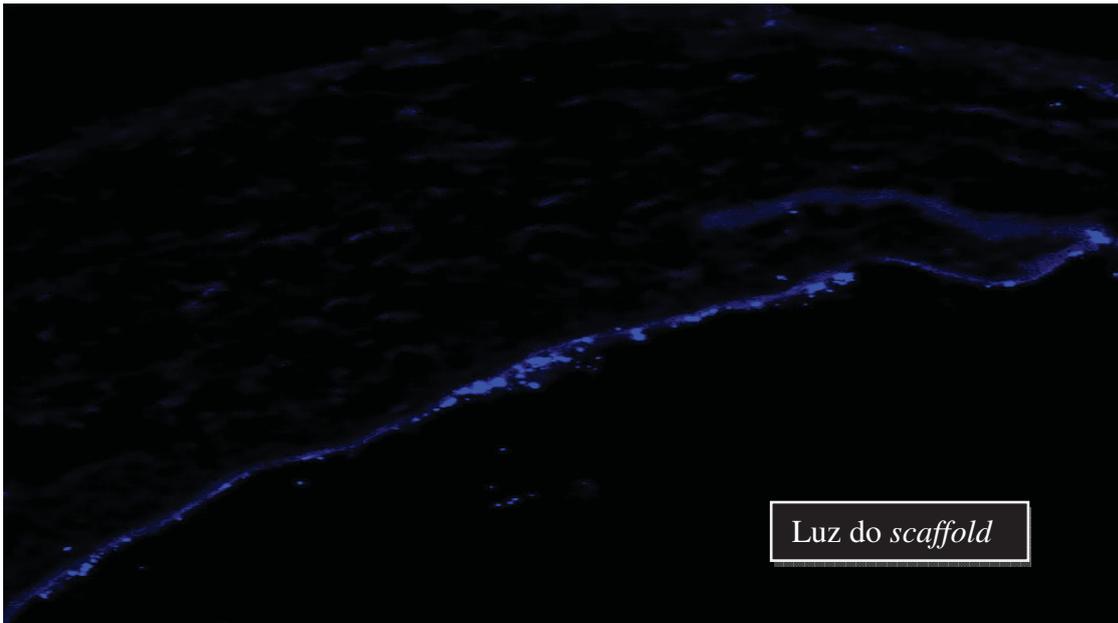
**Figura 27.** Análise de toxicidade mediada pela anti-Caspase-3 em CF.

As análises dos testes realizados por CF com anti-Caspase-3 evidenciaram que a via mitocondrial de morte das células não foi expressiva para interferir na escolha entre os três protocolos, uma vez que em sete das nove amostras analisadas, o percentual de morte foi menor de 2%. Apenas em duas amostras, uma tratada com DS e outra com SDS, houve índice de apoptose mais elevado. Para a VD com DS, o maior índice de apoptose foi de 2,3% no protocolo utilizando DS a 1% durante 2h. Para uma das três amostras tratadas com SDS, o índice de apoptose mais elevado foi de 3,3%. Tais resultados podem decorrer da dificuldade em se remover completamente os resíduos desses agentes químicos e portanto muita atenção deve ser dada para o processo de

lavagem dos materiais. Tendo em vista que os trabalhos em cultura são longos e com muitas intercorrências, a montagem do *scaffold* 3D com as CTM<sup>ta</sup> foi feito em paralelo, sem ainda se ter o resultado do índice de apoptose. Até o momento da montagem do modelo *ex vivo*, não eram conhecidos os resultados do teste de toxicidade para que se soubesse da supremacia de um protocolo sobre o outro. Dessa forma, elencou-se o SDS 1% em agitação por 2 horas para os testes em cultura, com base em trabalhos de literatura que usam este detergente. Levando-se em consideração que em uma das três amostras testadas, cujo *scaffold* foi descelularizado por SDS, o índice de apoptose foi maior, nos próximos experimentos, os modelos *ex vivo* deverão ser montados com as VD pelo protocolo DS.

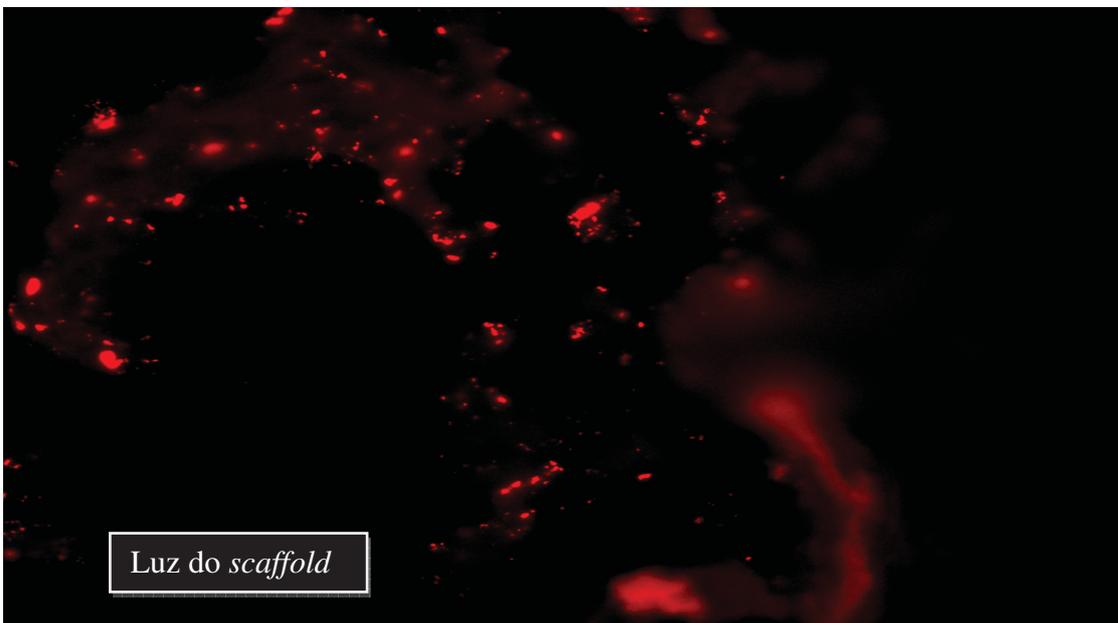
Para se comprovar que as células aderidas ao *scaffold* realmente partiram da cultura e não eram restos celulares da descelularização, foi elaborado o processo de adesão das células ao *scaffold* com auxílio de puramatrix®. As CTMs foram marcadas com nanocristais Qdot® - Qtracker® Cell labeling e procedida à aderência, conforme descrito nos materiais e métodos e análise da fluorescência.

Observou-se marcação do citoplasma das CTMs em análise microscópica de aumento 400X, onde foi possível identificar regiões de deposição em monocamada celular (Figura 28). Além de áreas com a formação de grumos na luz do *scaffold* contendo células fixadas no puramatrix® (Figura 29). Estas observações asseguram que a presença das células no *scaffold* advém da cultura.



**Figura 28.** Imunofluorescência das CTMs no *scaffold* (em azul).

*Foto: arquivo pessoal, 2011*

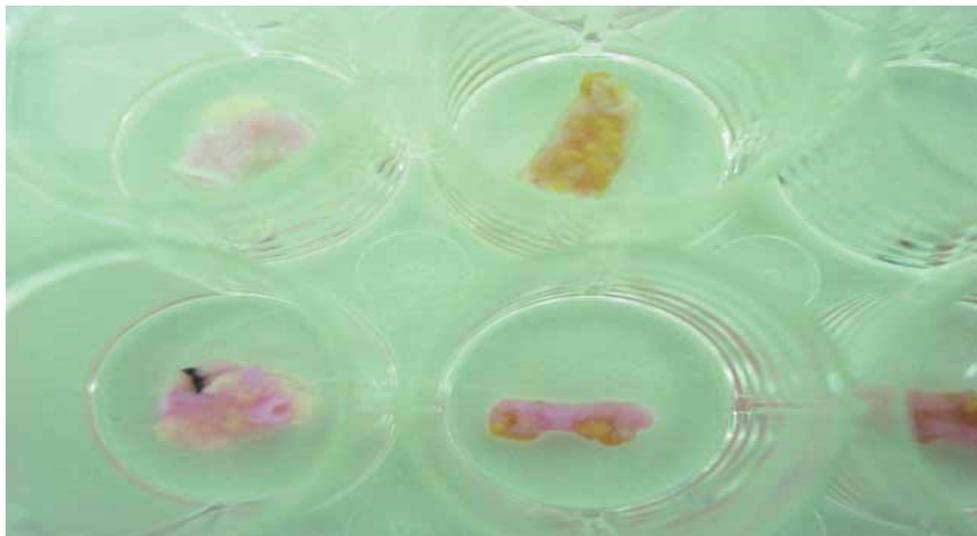


**Figura 29.** Imunofluorescência das CTMs no *scaffold* (em vermelho).

*Foto: arquivo pessoal, 2011*

Como várias das etapas deste trabalho foram realizadas concomitantemente, o resultado acima, ou seja, do sucesso da fixação das CTM<sup>ta</sup> com puramatrix foi obtido após a realização de dois experimentos envolvendo a construção do modelo de vasos *ex-vivo*. Portanto, os protocolos de montagem dos modelos e indução para a diferenciação celular não usaram puramatrix® e em novos experimentos esta técnica será melhor avaliada em cultura.

No **primeiro experimento**, as veias descelularizadas foram embebidas previamente com SFB por uma hora, com intuito de estimular uma maior aderência das CTMs à parede do *scaffold*. Porém, o que se obteve nesse experimento, foi uma predominância de diferenciação celular em tecido adiposo, o que ocorreu em grande quantidade. Isso pode ser visto macroscopicamente nos *scaffolds* em cultura no final do experimento (Figura 30 e 31).



**Figura 30.** Aspecto macroscópico das VD tratadas, embebidas em SFB e com CTM<sup>ta</sup> - 3 semanas de cultura.

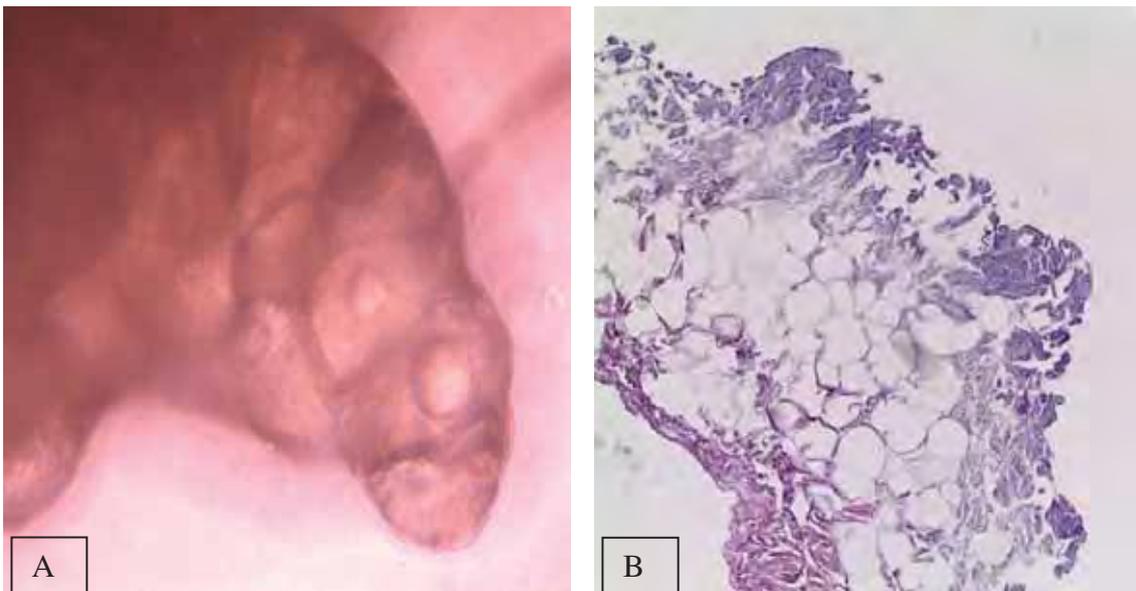
Foto: arquivo pessoal, 2011



**Figura 31.** Zoom no aspecto macroscópico das VD tratadas, embebidas em SFB e com CTM<sup>ta</sup> - 3 semanas de cultura.

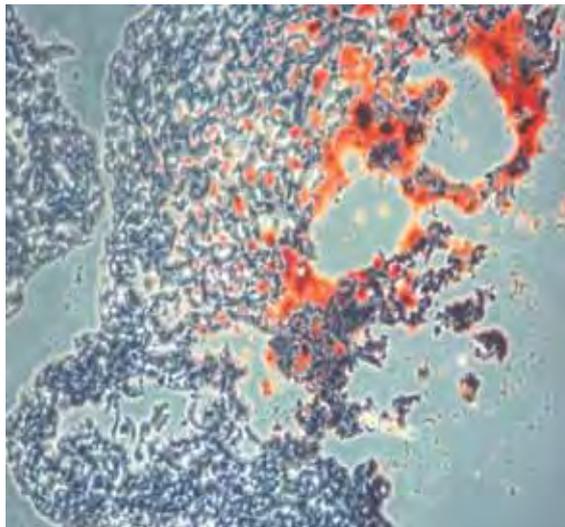
Foto: arquivo pessoal, 2011

A observação por microscopia invertida em contraste de fase, aumento 400X identificou as ilhas de tecido adiposo provavelmente induzido pelo embebimento das VD em SFB (Figura 32A). Apesar da característica macroscópica do tecido, foi procedida a análise histológica com coloração HE (Figura 32B) e coloração de *oil red* onde pode ser evidenciada a deposição lipídica em vermelho (Figura 33).



**Figura 32** - Visualização TA sobre VD tratada. A= Microscopia invertida em contraste de fase, sem coloração, aumento 400X. B= Corte histológico corado com HE, aumento 100 X.

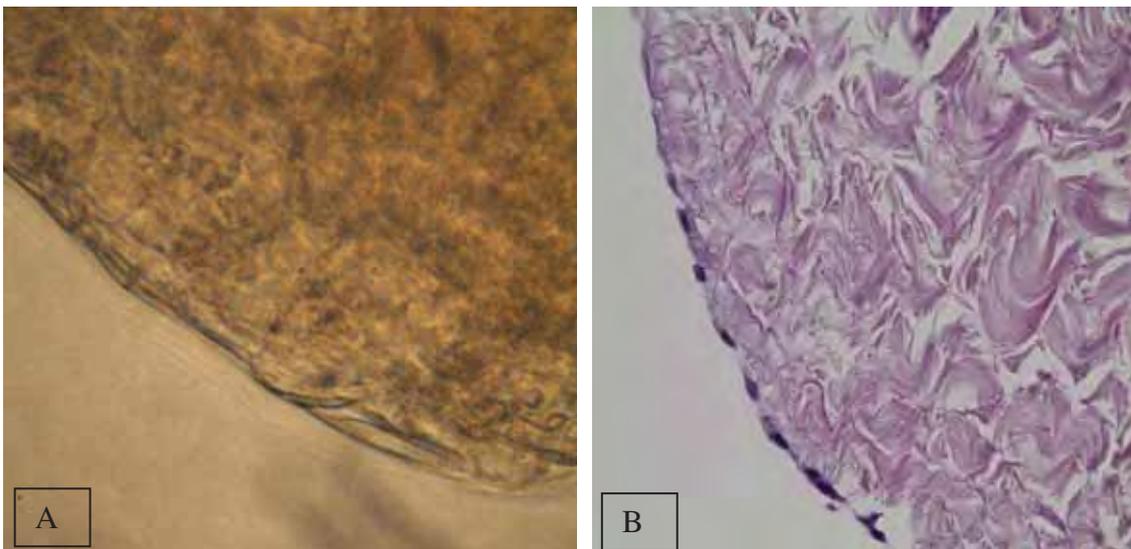
Foto: arquivo pessoal, 2011



**Figura 33.** Corte histológico da VD tratada, diferenciada em TA, coloração com *oil red*, aumento 100X.

Foto: arquivo pessoal, 2011

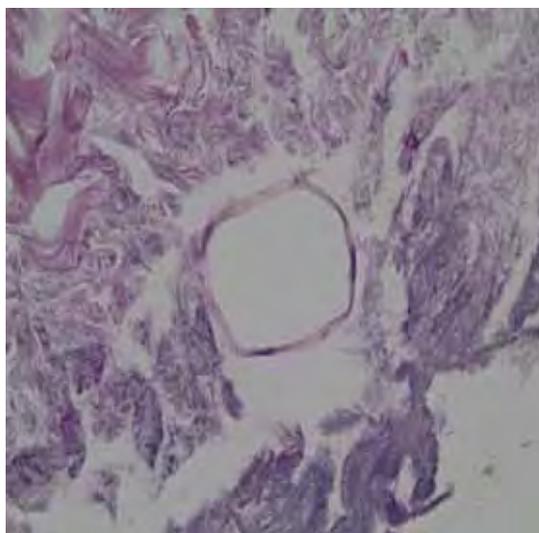
Apesar da identificação de tecido gorduroso crescendo sobre determinada área do *scaffold*, observou-se também, em outras regiões do mesmo *scaffold*, células alongadas em monocamada que morfologicamente sugeriram tecido endotelial, quando analisados em microscopia invertida com contraste de fase. Na análise histológica dos cortes corados com HE, confirmou-se a hipótese do crescimento de CE em monocamada em determinadas áreas do *scaffold* (Figura 34 A e B).



**Figura 34 –** Monocamada celular sobre VD - CE. A= observação de CE por microscopia invertida em contraste de fase, aumento 400X. B= corte histológico corado por HE, evidenciando CE, aumento 200X.

Foto: arquivo pessoal, 2011

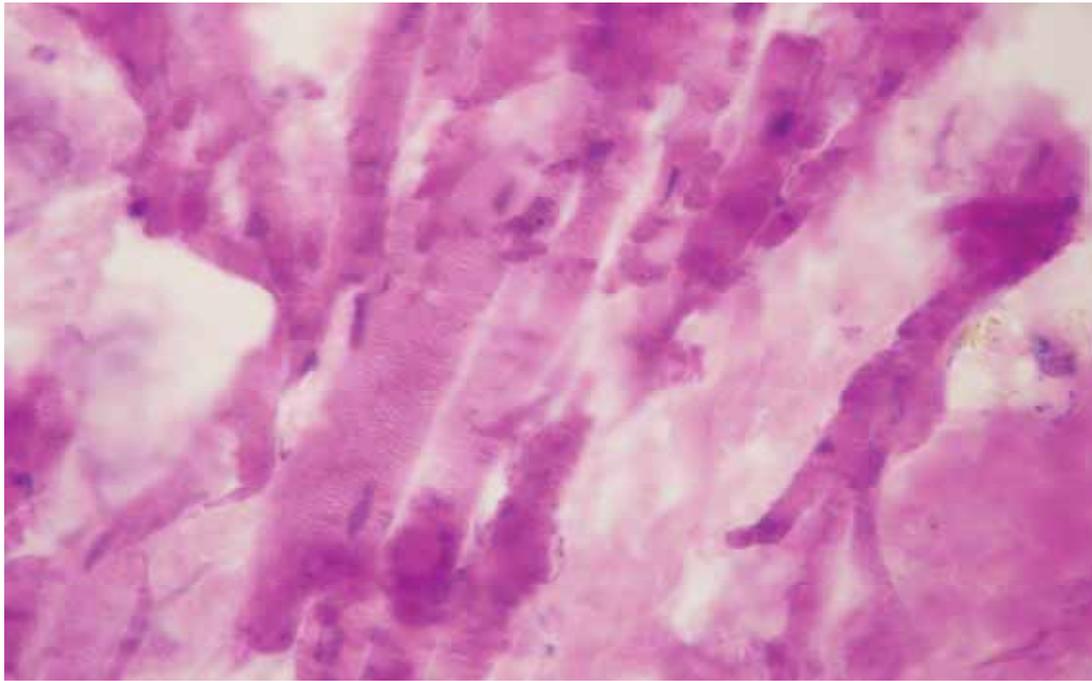
A hipótese de formação de células endoteliais foi reforçada pela identificação na microscopia invertida com contraste de fase e posteriormente, nos cortes histológicos corados em HE, de estruturas capilares constituídas por 3-5 células alongadas formando estrutura circunferencial contendo luz (Figura 35).



**Figura 35.** Capilar neo formado constituído por 4 células endoteliais, corte histológico corado em HE, aumento de 400X.

Foto: arquivo pessoal, 2011

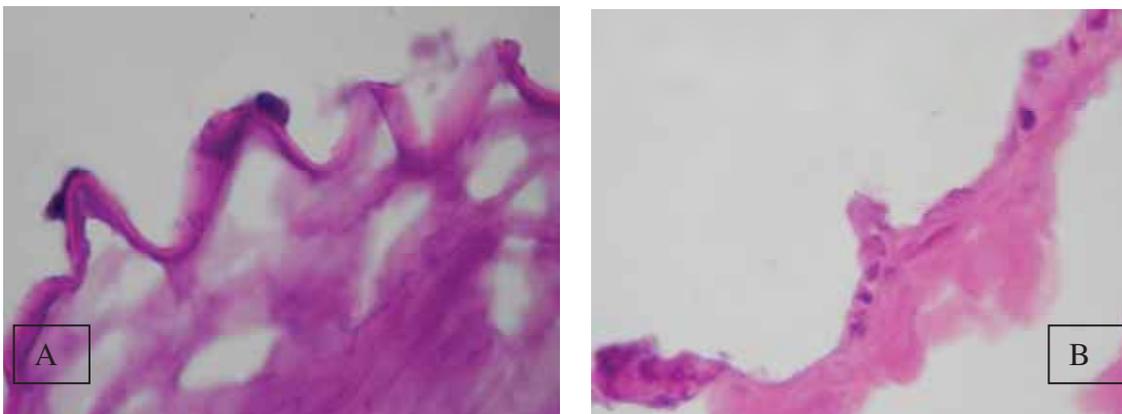
Diante da obtenção de resultados diferentes ao que se pretendia, o **segundo experimento** foi iniciado, desta vez, sem o prévio embebedimento das VD em SFB e as células foram aplicadas na luz do *scaffold* com auxílio de micropipeta. Porém, esta modificação levou a um fator complicador na análise dos resultados, visto que algumas amostras colocadas em cultura não apresentaram crescimento celular e, portanto não se obteve diferença em relação ao controle. Em metade das 16 amostras onde se esperava a adesão celular, macroscopicamente não se encontrou qualquer evidência de crescimento celular, o que se confirmou com a análise histológica. Macroscopicamente, neste experimento não se observou o desenvolvimento de TA. Em todas as análises realizadas, não foi possível evidenciar o crescimento celular na parede externa do *scaffold*. Nas amostras que apresentaram crescimento celular (n=8), encontrou-se em apenas uma amostra o crescimento de células que entremeavam a matriz colágena, que apresentava como característica presença de estrias, núcleo central e discos intercalares, o que se caracterizou como músculo cardíaco (Figura 36). Este fato foi isolado e não foi merecedor de análises suplementares, visto que este não era o objetivo deste estudo. Os sete outros experimentos (VD + CTM<sup>ta</sup>) tiveram diferenciação confirmada em endotélio.



**Figura 36.** Corte histológico corado em HE. Músculo cardíaco desenvolvido em cultura sobre o *scaffold* de VD, aumento 1000X.

Foto: arquivo pessoal, 2011

Nos outros 7 segmentos de VD cultivados em que se obteve crescimento celular, houve a identificação da presença de células endoteliais em monocamada na face interna da luz do *scaffold*, em quantidade variável, porém não foi possível analisar quantitativamente as amostras. Todas as amostras foram submetidas à análise histológica criteriosa por revisor externo, do Departamento de Patologia da FMB, comparando-se os cortes corados em HE dos segmentos tratados com o padrão de veias *in natura* (Figura 37 A e B).



**Figura 37.** Cortes histológicos corados com HE. Aumento 1000X. A= veia controle, *in natura*. B= VD com crescimento de endotélio.

Foto: arquivo pessoal, 2011

Os cortes foram também analisados por imunohistoquímica com anticorpos *anti-fascin* e com os dois anticorpos produzidos *home made* (Figura 38 A e B). O anticorpo *anti-fascin* marca células de origem mesodérmica, endotélio e sinusóides esplênicos. Foi observado que as células da luz do *scaffold* tratado foram impregnadas por estes anticorpos e no segmento controle isso não ocorreu. Dos anticorpos testados, foi mais evidente a marcação com anti-fascin e razoavelmente evidente a marcação com os anticorpos *home made*. Esses achados reforçam a idéia de que as células produzidas realmente apresentam fenótipo endotelial. Nesse momento do estudo, não foi possível encontrar marcadores mais específicos disponíveis comercialmente para a espécie em estudo, o que foi fator limitante para o pequeno número de produtos testados.

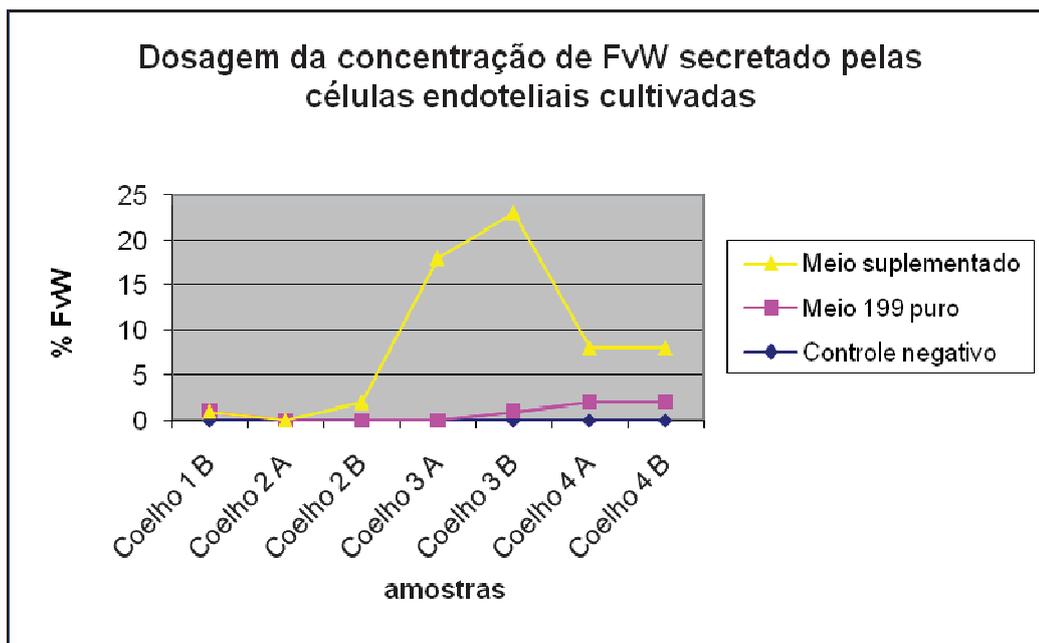


**Figura 38** – Cortes histológicos corados com IHQ. Aumento 1000X. A= veia controle negativo,descelularizada. B= VD com crescimento de endotélio com reação positiva com anti-fascin.

Foto: arquivo pessoal, 2011

Além das análises histológicas e da IHQ, foram coletados os sobrenadantes de cultura das células sobre o *scaffold* para a dosagem de FvW, como forma de comprovação funcional do endotélio produzido. A técnica utilizada foi ELISA, com kit disponível no mercado. O modelo apresentado no segundo experimento foi constituído em duplicata, porém devido a intercorrências técnicas, não foi possível analisar o sobrenadante de cultura da amostra do coelho 1A. O FvW foi positivo em 4 amostras das 8 testadas, quando a cultura foi realizada em presença de MC 199, com presença de 1% do FvW para duas das amostras e 2% para outras duas. Nas amostras que receberam a suplementação com hormônios derivados de plaquetas, o resultado foi mais expressivo: presença de FvW em 5 das 7 amostras testadas, com nível mínimo de 2%, e máximo de 22%. Tais resultados sugerem que as CE provenientes da cultura apresentam algum grau

de funcionalidade, sendo mais relevantemente positiva nas amostras que receberam suplementação com hormônios derivados de plaquetas, conforme se pretendia demonstrar (Figura 39). Porém, como se trata de cultura celular, intercorrências prejudicam as análises estatísticas, requerendo novas repetições para sustentar metodologicamente essa informação.



**Figura 39.** Esquema representativo da dosagem de FvW em cultura.

Não houve diferença na quantidade e no aspecto das CE das VD submetidas aos dois diferentes tratamentos no segundo experimento. Porém, a diferença significativa foi estabelecida do ponto de vista funcional quanto à secreção de FvW, que apresentou-se em maior quantidade nos modelos suplementados com hormônios de crescimento derivados de plaquetas, o que poderá ter relação com a durabilidade do enxerto quando aplicado no futuro.

## *Conclusões*

## V – Conclusões

1. Foram validadas dois agentes químicos para a descelularização de veias de coelho, dentre três testadas, sendo estes os protocolos utilizando deoxicolato de sódio (DS) na concentração de 1% em agitação durante 2 horas ou 2% por 1h seguido do que utiliza dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% por 2 horas.
2. A análise de toxicidade utilizando teste de viabilidade e índice de apoptose por anti-Caspase3 em CF, apontam os protocolos de descelularização por DS como sendo ligeiramente superiores aos preparados com SDS.
3. Os protocolos de obtenção, digestão e amplificação das CTM<sup>ta</sup> foram delineados com reprodutibilidade. As CTM<sup>ta</sup> foram caracterizadas fenotipicamente pelo método de citometria de fluxo com marcador anti-CD90 apresentando média de 96,5% de positividade para as células de terceira passagem em cultura.
4. Foi possível comprovar a adesão das CTM<sup>ta</sup> na luz do *scaffold* com a utilização de puramatrix e nanocristais Qdot®. Estes marcaram as CTMs na parede do *scaffold* e foram observados no teste de imunofluorescência.
5. O protocolo de diferenciação celular das CTM<sup>ta</sup> sobre *scaffold* embebido em SFB não foi validado. Este protocolo induziu a uma grande formação de TA na parede externa da VD, o que não era do interesse deste estudo. Neste experimento a formação de endotélio foi ocasional e pouco expressiva. O protocolo do segundo experimento, que utilizou suplementação em maior quantidade de hormônios derivados de plaquetas sem a adição de SFB e com o direcionamento prévio das CTM<sup>ta</sup> para a luz do *scaffold*, apresentaram resultados mais satisfatórios na indução de formação de tecido endotelial, porém não foi possível realizar a quantificação do número de células quando se comparado com a veia *in natura*.
6. Foi possível identificar por análises histológicas coradas com HE e por método de IHQ com anti-fascin a presença de CE advindas da cultura celular.
7. Foi possível estabelecer do ponto de vista funcional uma maior secreção de FvW nas culturas que foram suplementadas com hormônios de crescimento derivados de plaquetas.

*Perspectivas*

## VI – Perspectivas

- a) Comparar o nosso método de produção de endotélio em *scaffold* com os métodos que utilizam fatores de crescimento (FC) comerciais;
- b) Utilizar pura matrix como veículo de pré-adesão das células no *scaffold*;
- c) Produzir músculo liso a partir de CTM<sup>ta</sup> com os FC comerciais;
- d) Elencar o método de produção de endotélio mais eficaz e aplicar conjuntamente às células endoteliais e às musculares lisas no *scaffold*;
- e) Comprovar por Imunohistoquímica a obtenção do *scaffold* repovoado com os dois tipos de células;
- f) Realizar testes “cometa” para comprovar a ausência de dano no DNA das células induzidas a diferenciar-se;
- g) Realizar testes com o neovaso em fluxo pulsátil *in vitro*;
- h) Implantar o neovaso em coelho e observar seu comportamento hemodinâmico e fisiológico *in vivo*;
- i) Reproduzir todas as técnicas com células humanas *in vitro*;
- j) Pesquisa clínica com neovasos.

## *Referência Bibliográfica*

## VII – Referências Bibliográficas

1. Dormandy J, Mahir M, Ascady G, Balsano F, De Leeuw P, Blombery P, et al. Fate of the patient with chronic leg ischaemia. A review article. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1989 Jan-Feb;30(1):50-7.
2. Yoshida WB. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros *J Vasc Br*. 2005;4(4):316-8.
3. Reis PEO. Bone marrow stem cells and their role in angiogenesis. *J Vasc Br*. 2005;4(4):366-70.
4. Maffei FHA. *Doenças Vasculares Periféricas*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
5. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol*. 2007 Jun;26(2):81-157.
6. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med*. 2007 Sep-Oct;11(5):945-57.
7. Moore KL. *Embriologia Básica*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
9. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41.
10. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L, Auger FA. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 1998 Jan;12(1):47-56.
11. Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol*. 2006 May;168(5):1697-709.
12. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, et al. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci*. 2006 Dec 1;119(Pt 23):4994-5005.
13. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, et al. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation*. 2003 Apr 29;107(16):2078-81.
14. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986 Jan 24;231(4736):397-400.
15. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, et al. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1823-8.
16. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.
17. Bittencourt R. *Cultura de condrócitos para uso terapêutico: reconstituição de cartilagem Tese*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2008.
18. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol Biol*. 2011;698:3-8.

19. Moroz A. *Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese Tese. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2009.*
20. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells. 2007 Nov;25(11):2739-49.*
21. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M, et al. *Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. J Dermatol Sci. 2007 Oct;48(1):43-52.*
22. Gartner LP. *Cartilagem e osso. 3th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.*
23. Baksh D, Song L, Tuan RS. *Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.*
24. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. *Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol. 2004 May;32(5):414-25.*
25. Vigorito AC. *Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. Rev Bras Hematol Hemoter. 2009;31(4):280-4.*
26. Sawada R, Ito T, Tsuchiya T. *[Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells]. Yakugaku Zasshi. 2007 May;127(5):851-6.*
27. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. *Bone-marrow-derived stem cells--our key to longevity? J Appl Genet. 2007;48(4):307-19.*
28. Freshney RI. *Differentiation In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4 th ed. New York: Wiley-liss; 2000. p. 259-67.*
29. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.*
30. Boulanger CM, Vanhoutte PM. *G proteins and endothelium-dependent relaxations. J Vasc Res. 1997 May-Jun;34(3):175-85.*
31. Cordellini S, Vassiliev VS. *Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. Gen Pharmacol. 1998 Jan;30(1):79-83.*
32. 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.*
33. van Hinsbergh VW. *Endothelium-role in regulation of coagulation and inflammation. Semin Immunopathol. 2011 Aug 4.*
34. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. *Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature. 1990 Mar 15;344(6263):254-7.*
35. Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. *Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. Arterioscler Thromb. 1992 Sep;12(9):1099-109.*
36. Parums DV, Brown DL, Mitchinson MJ. *Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. Arch Pathol Lab Med. 1990 Apr;114(4):383-7.*
37. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. *Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. Lancet. 1992 Apr 11;339(8798):883-7.*

38. Griffith RL, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med.* 1988 Sep 1;168(3):1041-59.
39. Klimov AN, Denisenko AD, Popov AV, Nagornev VA, Pleskov VM, Vinogradov AG, et al. Lipoprotein-antibody immune complexes. Their catabolism and role in foam cell formation. *Atherosclerosis.* 1985 Dec;58(1-3):1-15.
40. Cotran RS. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional.* 7 th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
41. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33 Suppl 1:S1-75.
42. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):146-53.
43. DiMuzio P, Fischer L, McIlhenny S, DiMatteo C, Golesorhki N, Grabo D, et al. Development of a tissue-engineered bypass graft seeded with stem cells. *Vascular.* 2006 Nov-Dec;14(6):338-42.
44. Schmedlen RH, Elbjeirami WM, Gobin AS, West JL. Tissue engineered small-diameter vascular grafts. *Clin Plast Surg.* 2003 Oct;30(4):507-17.
45. Pawlowski KJ, Rittgers SE, Schmidt SP, Bowlin GL. Endothelial cell seeding of polymeric vascular grafts. *Front Biosci.* 2004 May 1;9:1412-21.
46. Leon L, Greisler HP. Vascular grafts. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003 Nov;1(4):581-94.
47. Jianguo W, Tianhang L, Hong Z, Zhengmao L, Jianwei B, Xuchao X, et al. Optimization of culture conditions for endothelial progenitor cells from porcine bone marrow in vitro. *Cell Prolif.* 2010 Aug;43(4):418-26.
48. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.
49. Valarmathi MT, Davis JM, Yost MJ, Goodwin RL, Potts JD. A three-dimensional model of vasculogenesis. *Biomaterials.* 2009 Feb;30(6):1098-112.
50. Koutsi A, Papapanagiotou A, Papavassiliou AG. Thrombomodulin: from haemostasis to inflammation and tumourigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(9):1669-73.
51. Xu R, Xia WJ, Rong X, Ye X, Shao Y, Wang M, et al. [Human platelet lysates promotes the proliferation of mesenchymal stem cells in vitro]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2011 Aug;31(8):1396-400.
52. Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2011 Jun 1;35(6):639-43.
53. Whiteheart SW. Platelet granules: surprise packages. *Blood.* 2011 Aug 4;118(5):1190-1.
54. Feng W, Madajka M, Kerr BA, Mahabeleshwar GH, Whiteheart SW, Byzova TV. A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing. *Blood.* 2011 Apr 7;117(14):3893-902.
55. Kamykowski J, Carlton P, Sehgal S, Storrie B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet {alpha}-granules. *Blood.* 2011 Aug 4;118(5):1370-3.

56. Sufen G, Xianghong Y, Yongxia C, Qian P. bFGF and PDGF-BB have a synergistic effect on the proliferation, migration and VEGF release of endothelial progenitor cells. *Cell Biol Int*. 2011 May 1;35(5):545-51.
57. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83.
58. Moura R, Maffei FH, Mattar L, Fabris VE, Cury P, Lastoria S, et al. Glutaraldehyde-treated homologous vein graft as a vein substitute: experimental study in rabbits. *Int Angiol*. 2009 Apr;28(2):113-9.
59. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials*. 2009 Aug;30(22):3749-56.
60. Quitzan J. Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos. *Botucatu: Universidade Estadual Paulista*; 2009.
61. Lopes S. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2009;24(1):15-22.
62. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010 May;31(13):3590-5.
63. Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(6):659-66.
64. Tamura N, Nakamura T, Terai H, Iwakura A, Nomura S, Shimizu Y, et al. A new acellular vascular prosthesis as a scaffold for host tissue regeneration. *Int J Artif Organs*. 2003 Sep;26(9):783-92.
65. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000 Nov;21(22):2215-31.
66. Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A*. 2003 Dec 1;67(3):834-7.
67. Yang D, Guo T, Nie C, Morris SF. Tissue-engineered blood vessel graft produced by self-derived cells and allogenic acellular matrix: a functional performance and histologic study. *Ann Plast Surg*. 2009 Mar;62(3):297-303.
68. Evaristo TC. Modelo experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos. *Botucatu: Universidade Estadual Paulista*; 2011.
69. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
70. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):347-54.
71. Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(10):779-87.
72. Ramos CA, Asgari Z, Liu E, Yvon E, Heslop HE, Rooney CM, et al. An inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of mesenchymal stromal cell therapies. *Stem Cells*. 2010 Jun;28(6):1107-15.
73. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Jul;200(1):1-18.
74. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*. 1998 Mar;3(2):115-21.

75. Phinney DG. *Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem Suppl.* 2002;38:7-12.