



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIAS INTEGRADAS - InteLab**

**GUILHERME COLLA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM REATOR BIOLÓGICO  
TECIDUAL MUSCULAR A PARTIR DE VASOS DE CELULOSE  
BACTERIANA**

**FLORIANÓPOLIS  
2014**



Guilherme Colla

**DESENVOLVIMENTO DE UM REATOR BIOLÓGICO  
TECIDUAL MUSCULAR A PARTIR DE VASOS DE CELULOSE  
BACTERIANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques  
Porto

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Colla, Guilherme

Desenvolvimento de um Reator Biológico Tecidual Muscular a Partir de Vasos de Celulose Bacteriana / Guilherme Colla / orientador, Luismar Marques Porto – Florianópolis, SC, 2014.

82 p

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Celulose bacteriana. 3. Vasos sanguíneos artificiais. 4. Células musculares lisas de aorta humana. 5. Reator biológico tecidual. I. Porto, Luismar Marques. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**Desenvolvimento de um Reator Biológico Tecidual Muscular a Partir de Vasos de Celulose Bacteriana**

por

**Guilherme Colla**

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**orientador**

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
**coordenador**

**Banca Examinadora:**

---

Dr.<sup>a</sup>. Andrea de Lima Pimenta

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Giannini Pasiznick Apati

---

Dr.<sup>a</sup>. Ayumi Aurea Miyakawa

**Florianópolis, 25 de março de 2014.**



Dedico este trabalho aos meus pais e a meu irmão, pois sem eles nada disso seria possível.



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sempre me guiou para que eu seguisse os caminhos certos.

Minha profunda gratidão aos meus pais e a meu irmão, que sempre acreditaram em mim, por todos seus esforços para que o meu sonho pudesse se concretizar.

Em especial, ao Professor Luismar Marques Porto pela orientação, ensinamentos e amizade.

À Dr<sup>a</sup> Andréa de Lima Pimenta, pela amizade e pelas contribuições na conclusão da dissertação.

Ao Professor Carlos Roberto Rambo, pela permissão da realização dos ensaios à tração.

A todo o grupo do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab): Fernanda Berti, Armando, Karina, Julia, Camila Paes, Charles, Drielle, Ericka, Joanna, Lya, Samara, Isla, Afonso, Alencar, Fernanda Rotunno, Tuane, Jéssica, João, Beatriz, Camila Schroeder, Isadora, José Octávio, Lígia, Manuela, Evandro, Raul e Elaine, pelo companheirismo.

Aos inúmeros amigos que participaram nesta etapa da minha vida, principalmente à Ana Paula Ruani, Rafaela Iora Stock, Henrique Moresco, Francielly R. Cesconetto, Edson R. Santana, Mylena Carrijo.

A todos que de maneira direta ou indireta, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

À Eliana de M. Oliveira e Américo, do LCME, pelas análises de MEV.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.



“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)



## RESUMO

Doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortalidade em muitas partes do mundo, com a aterosclerose figurando como principal causa de oclusão coronariana, acidente vascular cerebral e aneurisma da aorta. A veia safena é a prótese vascular mais comumente usada para enxertos vasculares de pequeno calibre (< 6 mm). No entanto, 10% -40% dos pacientes não têm uma veia safena adequada para substituição de prótese devido à incompatibilidade de tamanho ou doença venosa. Abordagens de engenharia de tecidos estão sendo usadas para desenvolver métodos paliativos para essas patologias, como a construção de vasos sanguíneos artificiais. Este trabalho teve como objetivo a biossíntese de vasos artificiais a partir de celulose bacteriana (CB) produzida por *Gluconacetobacter hansenii*. Os vasos obtidos exibiram propriedades mecânicas comparáveis às dos vasos nativos e sua análise morfológica mostrou a presença de fases ligadas entre si, uma superfície densa e outra porosa, imitando a túnica íntima e média dos vasos nativos, respectivamente. A cultura *in vitro* das células musculares lisas de aorta humana no interior dos vasos de CB demonstrou a sua capacidade de suportar a colonização celular, tendo as células permanecido viáveis após 14 dias de cultura e apresentando uma morfologia alongada. Os vasos colonizados por sete dias seguiram para um reator de fluxo pulsante, onde permaneceram por mais sete dias em condição dinâmica. O vaso de celulose tecidual muscular apresentou a formação de uma monocamada confluyente e direcionada paralelamente à direção do fluxo contínuo. Em condições de cultura dinâmica as células apresentaram maior viabilidade e capacidade de proliferação do que no controle estático, indicando que o ambiente celular propiciado pelo reator de perfusão mimetizam aqueles encontrados no sistema vascular natural. Estes vasos de CB constituem uma plataforma para aplicações como biorreator tecidual, permitindo ensaios com células e outros agentes terapêuticos, através de interações com a monocamada de células confluentes que responde à estimulação dinâmica de fluxo pulsante.

**Palavras-chave:** celulose bacteriana, vasos artificiais, HASMCs, reator biológico tecidual.



## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the main causes of mortality in many parts of the world, with atherosclerosis figuring as the principal cause of coronary occlusion, stroke and aortic aneurysm. Saphenous vein is the most commonly used vascular prosthesis for small-caliber (< 6 mm) vascular grafts, however, 10%–40% of patients do not have a saphenous vein suitable for prosthetic replacement due to size mismatch or venous disease. Tissue engineering approaches are being used to develop palliative methods for these pathologies such as the construction of artificial blood vessels. Here we describe the biosynthesis of artificial blood vessels using *Gluconacetobacter hasenii*'s bacterial cellulose (BC) as scaffolding. The vessels obtained exhibited morphological and mechanical properties similar to native vessels and their morphology showed the presence of a dense and a porous phase, connected as a basis to mimic the intimal and medial layers of a blood vessel, respectively. *In vitro* cultures of human aortic smooth cells HASMCs in the presence of cellulose tubular scaffolds demonstrated their ability to support cell colonization, with cells remaining viable after 14 days of culture and showing an elongated morphology. Vessels colonized for seven days were placed in a pulsed flow reactor, where they remained for another seven days in dynamic condition. The cellulose muscle tissue vessel showed the formation of a confluent monolayer oriented parallel to direction in the continuous flow. In the interior of the vessels, cells in dynamic culture condition showed greater proliferation and cell viability compared to the static control. These BC vessels have proved to be a promising platform for the development of an *in vivo*-like bioreactor, allowing cell and drug assays on the confluent cell monolayer which responds to the dynamic stimulation of pulsatile flow.

**Keywords:** Bacterial cellulose, Blood vessels, HASMCs, tissue biological reactor.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Artérias e veias: composição tecidual (Fink, 2009).....	32
Figura 2: Representação da celulose, ligações de hidrogênio inter- e intramolecular. Linhas tracejadas mostram as ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto as linhas pontilhadas mostram as ligações de hidrogênio intramoleculares (Huang <i>et al.</i> , 2014).....	38
Figura 3: Perspectivas para as várias aplicações biomédicas de materiais baseados em celulose bacteriana. Adaptado de (Fu <i>et al.</i> , 2013). .....	40
Figura 4: Diagrama esquemático da pressão medida em vários locais ao longo do trajeto circulatório (Saltzman, 2009).....	45
Figura 5: Sistema biomimético empregado para aplicação de fluxo dinâmico e condicionamento de construções tubulares (Seliktar <i>et al.</i> , 2000). ....	47
Figura 6: Fluxograma geral das metodologias realizadas. ....	49
Figura 7: Aparato para produção dos vasos de celulose bacteriana. ....	51
Figura 8: Reações envolvidas na fluorescência do kit Live/Dead (Adaptado de: <a href="http://www.dojindo.com/store/p/190-Cellstain-Double-Staining-Kit.aspx">http://www.dojindo.com/store/p/190-Cellstain-Double-Staining-Kit.aspx</a> , acesso em: 14 de janeiro de 2014). ....	55
Figura 9: Sistema de fluxo pulsante , (a) sistema completo: câmara de cultura, tubulações e bomba peristáltica; (b) vista lateral da câmara de cultura, com tubulações e filtro; (c) vista superior da câmara de cultura com a tampa; (d) vista superior da câmara de cultura sem a tampa e (e) tampa da câmara de cultura. ....	56
Figura 10: Vasos de celulose bacteriana produzidos após 12 dias de cultivo estático da bactéria <i>G. hansenii</i> em meio base manitol após purificação. (a) vaso de celulose bacteriana purificado e (b) vaso de CB liofilizado.....	60
Figura 11: Membranas de celulose bacteriana obtidas após doze dias de cultivo estático da bactéria <i>G. hansenii</i> em meio de cultura à base de manitol. (a) Vista lateral da membrana de celulose bacteriana, formada por uma região superior densa (interior do vaso), seguida de uma região porosa que se estende até a superfície oposta (exterior do vaso). (b) e (c) mostram detalhes da região densa, enquanto (d) e (e) mostram detalhes da região porosa. ....	61

- Figura 12: Curvas típicas de tensão-deformação de vasos de CB hidratados (Média de ensaios em triplicata). .....62
- Figura 13: Adesão e morfologia de células musculares lisas humanas (HSMCs) cultivadas no interior dos vasos de celulose bacteriana e secas através da técnica do ponto crítico de CO<sub>2</sub>, e analisadas em diferentes dias de cultura celular: 24, 48, 72 horas, 7 e 14 dias. ....65
- Figura 14: Análise quantitativa de MTS da viabilidade de células musculares lisas (HSMCs) cultivadas nos vasos de celulose bacteriana em função do tempo de cultura. Resultado expresso como média ± desvio padrão. As barras com mesma letra indicam que não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si, utilizando-se variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey. ....66
- Figura 15: Sistema de fluxo pulsante para cultura do vaso de celulose bacteriana celularizado com HSMCs (a) Imagem do reator com o vaso no seu tamanho original; (b) imagem do reator com o vaso na sua maior extensão, proporcionada pela pressão gerada pela bomba peristáltica. ....67
- Figura 16: Análise quantitativa e qualitativa da viabilidade de células musculares lisas (HSMCs) cultivadas no interior dos vasos de celulose bacteriana em função do tempo de cultura, através da utilização das técnicas de (a) MTS. Resultados expressos como média ± desvio padrão; barras com mesma letra indicam que os resultados não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) segundo análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey; (b) Live/Dead<sup>®</sup>, células vivas coradas de verde e células mortas coradas de vermelho. ....69
- Figura 17: Imagem de MEV das HSMCs semeadas sobre a superfície luminal dos vasos de celulose bacteriana. (a) HSMCs cultivadas em condição estática; (b) HSMCs cultivadas em condição dinâmica de fluxo pulsante (A direção do fluxo está indicada pela seta branca, vertical). ....70

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Materiais naturais utilizados na engenharia de tecidos vascular. ....	36
Quadro 2: Exemplos de vasos sanguíneos artificiais a base de celulose bacteriana. ....	39
Quadro 3: Materiais sintéticos utilizados na reconstrução vascular. ....	42



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Propriedades dos vasos sanguíneos nativos (Adaptado de Niklason *et al.*, 1999).....35
- Tabela 2: Pressão de ruptura (Latimer *et al.*, 2014) e tensão à ruptura (Niklason *et al.*, 1999) de vasos sanguíneos humanos, e tensão à ruptura para vasos de celulose bacteriana produzidos neste trabalho.....63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- CB:** celulose bacteriana
- HUVEC:** célula endotelial de cordão umbilical humano
- HASMC:** célula muscular lisa de aorta humana
- SMGS:** suplemento de crescimento de músculo liso
- MEC:** matriz extracelular
- RGD:** Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-ácido aspártico)
- MEV:** microscopia eletrônica de varredura
- PBS:** solução fosfato salina (Phosphate Buffered Saline)
- EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético
- UV-VIS:** radiação ultravioleta-visível
- PCT:** placa de cultura de tecidos
- Dacron<sup>®</sup>:** tereftalato de polietileno
- PTFE:** poli(tetra-flúor etileno) (Teflon<sup>®</sup>)
- PTFEe:** poli(tetra-fluor etileno) expandido
- VEGF:** Vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)
- MTS:** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio].



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS .....	29
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>31</b>
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS DE VASOS SANGUÍNEOS .....	31
<b>2.1.1 Engenharia de Tecidos</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1.2 Vasos Sanguíneos Nativos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1.3 Biomateriais na Construção de Vasos Sanguíneos Artificiais</b> .....	<b>34</b>
<i>2.1.3.1 Materiais naturais</i> .....	<i>36</i>
<i>2.1.3.1.1 Celulose bacteriana</i> .....	<i>37</i>
<i>2.1.3.2 Polímeros sintéticos</i> .....	<i>40</i>
<b>2.1.4 Características Mecânicas dos Vasos Sanguíneos</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1.5 Biorretores no Crescimento de Tecido Vascular</b> .....	<b>45</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA .....	50
3.2 PRODUÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA .....	51
3.3 PURIFICAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA .....	52
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA .....	52
3.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS .....	52
3.6 SEMEADURA DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS NOS VASOS DE CELULOSE .....	53
3.7 SECAGEM POR PONTO CRÍTICO DE CO <sub>2</sub> .....	53
3.8 CARACTERIZAÇÃO DE ADESÃO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	53
3.9 VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	54
3.10 PROJETO DO SISTEMA DE FLUXO PULSANTE .....	55
3.11 DESENVOLVIMENTO DO REATOR BIOLÓGICO TECIDUAL MUSCULAR .....	56

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA .....	59
<b>4.1.1 Propriedade Mecânica.....</b>	<b>62</b>
4.2 ADESÃO, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA.....	64
4.3 REATOR BIOLÓGICO TECIDUAL MUSCULAR .....	67
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>71</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	71
5.2 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	72
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a cada ano morrem 17,3 milhões de pessoas em todo o mundo vítimas de doenças cardiovasculares. A estimativa é que em 2030 o total de mortes possa chegar a 23,6 milhões (Mendis *et al.*, 2011). A aterosclerose, doença crônica multifatorial das artérias que, se inicia e se desenvolve a partir de uma idade jovem, até que se manifeste clinicamente mais tarde na vida adulta, é a principal causa de obstrução coronariana, aneurisma aórtico, acidente vascular cerebral e gangrena das extremidades. A substituição ou reparo dos vasos sanguíneos danificados podem ser realizados com enxertos vasculares autólogos (do próprio paciente), alogênicos (de um doador), xenogênicos (de outra espécie) ou sintéticos, tornando esse procedimento um tratamento de rotina para muitos tipos de doenças cardiovasculares.

Os enxertos vasculares ideais devem ser biocompatíveis, não trombogênicos, complacentes, resistentes a infecções, e que tenham um longo tempo de manutenção do conduto livre. Os enxertos autólogos, em especial para as artérias, são atualmente preferidos devido à sua superfície não trombogênica, e também à sua força e elasticidade naturais, enquanto as veias autólogas são rotineiramente utilizadas como “*bypass*” nas artérias do sistema circulatório. O uso de veias safenas, tornou-se limitado devido às restrições de propriedades mecânicas, no procedimento de anastomoses, com altas taxas de trombogenicidade e restrições de dimensões. Cerca de 10% a 40% dos doentes que necessitam de enxertos autógenos de veia safena não apresentam uma veia safena adequada devido à incompatibilidade de tamanho ou doença vascular (Conklin *et al.*, 2002).

Existe atualmente uma grande motivação nos grupos de engenharia de tecidos vascular para o desenvolvimento de vasos sintéticos de pequeno calibre com baixa taxa de trombogenicidade. As principais vantagens de tais enxertos vão da possibilidade de disponibilização de vasos em diversos diâmetros e comprimentos, ao fácil armazenamento, preparação e manuseio dos mesmos. No entanto, sua trombogenicidade inerente e tendência à incompatibilidade permanecem sendo suas principais desvantagens, não se tendo em geral perspectivas realistas de curto prazo.

A necessidade de desenvolvimento de vasos artificiais motivou os cientistas a desenvolverem novos materiais, em substituição aos vasos naturais. Um dos principais desafios nesta área é produzir

construções de tecidos vascularizados, um requisito para a maioria dos tecidos e órgãos complexos. Abordagens para cumprir este requisito incluem a utilização de fatores de crescimento angiogênico em matrizes engenheiradas (Richardson *et al.*, 2001), o uso de células tronco como semente de microvascularização (Levenberg *et al.*, 2002), bem como a formação de estruturas tridimensionais capazes de suportar o crescimento celular. De acordo com essa abordagem, uma das considerações mais importantes é a seleção de um biomaterial adequado para a construção da matriz, com características químicas, mecânicas e de biodegradação adequadas para as diversas possíveis aplicações.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um reator biológico tecidual muscular de celulose bacteriana, colonizado com células de músculo liso de aorta humana a superfície interna do vaso (lúmen), de forma a resistir e a responder a fluxo pulsante em condição fisiológica.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Aprimorar o método de produção de celulose bacteriana em formato tubular, utilizando bombeamento de ar;
- Caracterizar a colonização do suporte tubular de celulose com células de músculo liso de aorta humana;
- Produzir um sistema de fluxo pulsante que exponha os suportes tubulares colonizados a um fluxo sanguíneo mimético;
- Avaliar a influência do fluxo pulsante no comportamento das células musculares no reator biológico tecidual exposto ao modo de operação de fluxo pulsante fisiológico



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS DE VASOS SANGUÍNEOS

#### 2.1.1 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos, também conhecida como engenharia tecidual, é uma disciplina científica relativamente nova que combina células, engenharia e materiais para melhorar ou substituir funções biológicas. A engenharia de tecidos é descrita por Langer e Vacanti, dois pesquisadores pioneiros deste novo campo, como uma área interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar a formação tecidual (Lanza *et al.*, 2011). O conceito básico de engenharia de tecidos inclui um suporte físico (*scaffold* 3D) composto por polímeros sintéticos (Dacron e PTFEe são alguns exemplos) ou materiais naturais (e.g., colágeno, elastina, fibrina), que inicialmente servem como um arcabouço (*scaffold*) ou modelo que mimetize a matriz extracelular (MEC), no qual as células podem se organizar e amadurecer *in vitro*, antes do implante no local apropriado, ou de sua utilização como um dispositivo biomédico.

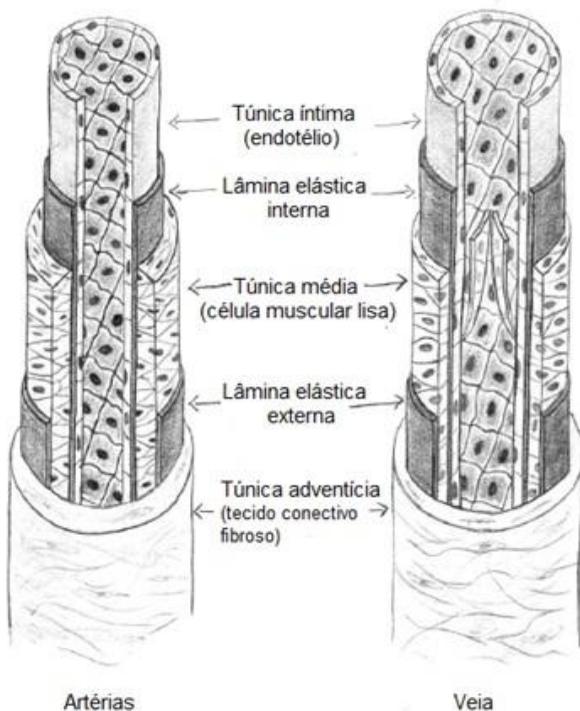
A pesquisa inicial em meados do século 20 focava no desenvolvimento de materiais bioinertes, com uma resposta mínima do hospedeiro, caracterizados por interações mínimas com o sangue e tecido circundante. Atualmente, porém, os biomateriais estão sendo desenvolvidos para estimular as reações entre o suporte, proteínas e as células, em nível molecular, de forma mais precisa e controlável. As propriedades e características do suporte são otimizadas para guiar as respostas celulares e melhorar a interação de contato *scaffold*-célula, pois as células reconhecem quimicamente a superfície do material e respondem morfológicamente de diversas maneiras à topografia do mesmo, o que modifica as características celulares de adesão, viabilidade, proliferação e migração (Berti *et al.*, 2013). O conceito fundamental no desenvolvimento desses biomateriais é que o *scaffold* deve conter informação estrutural, que mimetiza a formação do tecido celular, bem como provê elementos de comunicação e de controle, tais como fatores de crescimento, peptídeos de aderência e outras moléculas que mimetizam química ou estruturalmente os componentes da matriz extracelular (Pierschbacher e Ruoslahti, 1984).

### 2.1.2 Vasos Sanguíneos Nativos

O sistema cardiovascular é constituído pelo coração, pelo circuito pulmonar, que transporta o sangue para os pulmões, e o circuito sistêmico, que distribui o sangue para todos os órgãos e tecidos do corpo. Esses circuitos são constituídos de artérias, vasos capilares e veias. As artérias transportam sangue a partir do coração através de ramificações de vasos de diâmetro cada vez menores, ramificando-se finalmente até os capilares. Os capilares são vasos sanguíneos de parede delgada, os quais possuem menor calibre; e, por fim, as veias, que são vasos que drenam os leitos capilares e formam vasos cada vez maiores que retornam o sangue ao coração (Gartner e Hiatt, 2007).

Vasos sanguíneos humanos são constituídos de três camadas diferentes: túnica íntima, média e adventícia (Figura 1).

Figura 1: Artérias e veias: composição tecidual (Fink, 2009).



A composição e estrutura dessas camadas dependem em grande parte da posição do vaso sanguíneo no sistema circulatório. Uma vez que as artérias transportam o sangue sob alta pressão, em contraste com as veias, as paredes das artérias são mais espessas e mais elásticas e com mais tecido muscular do que as das veias. Os capilares, os menores vasos, são uma exceção à estrutura geral; sua função é a de fornecer oxigênio ao tecido circundante, e para permitir a difusão de oxigênio as paredes capilares chegam a ter apenas uma célula de espessura.

A íntima é a camada mais interior das artérias e das veias, e consiste em uma monocamada de células endoteliais, denominada endotélio, que se assentam sobre a lâmina basal, uma camada fina de tecido conjuntivo. Em grandes artérias elásticas, tais como a aorta, a íntima tem um terceiro componente chamado de subcamada endotelial, que pode conter ocasionalmente células de músculo liso, além de colágeno, fibras elásticas e uns poucos fibroblastos. As células endoteliais da íntima são interconectadas com junções bem próximas que regulam o transporte de moléculas através da monocamada endotelial, bem como com o plano de comunicação entre as junções que permitem a comunicação célula-célula via transporte de íons e metabólitos. Outras estruturas envolvidas no transporte transendotelial são as vesículas pinocíticas, ou corpos de Weibel-Palade, que estão principalmente ligadas ao lúmen e às células da membrana basal. As células endoteliais comunicam-se com células do músculo liso subjacente diretamente através de processos que se estendem através da lâmina basal, e pelos meios de comunicação, por sinalização, como a comunicação parácrina. A função principal da lâmina basal é proporcionar uma rede aderente, que consiste em uma matriz extracelular (MEC) de colágeno do tipo IV, laminina, fibronectina e proteoglicanas na qual as células endoteliais podem crescer. Ela também proporciona suporte estrutural à parede arterial (Fink, 2009).

A túnica média, normalmente a camada mais espessa da parede das artérias, contém apenas as células musculares lisas incorporadas em uma MEC constituída de elastina, fibronectina, colágeno e proteoglicanas. As células musculares lisas são fusiformes, com as suas miofibrilas orientadas ao longo do eixo do comprimento da célula e recobertas por uma fina membrana basal. Essa camada dá aos vasos suas propriedades de contração e de relaxamento, sendo mais espessa nas artérias do que nas veias. Na aorta, a túnica média pode atingir uma espessura de 500  $\mu\text{m}$ , em contraste com a espessura média de 20–50  $\mu\text{m}$  nas veias exteriores (Fink, 2009; Gartner e Hiatt, 2007).

A adventícia é a camada mais externa, sendo formada por tecido conjuntivo mole, contendo principalmente colágeno do tipo I misturado com elastina, fibroblastos, nervos e *vasa vasorum*. A *vasa vasorum* é uma rede de arteríolas, capilares e vênulas que abastecem as paredes dos vasos exteriores de artérias grossas com oxigênio. A adventícia pode servir como uma lâmina de proteção, e permite a inervação das células musculares lisas dos meios exteriores. A adventícia costuma ser a camada mais espessa da parede das veias (Fink, 2009; Gartner e Hiatt, 2007).

As artérias sofrem mudanças progressivas e graduais, do nascimento até a morte, sendo difícil estabelecer-se onde os processos normais do desenvolvimento terminam e onde os retrocessos começam. Cada artéria exibe seu próprio padrão de envelhecimento. Lesões ateroscleróticas são caracterizadas pelo espessamento da túnica íntima, pela proliferação das células musculares lisas e de elementos celulares da matriz extracelular e do tecido conjuntivo, pelo depósito de colesterol nas células musculares lisas e em macrófagos formando placas de gordura visíveis, características da doença (Tuttolomondo *et al.*, 2012). Estas alterações podem estender-se até a porção interna da túnica média, e o espessamento pode tornar-se tão desenvolvido a ponto de obstruir um vaso; as artérias coronárias estão entre as que apresentam a maior predisposição para desenvolver aterosclerose. O espessamento uniforme da túnica média é um fenômeno natural do envelhecimento. Quando a túnica média de uma artéria é debilitada por um defeito embrionário, doenças ou lesão, a parede da artéria pode dilatar-se muito; quando este processo de dilatação progride, pode transformar-se em um aneurisma, cuja ruptura traz consequências graves e até mesmo a morte (Junqueira e Carneiro, 2008; Yildiz, 2007).

### **2.1.3 Biomateriais na Construção de Vasos Sanguíneos Artificiais**

Biomaterial pode ser definido como qualquer material, natural ou sintético, que compreende a totalidade ou parte de uma estrutura viva ou dispositivo biomédico que realiza, aumenta, ou substitui uma função natural (Williams, 1999).

Diversos materiais são investigados quanto à sua aplicação como biomaterial. Eles podem ser divididos em materiais naturais e polímeros sintéticos. As propriedades requeridas para um biomaterial podem variar com o tipo de célula a ser utilizado, com a estratégia para a formação de tecido e com a área considerada para o implante. Uma demanda comum para todos os biomateriais é a biocompatibilidade, um

conjunto de fenômenos relacionados com o envolvimento biológico a que o material fica sujeito no organismo humano. Materiais biocompatíveis devem apresentar as seguintes características: permitir a adesão, crescimento, manutenção e diferenciação celular; permeabilidade para fluxo de compostos químicos, nutrientes e resíduos metabólicos, capacidade de suportar a presença de diversos tipos de células, excelente estrutura porosa com uma ampla área superficial que permita às células migrarem e interagirem entre si; resistência mecânica para suportar a organização celular, bem como capacidade para se conformar em várias formas (Berti, 2012). Outro aspecto importante a ser avaliado nos casos específicos de materiais destinados a estar em contato com o sangue é a trombogenicidade, definida como a capacidade de um material para induzir ou promover a formação de tromboembolismo (Williams, 1999). Materiais não trombogênicos devem ter uma baixa velocidade de produção de trombina, baixo consumo e grau de ativação plaquetária e ativação de leucócitos (Sefton *et al.*, 2000). Também as propriedades mecânicas são importantes, e dependem do tecido alvo do enxerto. Para enxertos vasculares, o material deve ser investigado antes que possa ser utilizado como implante, quanto à sua capacidade de suportar a pressão do sangue, devendo apresentar resistência à ruptura, conformidade ao local implantado, força de retenção da sutura e resistência ao desgaste. Algumas das propriedades de vasos nativos com seus respectivos valores são dadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades dos vasos sanguíneos nativos (Adaptado de Niklason *et al.*, 1999).

Propriedades dos materiais	Valor dos vasos nativos
Pressão fisiológica (mmHg)	80–120
Resistência à Ruptura (mmHg)	1680 ± 307
Força de retenção da sutura (g)	273 ± 31

O desenvolvimento de biomateriais para aplicações médicas não é uma área nova, pois existe há mais meio século de forma organizada e sistematizada, e já resultou no desenvolvimento bem sucedido de substitutos de válvulas cardíacas, articulações de quadril e joelho, lentes intraoculares e desenvolvimento de implantes dentários.

### 2.1.3.1 Materiais naturais

O conceito básico da engenharia de tecidos inclui um suporte físico (*scaffold* 3D) que pode ser composto por materiais naturais tais como colágeno, elastina ou fibrina, que sirva inicialmente como uma matriz, ou modelo que mimetize a MEC, no qual as células podem se organizar e amadurecer *in vitro* previamente à implantação no local apropriado.

Alguns exemplos de materiais naturais investigados para aplicações na engenharia de tecidos vasculares foram avaliados quanto às suas propriedades mecânicas e bioquímicas resultando em percussores promissores ou modelos de substitutos vasculares (Quadro 1).

Quadro 1: Materiais naturais utilizados na engenharia de tecidos vascular.

Material	Célula utilizada	Características observadas	Referência
Colágeno tipo 1 e Fibrina	Muscular lisa de aorta de rato	Propriedade mecânica e proliferação celular	(Cummings <i>et al.</i> , 2004)
Colágeno e Dacron	Endotelial, muscular lisa e fibroblasto de aorta bovina	Celularização do suporte e imunofluorescência (fator de von Willebrand)	(Weinberg e Bell, 1986)
Cola de fibrina, VEG F e gelatina	HUVEC	Adesão e proliferação celular e condições dinâmicas	(Kumar e Krishnan, 2002)
Ácido hialurônico esterificado	Muscular lisa humana e suína	Adesão e proliferação celular e resistência mecânica	(Remuzzi <i>et al.</i> , 2004)
Polímero de ácido hialurônico	Endotelial vascular humana	Adesão e proliferação celular	(Turner <i>et al.</i> , 2004)
Submucosa do duodeno	-	Propriedades mecânicas	(Roeder <i>et al.</i> , 1999)

Fibroína de seda	Muscular lisa coronariana e endotelial de aorta humana	Adesão e proliferação celular, condições dinâmicas e níveis de proteínas (colágeno, elastina, CCNE2, ACTA2, CCN1 e CALD1)	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
Membrana amniótica	Endotelial vascular de porco	Adesão celular, condições dinâmicas e imunohistoquímica ( $\alpha$ -actina, calponina, desmina e elastina)	(Lee, P.-H. <i>et al.</i> , 2012)
Matriz Extracelular	Muscular lisa humana	Propriedades mecânicas, imunofluorescência ( $\alpha$ -actina e calponina) e histologia (colágeno)	(Bourget <i>et al.</i> , 2012)
	Muscular lisa vascular e fibroblasto humano	Propriedades mecânicas e imunomarcção (colágeno tipo I, III e IV, laminina, fibronectina e sulfato condroitina)	(L'heureux <i>et al.</i> , 1998)

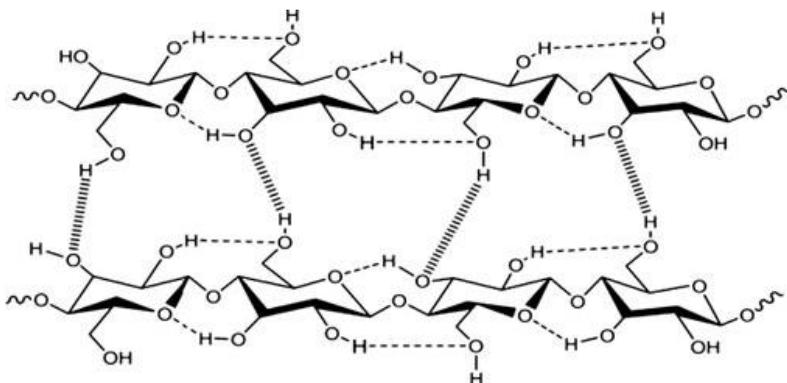
### 2.1.3.1.1 Celulose bacteriana

A celulose é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza, podendo ser sintetizada por plantas, alguns animais e ainda por um grande número de microrganismos (Castro *et al.*, 2011; Czaja *et al.*, 2004). Ela é composta por monômeros de glicose ligados por ligações  $\beta(1-4)$ glicosídicas, com sua fórmula química de  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , sendo um dos constituintes estruturais da parede celular de quase todas as plantas, de muitos fungos e de alguns tipos de algas (Figura 2). No entanto, a celulose vegetal contém muitas impurezas, incluindo macromoléculas de hemicelulose e lignina, o que implica na necessidade de tratamentos químicos agressivos para remoção das mesmas, os quais podem causar alterações irreversíveis na estrutura da celulose (Park *et al.*, 2003).

Com advento de técnicas de biotecnologia, reduzindo o impacto ambiental da produção de celulose, estudos sugerem que a celulose bacteriana (CB) ou biocelulose pode ser a melhor escolha para fabricação de produtos de celulose (Castro *et al.*, 2011; Keshk *et al.*,

2006; Nakagaito *et al.*, 2010; Pourramezan *et al.*, 2009). A celulose bacteriana é um polissacarídeo produzido por muitas espécies de bactérias, tais como as do gênero *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Rhizobium* (Moosavi-Nasab e Yousefi, 2011; Sani e Dahman, 2010).

Figura 2: Representação da celulose, ligações de hidrogênio inter- e intramolecular. Linhas tracejadas mostram as ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto as linhas pontilhadas mostram as ligações de hidrogênio intramoleculares (Huang *et al.*, 2014).



As características estruturais da celulose bacteriana são determinadas pela linhagem bacteriana que a produz. Entre os gêneros mencionados, a *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente *Acetobacter xylinum*) é um dos microrganismos mais utilizados para produção de celulose (Keshk *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2008). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, aeróbia estrita, capaz de produzir e secretar a celulose para o meio extracelular, a temperaturas entre 25 e 30 °C e pH entre 3 e 7, utilizando como fontes de carbono glicose, frutose, sacarose, manitol, entre outras (Castro *et al.*, 2011). Em termos de estrutura química, a celulose bacteriana é idêntica à produzida por plantas, no entanto, apresenta maior cristalinidade (Nakagaito *et al.*, 2010), maior capacidade de retenção de água (Saibuatong e Phisalaphong, 2010), alto grau de polimerização (Dahman *et al.*, 2010), maior força mecânica, maior pureza (Castro *et al.*, 2011) e a vantagem de não conter lignina,

hemicelulose ou outros componentes naturais que acompanham a celulose vegetal.

Baseados nas propriedades da celulose bacteriana diversos pesquisadores investigam sua utilização como *scaffold* para vasos sanguíneos artificiais (Quadro 2).

Quadro 2: Exemplos de vasos sanguíneos artificiais a base de celulose bacteriana.

Material	Célula utilizada	Características avaliadas	Referência
Celulose	Muscular lisa	Propriedades mecânicas, proliferação e fluorescência (citoesqueleto e núcleo celular)	(Bäckdahl <i>et al.</i> , 2006)
Celulose produzida em diferentes concentrações de O <sub>2</sub>	Endotelial de veia safena humana	Propriedades mecânicas e proliferação celular	(Bodin <i>et al.</i> , 2007)
Celulose	-	Propriedades mecânicas e morfologia	(Putra <i>et al.</i> , 2008)
Celulose com xiloglicanas e RGD	Endotelial humana	Adesão celular e trombogenicidade	(Fink, 2009)
Celulose	Muscular e endotelial bovina	Propriedades mecânicas, histologia celular e fluorescência (citoesqueleto e núcleo celular)	(Zahedmanesh <i>et al.</i> , 2011)
Celulose	-	Análise estrutural (MEV) e degradação	(Oliveira <i>et al.</i> , 2013)

Recentemente, diversos grupos de pesquisa estudaram a utilização da CB para aplicações biomédicas. Entre essas aplicações,

podem ser incluídas: substituto temporário de pele para recuperação de ferimentos e queimaduras (Ciechańska, 2004; Czaja, W. *et al.*, 2006; Czaja, W. K. *et al.*, 2006), cirurgias de restituição da laringe (De Souza *et al.*, 2011), produção de vasos sanguíneos artificiais (Klemm *et al.*, 2001), biomaterial para córnea (Wang *et al.*, 2010), cartilagem artificial (Svensson *et al.*, 2005), sistema para liberação de fármacos, recuperação de nervos, recuperação de gengiva, recuperação da dura-máter, revestimento de *stents*, válvulas cardíacas, uretra, prótese artificial e material de regeneração óssea (Czaja, W. K. *et al.*, 2006; Petersen e Gatenholm, 2011; Wan *et al.*, 2006). Estudos de biocompatibilidade da CB *in vivo*, utilizando modelos animais, têm demonstrado sua excelente capacidade de integração com o tecido lesado, sem a presença de processos inflamatórios agudos nem rejeição a longo prazo (Helenius *et al.*, 2006). Devido à sua estrutura única de rede tridimensional de nanofibras, sua capacidade de retenção de água elevada, uma elevada resistência mecânica e excelente biocompatibilidade, a CB vem sendo amplamente utilizada na engenharia de tecidos (Figura 3).

Figura 3: Perspectivas para as várias aplicações biomédicas de materiais baseados em celulose bacteriana. Adaptado de (Fu *et al.*, 2013).



### 2.1.3.2 Polímeros sintéticos

Atualmente, Dacron® e PTFEe ainda são amplamente usados como substitutos arteriais sintéticos. Apesar de serem substitutos bem sucedidos para vasos de grande diâmetro (> 6 mm) e em regiões de alto fluxo, eles mostram trombogenicidade e incompatibilidade de

conformidade em vasos de pequeno diâmetro e/ou baixo fluxo. Novas técnicas têm sido avaliadas para aumentar a permeabilidade, revestimentos e disseminação da superfície dos materiais com diferentes células. Materiais sintéticos, em contraste com materiais naturais, carecem muitas vezes de superfícies de adesão, embora tenham resistência mecânica suficiente para resistir à pressão fisiológica, (Quadro 3).

Quadro 3: Materiais sintéticos utilizados na reconstrução vascular.

Material	Célula utilizada	Características avaliadas	Referência
Dacron	Endotelial venosa canina	Enxerto em cães e proliferação celular	(Sharefkin <i>et al.</i> , 1983)
Ácido poliglicólico	Muscular lisa e endotelial de aorta bovina	Propriedades mecânicas, condições dinâmicas, histologia e imunomarcação (colágeno e PECAM)	(Niklason <i>et al.</i> , 1999)
	Muscular lisa e células-tronco		(Wang <i>et al.</i> , 2010)
Silicone	-	Implante em ratos e coelhos	(Campbell <i>et al.</i> , 1999)
PTFE enriquecido com fibrina e RGD	Endotelial de safena humana adulta	Adesão, proliferação celular e condições dinâmicas	(Meinhart <i>et al.</i> , 2005)
Ácido poliglicólico revestido com poli(4-hidroxitirato)	HUVEC	Condições dinâmicas e histologia	(Hoerstrup <i>et al.</i> , 2001)
Silsesquioxano incorporado com RGD	Célula progenitora endotelial	Imunofluorescência (von Willebrand, CD31, E-selectina e eNOS) e RT-PCR (CD34, CD133, FIK-1/KDR e CD31)	(Alobaid <i>et al.</i> , 2006)
Ácido poliglicólico e poli(hidroxiácido)	Autóloga de artéria carótida de ovinos	Implante e histologia	(Shum-Tim <i>et al.</i> , 1999)
Ácido poliglicólico e um copolímero de	Miofibroblasto e muscular lisa de veias	Implante e imunohistologia (fator VIII, $\alpha$ -actina e	(Watanabe <i>et al.</i> , 2001)

L-lactídeo e caprolactona	femorais de cães	desmina	
Poliestireno revestido com fibronectina, laminina ou gelatina	Endotelial de aorta bovina	Proliferação celular e proteínas expressas (PGI <sub>2</sub> , α <sub>5</sub> -integrina)	(Balcells e Edelman, 2002)
Poli([ε]-caprolactona)	Fibroblasto de rato	Propriedades mecânicas e histologia	(Hu <i>et al.</i> , 2012)
Soluções líquido cristalinas de peptídeo anfifílico (C <sub>16</sub> -V <sub>3</sub> A <sub>3</sub> E <sub>3</sub> (NH <sub>2</sub> ))	Muscular lisa de artéria coronária humana	Proliferação e remodelação celular	(Mcclendon e Stupp, 2012)
PTFE enxertada com poli(1,8-octanodiol-co-citrato)heparina	Endotelial isolada de sangue e músculo liso humano	Adesão, viabilidade, proliferação e imunofluorescência (von Willebrand, VE-caderina e núcleo celular)	(Hoshi <i>et al.</i> , 2013)

## 2.1.4 Características Mecânicas dos Vasos Sanguíneos

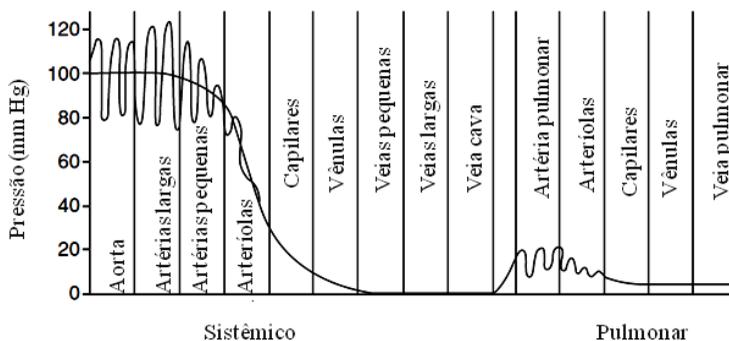
Como resultado de sua localização única, as células que compõem os vasos sanguíneos experimentam a atuação de basicamente três propriedades mecânicas: pressão criada pela força hidrostática do sangue no interior do vaso sanguíneo (Figura 4); tensões criadas como resultado das conexões intercelular entre as células endoteliais que exercem forças longitudinais na célula durante a vasomotricidade, e tensão de cisalhamento, força de arrasto gerada pelo atrito no fluxo sanguíneo com a parede endotelial. Destas forças, a tensão de cisalhamento é talvez a mais importante força hemodinâmica, pois estimula a liberação de substâncias vasoativas e pode ocasionar alterações de expressão de genes celulares, metabolismo e morfologia celular (Davies, 1995).

A natureza e a magnitude da tensão de cisalhamento desempenham um importante papel na manutenção a longo prazo da estrutura e função dos vasos sanguíneos. A natureza da tensão de cisalhamento experimentada pelas células é uma função do fluxo de sangue padrão ao longo da vasculatura cardíaca gerada pelo ciclo sistêmico.

As células expostas a um fluxo sofrem uma reorientação, com o seu eixo longitudinal paralelo à direção do fluxo sanguíneo (Dewey *et al.*, 1981; Flaherty *et al.*, 1972). Esta reorientação dinamiza a célula, diminuindo a resistência efetiva e baixando a tensão de cisalhamento sobre elas (Barbee *et al.*, 1995), um fenômeno que pode ou não ser importante, em termos de adaptação ou de filtragem dos estímulos secretados no sangue (Davies, 1995). Nas regiões vasculares que apresentam curvaturas abruptas nos vasos, como por exemplo, na bifurcação da carótida, o fluxo laminar de sangue é interrompido, resultando em uma diferenciação constante dos padrões de fluxos. Nestes casos a parede medial do bulbo carótido experimenta uma elevada tensão, enquanto que a parede lateral experimenta recirculação, que varia de acordo com o ciclo cardíaco, resultando em um fluxo reverso (Ku *et al.*, 1985). Assim, a área lateral do bulbo carótido experimenta tensão de cisalhamento oscilatória. Como resultado da baixa magnitude da tensão de cisalhamento, estas células não se reorientam (Davies *et al.*, 1986) e podem ser expostas a elevados gradientes de cisalhamento (Barbee *et al.*, 1994; Davies, 1995; Davies *et al.*, 1986; Depaola *et al.*, 1992). O significado e a influência desses padrões de fluxo são demonstrados por estudos de desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em áreas da carótida que experimentam inversões

de fluxo e alterações de cisalhamento (Asakura e Karino, 1990; Ku *et al.*, 1985).

Figura 4: Diagrama esquemático da pressão medida em vários locais ao longo do trajeto circulatório (Saltzman, 2009).



### 2.1.5 Biorreatores no Crescimento de Tecido Vascular

Muitos estudos têm mostrado que o crescimento de células e tecidos vasculares é influenciado pelo fluxo de fluido sanguíneo (Zang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012; Niklason *et al.*, 1999; Meinhart *et al.*, 2005; Hoerstrup *et al.*, 2001). Uma abordagem que utiliza o uso de um ambiente dinâmico mecânico é o biorreator desenvolvido por Carrier e colaboradores (Carrier *et al.*, 1999). Um biorreator tecidual pode ser definido como um sistema que simula ambientes fisiológicos para a criação e entendimento das condições que modulam as características físicas e químicas das células precursoras de tecidos, como estruturas de apoio no desenvolvimento de órgãos *in vitro* (Barron *et al.*, 2003).

Um biorreator tecidual deve ser capaz de realizar pelo menos uma das seguintes funções: (1) estabelecer uma distribuição uniforme de células em uma matriz tridimensional (3D); (2) manter a concentração desejada de gases e nutrientes no meio de cultura; (3) proporcionar uma transferência de massa eficiente para o cultivo do tecido; (4) expor o desenvolvimento de tecidos a estímulos físicos; e (5) fornecer informações sobre o processo de formação do tecido 3D, que se origina de células isoladas (Freed e Vunjak-Novakovic, 2000).

Na concepção de um biorreator tecidual, ambos os controles biomecânicos e bioquímicos são essenciais para a criação de um

ambiente fisiológico simulado para o crescimento das células e de tecidos. Parâmetros tais como temperatura, vazão, pressão e pH devem ser controlados e verificados periodicamente. Com respeito à tensão de cisalhamento, verificou-se que um ambiente de baixa tensão de cisalhamento é vantajoso inicialmente para o crescimento das células e do tecido em um biorreator tecidual. No entanto, uma vez que os tecidos cultivados estão maturados eles podem ser expostos a uma gama de tensões de cisalhamento similar à que ocorre *in vivo*. Hoje em dia existem diferentes tipos de biorreatores disponíveis, incluindo sistemas estáticos, dinâmicos e biomiméticos (Barron *et al.*, 2003).

O sistema de frasco estático é o tipo mais simples de biorreator tecidual e é constituído por um recipiente idealmente projetado para construções de tecidos com a utilização de meios de cultura específicos (Sikavitsas *et al.*, 2002). Nestes sistemas estáticos pode ser gerado um ambiente misto, empregando o uso de um agitador magnético. Para a eficácia do crescimento, a troca gasosa e a transferência de massa são extremamente importantes. Na aeração estática o gás do sistema é fornecido por aeração de superfície no meio de cultura, enquanto que a transferência de massa molecular ocorre por difusão, já que não há fluxo de fluido na superfície das construções do tecido. Num sistema misto, a transferência de massa ocorre por convecção (ou advecção), e os tecidos experimentam um fluxo turbulento na superfície, o que pode levar a um estruturamento não uniforme das células (Freed *et al.*, 2000; Freed e Vunjak-Novakovic, 2002).

Um sistema que emprega o benefício de um menor ambiente de tensão de cisalhamento é um vaso de rotação. Basicamente, esses vasos de parede rotativa tem seu eixo de rotação alinhado horizontalmente, com o fluido preenchendo o recipiente de cultura. Este modo de operação favorece a difusão do gás, e otimiza o suprimento de oxigênio em todo o *scaffold*. A velocidade de rotação inicial é ajustada de modo que o meio de cultura e as células girem em sincronia com o recipiente, com o fornecimento eficiente de transferência de massa em um ambiente de baixo cisalhamento e de escoamento laminar (Unsworth e Lelkes, 1998). Esses biorreatores foram os primeiros sistemas concebidos para integrar simultaneamente co-cultivo, baixa tensão de cisalhamento, alta transferência de massa e crescimento tridimensional sem sacrificar qualquer outro parâmetro importante (Freed *et al.*, 2000; Freed e Vunjak-Novakovic, 2002; Unsworth *et al.*, 1998).

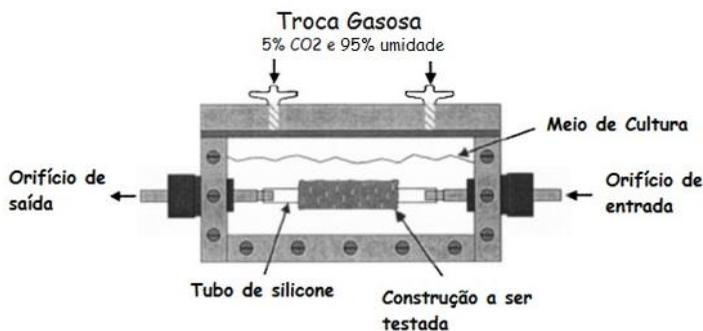
Por outro lado, câmaras de perfusão foram desenvolvidas para permitir que a cultura de tecidos seja realizada sob condições controladas de pressão. Normalmente, a câmara é configurada como um

compartimento central e um espaço anular. A entrada fica no meio de um espaço central de cultura de tecidos, e o meio de cultura no espaço periférico, sendo continuamente recirculado entre a câmara de gás e uma membrana externa. Além disso, o fluxo de fluido é laminar, e a transferência de massa é feita por convecção devido à recirculação (Freed *et al.*, 2002).

Recentemente, outros sistemas têm sido desenvolvidos para mimetizar as condições cardiovasculares *in vitro*. Nestes sistemas uma tensão radial é aplicada nos enxertos vasculares durante a semeadura e cultura, simulando e mimetizando bem as condições fisiológicas.

O sistema experimental mostrado na Figura 5 é um exemplo de biorreator que fornece uma tensão cíclica às construções, semeadas com células e preenchidas com meio de cultura sob controle pneumático para a produção de uma distensão cíclica de 10%. Todo o aparelho é mantido numa incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C e ligado a um fornecimento de ar.

Figura 5: Sistema biomimético empregado para aplicação de fluxo dinâmico e condicionamento de construções tubulares (Seliktar *et al.*, 2000).



As construções tubulares em um sistema mimético são expostas a uma dinâmica condicionada mecanicamente através da distensão e contração dos vasos, com uma frequência de 1 Hz. Tais estímulos dinâmico-mecânicos melhoraram a organização das células e o crescimento do tecido vascular (Seliktar *et al.*, 2000).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, descreve-se a metodologia experimental para produção, caracterização, ensaios com células e aplicação dos vasos em um sistema de fluxo pulsante. Um fluxograma dos principais passos realizados está representado na Figura 6.

O trabalho descrito nesta dissertação foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), com colaboração do Laboratório de Materiais, Ensaio e Instalações Elétricas (LAMATE), do Departamento de Engenharia Elétrica (EEL), e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), todos sediados na Universidade Federal de Santa Catarina campus de Florianópolis.

Figura 6: Fluxograma geral das metodologias realizadas.



### 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA

*Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 foi rotineiramente mantida em meio de cultura à base de manitol, composto por 25 g de manitol, 5 g de extrato de levedura e 3 g de peptona diluídos em 1 L de água destilada. Após o preparo do meio de cultura, o pH da solução foi ajustado para 6,5 e então o meio foi autoclavado por 20 min a 121 °C. A manipulação do meio de cultura e do inóculo foi realizada em câmara de fluxo laminar para manutenção da esterilidade. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer (125 mL) que foram mantidos à temperatura ambiente até que formassem membranas para que pudessem ser utilizados na produção de celulose bacteriana.

Uma linhagem primária de célula muscular lisa de aorta humana (HASMC) foi adquirida da Gibco® (Gibco®-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

As células musculares lisas de aorta humana (HASMC) foram rotineiramente mantidas em meio 231 Gibco®-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com suplemento de crescimento de músculo liso (SMGS). O meio foi transferido para uma câmara de fluxo onde foi adicionado 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Uma alíquota do meio de cultura foi mantida por 24 horas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. Este procedimento é feito para se observar a presença de contaminação. O meio de cultura completo foi utilizado dentro de um mês após suplementado com fator de crescimento. Durante todo o período experimental os meios de cultivo (com ou sem SMGS) foram armazenados em geladeira.

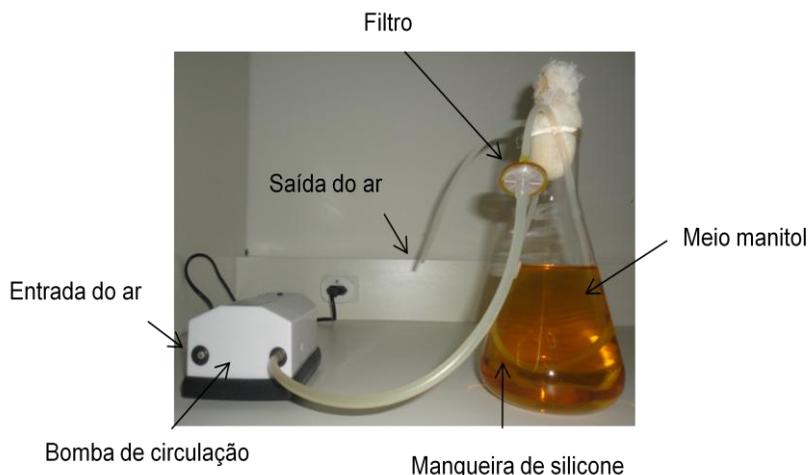
As HASMCs foram repicadas quando atingida confluência de aproximadamente 80% de preenchimento das placas de cultura de tecidos (PCT). O repique iniciou com a remoção do meio de cultura seguido de três lavagens com solução PBS (Phosphate Buffered Saline) para remoção das proteínas da superfície das células. Logo após, foi adicionado 1 mL de solução de tripsina EDTA. A PCT foi transferida para a estufa incubadora Ultrasafe HF 212UV durante 6 minutos para ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na PCT. Na câmara de fluxo a tripsina foi neutralizada com inibidor de tripsina Gibco®-Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e as células foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas por 3 minutos a 24°C e 1.200 rcf. A solução sobrenadante, tripsina e inibidor, foram removidas e o precipitado de células, foi homogeneizado em meio de cultura para a realização da contagem em câmara de Neubauer (SP LABOR, Presidente Prudente, SP, Brasil), para posteriormente serem

redistribuído em novas PCT conforme o planejamento dos experimentos ou para os testes. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas de cultivo.

### 3.2 PRODUÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA

Para obtenção dos vasos de celulose bacteriana, construiu-se um aparato (Figura 7) constituído de um Erlenmeyer de 500 mL, uma mangueira de silicone de 4 mm de diâmetro externo, uma bomba de circulação de ar e um filtro com uma membrana de porosidade de 0,24  $\mu\text{m}$ . O aparato foi montado com uma mangueira de silicone no interior do Erlenmeyer, deixando a extremidade da mangueira para fora do frasco; a uma das extremidades foi acoplado um filtro, seguido da bomba de circulação de ar; a outra extremidade foi deixada livre, para saída do ar proveniente da bomba. O sistema Erlenmeyer/mangueiras de silicone foi autoclavado, depois preenchido com meio de cultura inoculado com *G. hansenii* em uma razão de 20% v/v e a mangueira foi ligada à bomba de circulação. O crescimento microbiano ocorreu em condição estática, à temperatura ambiente (25 °C), durante um período de 12 dias.

Figura 7: Aparato para produção dos vasos de celulose bacteriana.



### 3.3 PURIFICAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA

Após 12 dias de cultura bacteriana os vasos de CB foram formados em entorno da mangueira de silicone na interface líquido/sólido/ar. Os vasos foram removidas da mangueira de silicone e transferidos para um frasco contendo uma solução de NaOH 0,1M, onde foram mantidos por 24 h a 50 °C para remoção de bactérias e/ou resíduos do meio de cultura e do metabolismo bacteriano que poderiam estar retidos nas redes de nanofibras da celulose bacteriana. As membranas foram em seguida submetidas à 3 lavagens sucessivas com água destilada, ou até que o pH da água de enxágue fosse equivalente ao da água destilada usada na lavagem. Em seguida as membranas foram autoclavadas por 20 min a 121 °C e mantidas refrigeradas até utilização ou foram previamente congeladas (-80 °C por 24 h) e logo depois liofilizadas (48 h) com a utilização do liofilizador modelo L101 (Liobras, São Carlos, Brasil).

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA

A microestrutura das membranas de celulose bacteriana foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente congeladas (-80 °C por 24 h) e logo depois liofilizadas (48 h) com a utilização do liofilizador modelo L101 (Liobras, São Carlos, Brasil). Após secagem, as amostras foram devidamente armazenadas em dessecador de vidro. A preparação das amostras e as análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras liofilizadas de CB foram fixadas sobre fitas de carbono aderidas a suportes de alumínio (*stubs*), e posteriormente metalizadas com ouro. A microestrutura foi analisada no equipamento JEOL JSM-6390LV.

### 3.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

As propriedades mecânicas dos vasos de celulose bacteriana foram determinadas em um texturômetro *Stable Micro Systems* (TA.XT Plus, Inglaterra), utilizando o software *Exponent Stable Micro Systems* v. 5.1.1.0 com uma célula de carga de 500 N, realizados no LAMATE/UFSC. Os módulos de tensão de ruptura, alongamento à ruptura e módulo de elasticidade foram determinados através das curvas

de tensão-deformação. Foram realizadas cinco repetições de cada amostra, de dimensões: 50 mm de comprimento e raio 4 mm. A espessura dos biofilmes,  $1,1 \pm 0,2$  mm, foi determinada utilizando um paquímetro eletrônico, considerando-se a média de cinco medidas repetidas aleatoriamente. A separação inicial entre as garras e a velocidade do teste foi de 40 mm e 0,5 mm/s respectivamente.

### 3.6 SEMEADURA DAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS NOS VASOS DE CELULOSE

Os vasos de celulose bacteriana foram previamente esterilizados e distribuídos, à base de um vaso por poço, em uma placa de cultura de seis poços, em condições estéreis; os vasos foram submersos em meio de cultura 231 (sem SMGS) e permaneceram em estufa incubadora (37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas. Para que os vasos permanecessem abertos, dois pedaços de silicone estéreis foram afixados às extremidades dos vasos. Após 24 horas o meio de cultura foi removido e foram semeadas  $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> de vaso, no interior do vaso. As células, de passagem 5, foram cultivadas em meio 231 suplementado, conforme descrito em 3.1. As células foram mantidas em condições de cultivo por 14 dias, e o meio foi renovado a cada dois dias de cultivo.

### 3.7 SECAGEM POR PONTO CRÍTICO DE CO<sub>2</sub>

A cada amostra coletada para o estudo de adesão (1, 2, 3, 7 e 14 dias) as amostras foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5%. Após a fixação, as amostras foram desidratadas com séries de soluções de etanol (30%, 40%, 70%, 80%, 90% e 100% v/v), com lavagem a cada quinze minutos; em seguida, as amostras foram distribuídas em redes de secagem. As amostras foram submetidas a cinco substituições de álcool por CO<sub>2</sub> líquido. O procedimento utilizado para secagem das amostras por ponto crítico de CO<sub>2</sub> foi adaptado de procedimento descrito na literatura (Bray *et al.*, 1993).

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DE ADESÃO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para caracterização da adesão das células nos vasos de CB, as amostras foram secas pela técnica de ponto crítico de CO<sub>2</sub> e posteriormente distribuídas sobre fitas de carbono que estavam aderidas sobre os *stubs*, então recobertas com uma camada de ouro. Após

recobrimento as amostras foram analisadas por MEV no LCME utilizando-se o equipamento JEOL JSM – 6390LV, com aumentos de 200, 1000 e 3000×.

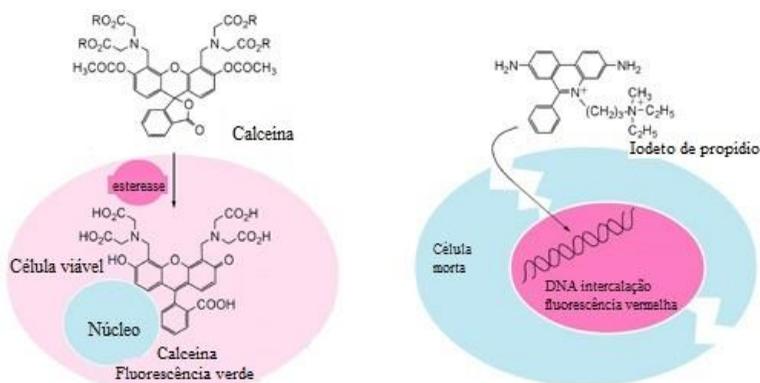
### 3.9 VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A viabilidade e a proliferação celular foram determinadas pela atividade mitocondrial das células, através da utilização do ensaio colorimétrico de MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]. As HASMCs foram semeadas no interior dos vasos de CB na densidade de  $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> (Backdahl *et al.*, 2006). A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas em função do tempo de cultura 0, 1, 2, 3, 7 e 14 dias. No ensaio de MTS, o meio de cultura foi removido, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e transferidas para uma nova placa de cultura, com 300 µL de meio de cultura; 60 µL do reagente MTS foram adicionados em cada poço da placa com as amostras. As placas de cultura foram incubadas por 1 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução (meio de cultura/MTS) foi homogeneizada, e 100 µL de cada amostra foram transferidos para uma nova placa de cultura de 96 poços para leitura da absorbância a 490 nm em leitor de microplacas. O grupo controle negativo foi constituído de células HASMCs cultivadas diretamente na placa de cultura; o grupo controle positivo constituiu-se de um vaso de CB sem a inoculação de células para avaliar a retenção do MTS na CB. O ensaio do MTS quantifica, através da medida de concentração, o formazan solúvel resultante de uma reação de redução do sal de tetrazólio (MTS) pelas mitocôndrias das células viáveis; o formazan é quantificado por espectrofotometria UV-VIS (absorbância a 490 nm) e é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura.

A viabilidade e proliferação foram igualmente avaliadas qualitativamente através do ensaio Live/Dead®. O kit Live/Dead® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) é utilizado em células de mamíferos e mede a atividade intracelular das esterases (calceína), indicador de células vivas, e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio), indicador de células mortas. O Live/Dead® é um método que tem sido utilizado por vários laboratórios para ensaios qualitativos e quantitativos de morte celular. As células vivas são distinguidas das células mortas através da calceína, que sofre ação da esterase em células vivas, formando uma espécie reduzida que fica retida dentro das células vivas, produzindo uma coloração verde fluorescente intensa e

uniforme; o homodímero de etídio, por sua vez, penetra nas células com membrana plasmática danificada, interage com o DNA e apresenta uma coloração vermelha fluorescente (Figura 8). Uma solução calceína: homodímero de etídio (4:1) foi preparada em PBS, e 100  $\mu\text{L}$  desta solução foram adicionados sobre cada amostra. A placa de cultura foi incubada por 45 minutos em incubadora a 37°C, em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Após incubação as amostras foram montadas em lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-L, Tóquio, Japão).

Figura 8: Reações envolvidas na fluorescência do kit Live/Dead (Adaptado de: <http://www.dojindo.com/store/p/190-Cellstain-Double-Staining-Kit.aspx>, acesso em: 14 de janeiro de 2014).

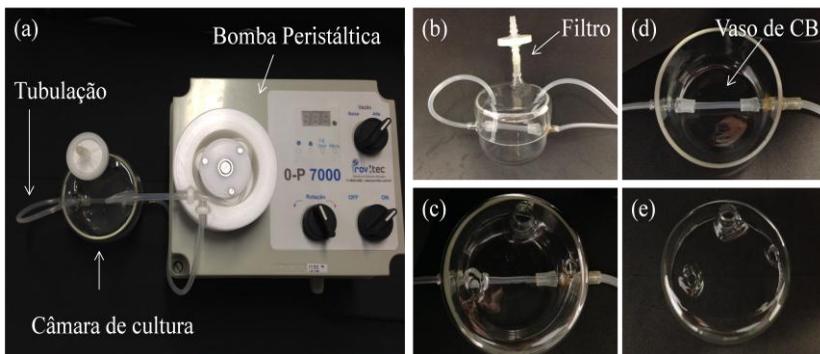


### 3.10 PROJETO DO SISTEMA DE FLUXO PULSANTE

O reator de perfusão foi projetado como um sistema de perfusão de *loop* fechado, o qual proporcionou um ambiente para cultura do vaso de CB sob condições de fluxo. Como mostrado na Figura 9, o reator consiste em três partes: uma câmara de cultura cilíndrica, uma bomba peristáltica e tubulações. A câmara de cultura foi construída em vidro comum de borossilicato com duas entradas laterais de 4 mm, onde se acoplou o vaso de CB de 3 cm pelo lado interno, e pelo lado externo as tubulações que permitem o fluxo contínuo. Também de vidro foi fabricada uma tampa com três entradas superiores: duas entradas para o sistema de tubulação e uma entrada para as trocas gasosas com a incubadora; nesta última existe um filtro com uma membrana de 0,24

µm. As tubulações são todas de silicone, e foi utilizada uma bomba peristáltica Provitec 0-P 7000 (Provitec, Jardim Satélite, São Paulo, Brasil) para promover o fluxo. Todo o sistema foi autoclavado, com exceção da bomba peristáltica, e montado dentro da estufa incubadora, para operação à temperatura de 37 °C e sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Figura 9: Sistema de fluxo pulsante, (a) sistema completo: câmara de cultura, tubulações e bomba peristáltica; (b) vista lateral da câmara de cultura, com tubulações e filtro; (c) vista superior da câmara de cultura com a tampa; (d) vista superior da câmara de cultura sem a tampa e (e) tampa da câmara de cultura.



### 3.11 DESENVOLVIMENTO DO REATOR BIOLÓGICO TECIDUAL MUSCULAR

Os vasos de CB foram previamente semeados com células HASMC na densidade de  $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em condições estáticas, em uma placa de Petri durante sete dias, com trocas de meio de cultura a cada 48 horas. Após o sétimo dia um dos vasos foi acoplado ao sistema de fluxo pulsante e um outro permaneceu em condição estática. Iniciou-se o escoamento do meio de cultura pelo interior do vaso, começando com uma frequência de pulso de 0,5 Hz, com aumento gradual até 1,0 Hz, onde o vaso permaneceu até o final do experimento. O número de Reynolds médio para a vazão máxima 30 mL/min foi de 347, indicativo de escoamento laminar. Os vasos de CB foram analisados após sete dias em condições dinâmicas e estáticas através de testes de adesão celular por MEV, e viabilidade e proliferação celular, como já descrito anteriormente nas Seções 3.7 e 3.8. Também se avaliou a integridade do vaso, através da capacidade de recuperar sua forma após o fluxo

pulsante, para isso avaliou-se um quadro de imagens no começo e fim do pulso, as medições foram realizados com o software livre GetData Graph Digitizer.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software Origin 8.0 (Origin Lab Data Analysis and Graphing Software. OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey, considerando-se estatisticamente diferentes os valores para os quais  $p < 0,05$ .

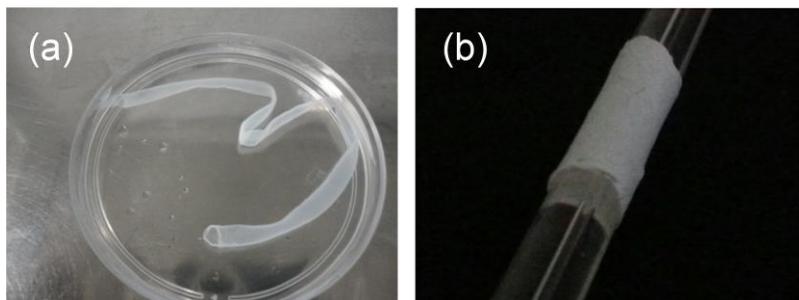


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA

Membranas de celulose bacteriana são produzidas quando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* é cultivada em meio de cultura à base de manitol em condições estáticas de cultura, formando assim uma membrana de celulose na interface líquido/ar. Esta membrana é formada por um grande número de camadas de celulose finas quase paralelas umas às outras (Fontana *et al.*, 1990), e cresce em espessura para dentro do meio líquido, sendo a camada mais recentemente formada aquela produzida na interface com o ar (Borzani e Souza, 1995). Em sua extensão, o filme de hidrogel ocupa toda a superfície do meio de cultura, resultando em uma membrana que geralmente apresenta o formato do frasco de cultivo, ou onde houver uma interface líquido/ar. Assim, o aparato desenvolvido neste trabalho (Figura 7) possibilita a produção de vasos de CB em torno de uma mangueira de silicone submersa em meio de cultura à base de manitol, por onde o ar é capaz de se difundir, pelos poros da mangueira de silicone, e a porosidade impede a migração de bactérias. Este comportamento está de acordo com o que é descrito por Bodin e colaboradores (Bodin *et al.*, 2007). O ar circula pela mangueira com auxílio de uma bomba de circulação. Trabalhos anteriores mostraram que membranas de celulose podem formar-se sem a circulação de ar (Oliveira *et al.*, 2013), contudo Bodin e colaboradores demonstraram que a resistência mecânica desse tipo de membrana é diretamente proporcional à quantidade de oxigênio difundindo pelo silicone, o que pode ser obtido por uma bomba de circulação ou com ar enriquecido com O<sub>2</sub> (Bodin *et al.*, 2007). Desta forma o vaso de CB é formado com diâmetro interno igual ao diâmetro externo da mangueira de silicone utilizada. Esta metodologia possibilita o desenvolvimento de vasos de calibres e formas variadas, apenas utilizando mangueiras com diferentes diâmetros, ou moldes de silicone, em princípio de qualquer formato, onde possa haver difusão de O<sub>2</sub> para a interface com o meio líquido de cultivo. Os vasos de CB produzidos neste trabalho possuem dimensões de 10 cm de comprimento, 4 mm de diâmetro e  $1,01 \pm 0,2$  mm de espessura (Figura 10).

Figura 10: Vasos de celulose bacteriana produzidos após 12 dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio base manitol após purificação. (a) vaso de celulose bacteriana purificado e (b) vaso de CB liofilizado.

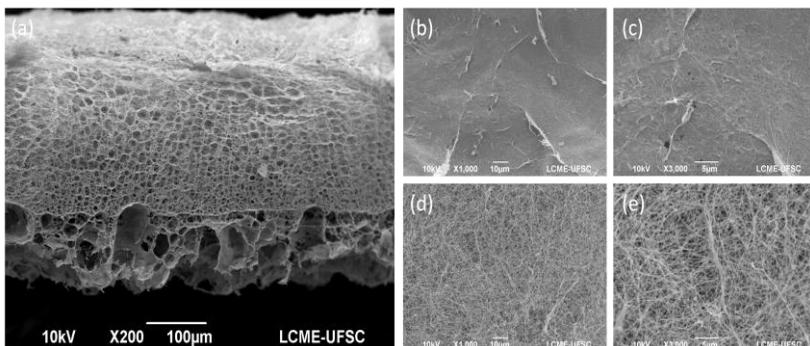


Quando hidratados, os vasos biossintetizados pela bactéria *G. hansenii* em meio base manitol apresentaram-se como um gel resistente, maleável, semitransparente e macroscopicamente heterogêneo (Figura 10a), em que o lado interior do vaso (em contato com o ar) é composto de uma densa rede de nanofibras, enquanto o lado exterior (em contato com o líquido) apresenta uma camada porosa com aspecto gelatinoso. Este tipo de organização da rede de celulose está de acordo com relatos anteriores, descritos na da literatura (Bäckdahl *et al.*, 2006; Klemm *et al.*, 2001). Por sua vez quando liofilizados (Figura 10b) os vasos apresentam aspecto (aparência e textura) de papel, porém mais resistentes à fratura. No processo de liofilização os vasos são congelados e têm a água retirada por secagem a vácuo. Esse processo faz com que a estrutura da rede de nanofibras de celulose seja mais preservada do que quando a secagem é feita naturalmente ou em estufa, onde a estrutura pode colapsar.

Os vasos de CB biossintetizados em condições estáticas de cultivo pela bactéria *G. hansenii* apresentaram superfícies macroscopicamente distintas, como já amplamente discutido em publicações de nosso grupo (Berti *et al.*, 2013; Recouvreur *et al.*, 2011; Stumpf *et al.*, 2013). As amostras liofilizadas foram em seguida caracterizadas quanto à sua microestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microestrutura das membranas de CB obtidas por meio do corte transversal (Figura 11a) mostra uma superfície do interior do vaso com alta densidade de nanofibras de celulose, que se organizam umas próximas às outras de forma entrelaçada (alta densidade de nanofibras de celulose) enquanto a superfície oposta, exterior, do vaso é

identificada por uma rede de nanofibras de CB que se organizam de forma espaçada (baixa densidade de nanofibras de celulose). Esses resultados são amplamente corroborados por diversos relatos na literatura (Bäckdahl *et al.*, 2006; Berti *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2013).

Figura 11: Membranas de celulose bacteriana obtidas após doze dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio de cultura à base de manitol. (a) Vista lateral da membrana de celulose bacteriana, formada por uma região superior densa (interior do vaso), seguida de uma região porosa que se estende até a superfície oposta (exterior do vaso). (b) e (e) mostram detalhes da região densa, enquanto (d) e (e) mostram detalhes da região porosa.



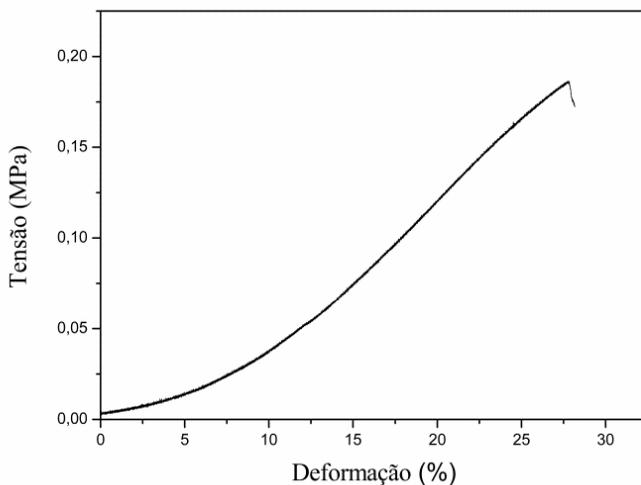
As Figuras 11(b) e (c) mostram detalhes da superfície com alta densidade de nanofibras de celulose bacteriana, referentes à superfície mantida em contato com o ar durante o crescimento bacteriano. Já as Figuras 11(d) e (e) mostram detalhes da superfície porosa da malha de celulose, voltada para a interface submersa no meio de cultivo. Como observado na Figura 11, o vaso de CB produzido neste trabalho apresenta duas superfícies opostas e distintas, que podem ser comparadas com duas regiões também encontradas nos vasos nativos, a túnica íntima, que é a camada em contato com o sangue e possui células endoteliais, e a túnica média, a camada mais espessa e que abriga apenas as células musculares lisas e raros fibroblastos. A microestrutura ou topografia de um biomaterial é de suma importância no desenvolvimento de novo material substituto vascular, podendo influenciar significativamente o comportamento de células animais como na morfologia, na adesão e na mobilidade das células (Dalby, 2005; Dalby *et al.*, 2004).

### 4.1.1 Propriedade Mecânica

De uma maneira geral, os *scaffolds* devem ter resistência mecânica para suportar a neogênese (formação do novo tecido), o manuseio durante a sua aplicação (Iyer *et al.*, 2011) e resistir às forças exercidas no próprio local do implante, como a pressão sanguínea nos vasos.

Ensaio mecânicos nos vasos de CB no estado hidratado (hidrogel de celulose) e previamente tratadas com NaOH 0,1M foram realizados para verificar a tensão de ruptura, o módulo de elasticidade e o alongamento relativo sob tensão antes da ruptura. A Figura 12 mostra uma curva típica de tensão-deformação para os vasos de celulose bacteriana hidratados, quando expostos a uma tensão.

Figura 12: Curvas típicas de tensão-deformação de vasos de CB hidratados (Média de ensaios em triplicata).



Os vasos de CB exibiram alto alongamento relativo sob tensão, antes de romper, tendo a ruptura ocorrido a uma deformação de  $24,5 \pm 2,8$  %. A resistência à ruptura foi de  $0,18 \pm 0,026$  MPa, resultado inferior à resistência à ruptura observado para membranas secas de celulose bacteriana, que apresentam uma tensão à ruptura de  $32 \pm 5$  MPa (Rambo *et al.*, 2008), exibindo no entanto um coeficiente de alongação

inferior, de 3,4%. A resistência à tração de membranas de CB secas, tratadas com NaOH, é inferior à de membranas de CB não tratadas, que é de 65 MPa (George *et al.*, 2005). No entanto, essa tensão de ruptura de  $0,18 \pm 0,026$  MPa é similar às relatadas em outros trabalhos descritos na literatura para celulose bacteriana produzida no formato tubular e hidratada, onde foram encontrados resultados próximos a 0,4 MPa (Bodin *et al.*, 2007) ou 0,59 MPa (Putra *et al.*, 2008) com alongamentos de 30% e 28%, respectivamente. O módulo de elasticidade de Young, de  $0,01 \pm 0,003$  MPa, também está de acordo com resultados de vasos obtidos de celulose bacteriana, relatados na literatura como 0,02 MPa (Putra *et al.*, 2008) e  $0,59 \pm 1,2$  MPa (Bäckdahl *et al.*, 2006). Quando se compara os valores de ruptura de vasos nativos com os do vaso de CB produzido neste trabalho, têm-se valores compatíveis, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2: Pressão de ruptura (Latimer *et al.*, 2014) e tensão à ruptura (Niklason *et al.*, 1999) de vasos sanguíneos humanos, e tensão à ruptura para vasos de celulose bacteriana produzidos neste trabalho.

Vasos	Tensão à ruptura (MPa)
Celulose Bacteriana	$0,180 \pm 0,026$
Vasos nativos	$0,224 \pm 0,041$
Vasos humanos	Pressão de ruptura (MPa)
Artéria femoral profunda	$0,071 \pm 0,030$
Artéria femoral	$0,057 \pm 0,027$
Artéria ilíaca	$0,061 \pm 0,033$
Artéria renal	$0,064 \pm 0,030$
Artéria esplênica	$0,022 \pm 0,007$
Artéria pulmonar	$0,043 \pm 0,024$
Veia pulmonar	$0,047 \pm 0,024$

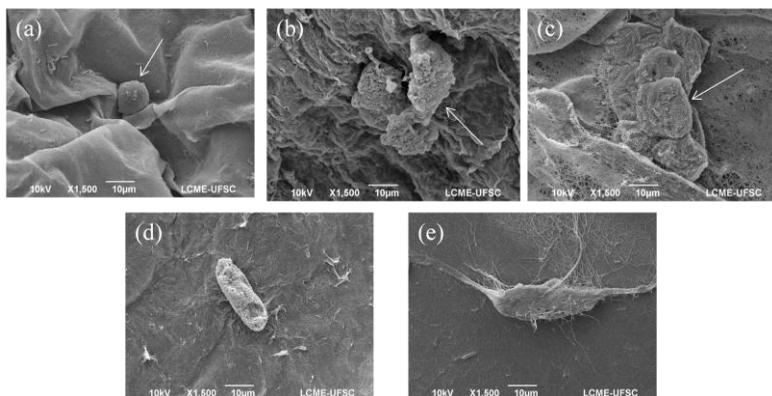
Quanto à menor força medida para as membranas tratadas com NaOH pode-se atribuí-la ao comportamento de intumescimento, durante inchamento das fibras de celulose, que ao quebrar as ligações intermoleculares entre as fibras, resulta em um aumento da tensão interna produzido pela absorção. Devido ao inchaço, a ordenação das fibras é reduzida e isto pode contribuir para a redução da resistência mecânica. Amostras testadas no estado hidratado também exibem redução nas propriedades mecânicas devido à redução da organização e ao aumento das ligações de hidrogênio entre a água e as fibras (Mantanis *et al.*, 1995). Esses dois fatores contribuem para a redução das propriedades mecânicas dos vasos de CB desenvolvidos nesse

trabalho quando comparados com membranas de CB secas, porém com resistência suficiente para suportar a pressão fisiológica.

#### 4.2 ADESÃO, VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS VASOS DE CELULOSE BACTERIANA

Com o objetivo de investigar a adesão celular nos vasos de celulose bacteriana, células aórticas musculares lisas (HASMCs) foram semeadas no lúmen do vaso produzido, sobre a superfície densa, tendo os vasos sido girados a cada hora, por 10 horas, para promover um espalhamento homogêneo das células. Uma ferramenta muito valiosa para investigar a adesão e morfologia celular no biomaterial é a microscopia eletrônica de varredura. Porém, uma etapa crítica na utilização desta ferramenta compreende a preparação da amostra, nas quais a secagem deve ser realizada sem que haja qualquer mudança estrutural (Slížová *et al.*, 2003). Previamente todas as amostras foram fixadas com glutaraldeído. O glutaraldeído é um fixador que reage com os grupos amino dos aminoácidos das proteínas que constituem as células e as fixa sobre a membrana de celulose, garantido sua permanência no biomaterial para as demais etapas de análise (Lee e Chow, 2012). As amostras fixadas foram desidratadas com séries de soluções de etanol (30%, 40%, 70%, 80%, 90% e 100% v/v) e mantidas em etanol a 100%, seguidas pela desidratação por ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Esta metodologia apresentou bons resultados na secagem e manutenção da morfologia celular, corroborando relatos de trabalhos anteriores (Berti, 2012).

Figura 13: Adesão e morfologia de células musculares lisas humanas (HASMCs) cultivadas no interior dos vasos de celulose bacteriana e secas através da técnica do ponto crítico de CO<sub>2</sub>, e analisadas em diferentes dias de cultura celular: 24, 48, 72 horas, 7 e 14 dias.

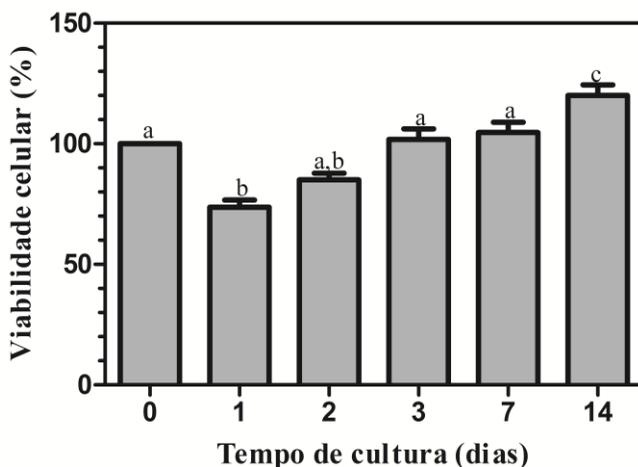


Nas imagens de MEV (Figura 13) nota-se a presença de cristais precipitados, que podem ser atribuídos à solução tampão (PBS) utilizada nas etapas de fixação e secagem das amostras biológicas, para proporcionar a manutenção de pH neutro e manter as células na sua forma normal. Também pode-se perceber a existência de rachaduras na superfície de algumas células, provavelmente devido ao fato de a técnica de secagem de ponto crítico de CO<sub>2</sub> ter sido realizada rapidamente, o que pode ter provocado rompimento na membrana celular. Como pode ser visto na Figura 13(a), as HASMCs após 24 horas de cultivo apresentaram morfologia arredondada, típico de células pouco ou recém aderidas; já em 48 e 72 horas de cultivo (Figuras 13(b) e (c)), observa-se que as células proliferaram e alteraram o perfil de adesão para uma morfologia espalhada, indicando uma melhor adesão celular sobre a celulose. Nos tempos de 7 e 14 dias de cultivo, Figuras 13(d) e (e) tem-se células alongadas; em especial, no 14º dia observa-se a presença de projeções de miofibrilas de actina (Mironov *et al.*, 1995), indicando boa aderência e adaptação sobre a celulose.

Como descrito nas metodologias utilizadas, o ensaio colorimétrico do MTS foi utilizado para avaliação quantitativa da viabilidade celular em função do tempo de cultura estática. A Figura 14 mostra os resultados do ensaio de MTS para as HASMCs semeadas nos vasos de CB. Neste ensaio, a atividade mitocondrial foi avaliada no

tempo inicial ( $t = 0$ ) e após 1, 2, 3, 7 e 14 dias de cultura. O tempo de duplicação típico das HASMCs em placas de cultura em condição estática pode variar de 48 a 120 horas (Fager *et al.*, 1988).

Figura 14: Análise quantitativa de MTS da viabilidade de células musculares lisas (HASMCs) cultivadas nos vasos de celulose bacteriana em função do tempo de cultura. Resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão. As barras com mesma letra indicam que não diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) entre si, utilizando-se variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey.



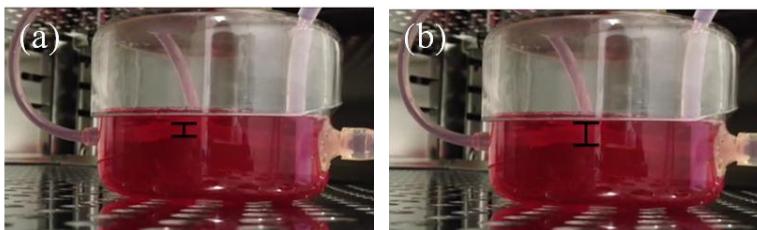
No primeiro dia de cultura, o número de células viáveis foi menor do que o número de células semeadas ( $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>), indicando que 73% das células semeadas aderiram ao vaso de CB; no entanto, no 2º dia uma fase de proliferação celular pode ser observada, atingindo no 3º dia aproximadamente a mesma quantidade de células semeadas, e permanecendo praticamente constante até o 7º dia. Por fim, até o 14º dia houve uma lenta proliferação celular, atingindo uma proliferação 37% maior do que as células aderidas no primeiro dia. Como visto no estudo de adesão por MEV, no 14º dia tem-se células bem adaptadas e expressando componentes da matriz extracelular, presentes no citoesqueleto. A avaliação da viabilidade celular mostrou que as células HASMCs mantêm-se viáveis após 14 dias de cultivo, e um estágio estacionário de crescimento foi observado entre o 3º e 7º dia.

### 4.3 REATOR BIOLÓGICO TECIDUAL MUSCULAR

As propriedades biológicas e mecânicas dos vasos sanguíneos são determinadas pela estrutura anatômica da parede vascular e do meio fisiológico circundante. Portanto, o desenvolvimento um enxerto vascular semeado com HASMCs mimetizando fisiologicamente essas características é de fundamental importância.

As HASMCs semeadas e cultivadas nos vasos de CB sob condições estática e pulsante de escoamento no sistema de fluxo pulsante foram avaliadas para o desenvolvimento de uma camada semelhante à túnica média vascular encontrada nos vasos nativos. Em ambas as condições, dinâmica ou estática, os vasos foram inicialmente cultivados durante sete dias em condições estáticas, para garantir a adesão e proliferação celular, seguido por mais sete dias de cultura dinâmica, acompanhada como controle por um vaso em condição estática. Macroscopicamente, os vasos exibiram uma boa integridade, sem deformação durante os 14 dias de cultura no sistema de fluxo pulsante (Figura 15).

Figura 15: Sistema de fluxo pulsante para cultura do vaso de celulose bacteriana celularizado com HASMCs (a) Imagem do reator com o vaso no seu tamanho original; (b) imagem do reator com o vaso na maior extensão, proporcionada pela pressão gerada pela bomba peristáltica.

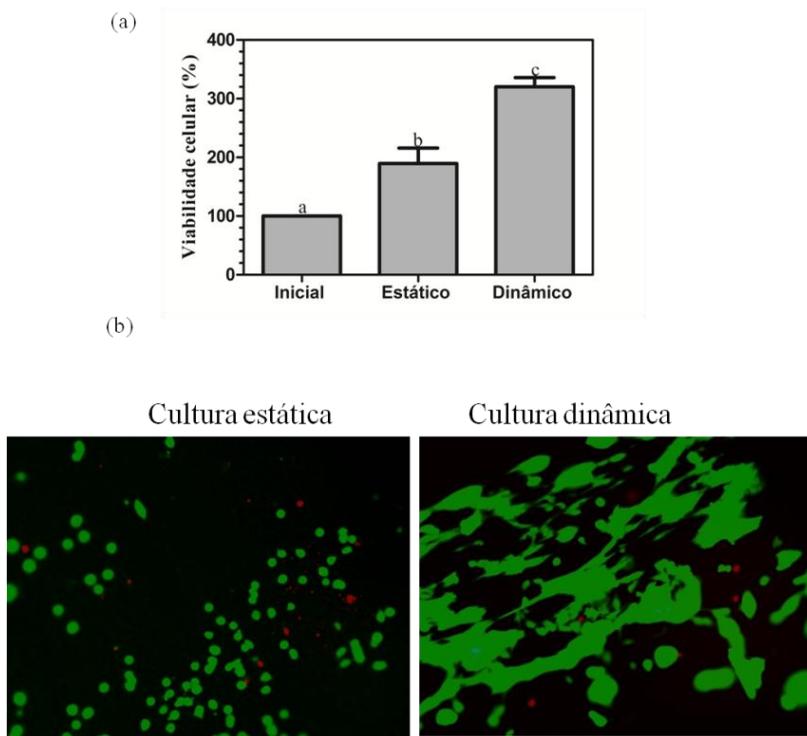


O suporte tubular, peça central do biorreator, apresentou boa elasticidade, como pode ser observado na Figura15(b), que mostra que a parede do vaso pode recuperar a sua forma original (Figura15a), repetidamente com o fluxo pulsante. O vaso de CB foi capaz de estender 56% seu diâmetro original com a pressão exercida pela bomba peristáltica.

Os resultados de viabilidade e proliferação celular determinados quantitativamente por ensaio com MTS demonstram um crescimento celular nos vasos de CB tanto em cultura estática quanto em cultura dinâmica, o que pode ser demonstrado comparando-se a quantidade de células inicialmente semeadas ( $1,2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) com o número de células observado ao final dos 14 dias de cultivo. Os números de células nos vasos de CB sob fluxo pulsante durante 14 dias foram significativamente maiores do que na cultura estática (Figura 16a), praticamente o dobro de células, o que é corroborado pelos resultados de Zhang e colaboradores, que demonstraram um crescimento superior de células musculares sob condição dinâmica quando comparado com condições estáticas (Zhang *et al.*, 2009).

Comparando-se o método quantitativo do MTS com o método qualitativo do Live/Dead<sup>®</sup> é possível observar que nas duas condições de cultura tem-se mais células viáveis (coradas de verde) após os 14 dias de cultura do que células mortas (coradas em vermelho) presentes nas amostras; porém, em condição estática temos um maior número de células mortas comparadas com a condição dinâmica, cerca de 83% a mais na região avaliada (Figura 16b).

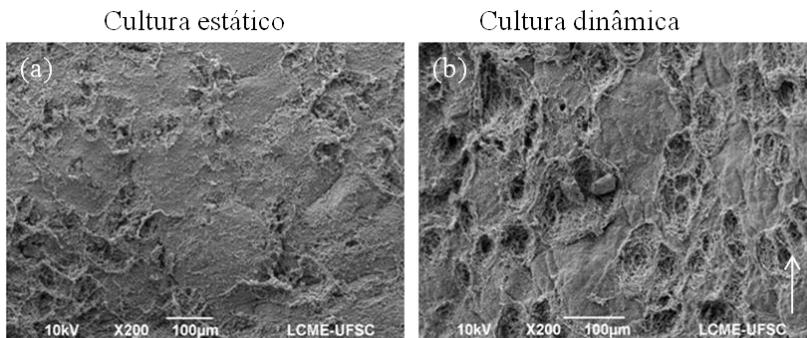
Figura 16: Análise quantitativa e qualitativa da viabilidade de células musculares lisas (HASMCs) cultivadas no interior dos vasos de celulose bacteriana em função do tempo de cultura, através da utilização das técnicas de (a) MTS. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; barras com mesma letra indicam que os resultados não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) segundo análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey; (b) Live/Dead<sup>®</sup>, células vivas coradas de verde e células mortas coradas de vermelho.



Quanto à adesão e morfologia celular nos vasos de CB, uma cobertura da superfície luminal com HASMCs foi observada a partir de imagens de MEV para os vasos no 14<sup>o</sup> dia (Figura 17). Além disso, HASMCs apresentaram um alinhamento em direção paralela à direção de fluxo. A superfície luminal do vaso foi exposta no sistema de fluxo pulsante (Figura 17b). Isto é um bom indício da adaptação das células ao regime de fluxo dinâmico, que mimetiza o encontrado no meio vascular

natural. Em contraste, uma confluência das HASMCs orientadas aleatoriamente foi observada nos vasos em cultura estática (Figura 17a).

Figura 17: Imagem de MEV das HASMCs semeadas sobre a superfície luminal dos vasos de celulose bacteriana. (a) HASMCs cultivadas em condição estática; (b) HASMCs cultivadas em condição dinâmica de fluxo pulsante (A direção do fluxo está indicada pela seta branca, vertical).



O alongamento celular nos vasos sob condição pulsante em comparação com a cultura estática é considerado como uma característica contrátil, essencial para células musculares em vasculatura do sistema circulatório (Zhang *et al.*, 2009). Assim, o vaso de celulose bacteriana em condições dinâmicas constitui uma plataforma adequada para o cultivo de células musculares humanas, conferindo às mesmas um fenótipo típico de células musculares em vasos sanguíneos nativos, conforme as observações até aqui realizadas.

O reator biológico tecidual muscular de celulose bacteriana é, portanto, a base de uma plataforma promissora para o desenvolvimento de vasos sanguíneos, para estudos fisiopatológicos de interesse, desde aterosclerose até aneurismas e intervenções terapêuticas. Por permitir a formação de uma monocamada celular confluenta que responde ao estímulo dinâmico, o reator de fluxo pulsante abre assim a possibilidade de utilização deste material para diversas aplicações como, por exemplo: possível vaso sanguíneo artificial para implante, ou recobrimento de vasos nativos para aumentar a vida útil do mesmo, modelos para testes de drogas vasoativas, estudos de fatores que ocasionam a aterosclerose, modelo para implante de próteses endovasculares (*stents*), simulação de procedimentos minimamente invasivos para calibração e treinamentos de robôs cirúrgicos.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

### 5.1 CONCLUSÕES

Nos últimos anos a aplicação da celulose bacteriana como biomaterial na área biomédica tem atraído muita atenção, devido às suas propriedades e sua biocompatibilidade *in vivo*. Neste trabalho foram desenvolvidos ensaios para a produção, caracterização e celularização dos vasos sanguíneos artificiais de celulose bacteriana e posterior desenvolvimento de um reator biológico tecidual muscular, acoplado a um sistema de fluxo pulsante.

Em síntese, podemos concluir que:

1. Vasos de celulose bacteriana podem ser produzidos com diâmetros e comprimentos variados, com duas superfícies distintas, uma densa (interior do vaso ou lúmen) e outra porosa (lado exterior), semelhante às túnicas encontradas nos vasos nativos, com propriedades mecânicas adequadas quando comparadas com vasos naturais humanos;
2. Vasos de celulose bacteriana de 4 mm foram celularizados com HASMCs e cultivados durante 14 dias com sucesso, mantendo a viabilidade e proliferação celular durante todo o teste; a avaliação da adesão celular indicou boa aderência celular sobre a celulose bacteriana;
3. Um sistema de fluxo pulsante foi desenvolvido em vidro, acoplado à mangueira de silicone e uma bomba peristáltica, o que possibilitou a exposição dos vasos de celulose bacteriana celularizados a um fluxo sanguíneo fisiologicamente mimético;
4. Um reator biológico tecidual muscular foi obtido com os vasos de celulose bacteriana celularizados com células de aorta humana de músculo liso (HASMCs) e exposto ao sistema de fluxo pulsante durante sete dias, sob condição dinâmica. As células na condição dinâmica apresentaram um alinhamento ao fluxo, típico de células musculares em ambiente natural, e uma viabilidade celular superior à condição estática.

## 5.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para continuidade deste trabalho, sugere-se explorar os seguintes aspectos:

1. Vasos de celulose bacteriana colonizados com células endoteliais no interior e muscular lisa no exterior para mimetizar a túnica íntima e média dos vasos nativos, para estudo de proteínas importantes e biologia celular da co-cultura e quando expostas a uma condição dinâmica pulsante, já que comprovadamente a interação entre estas duas linhagens celulares pode modular a manutenção do endotélio vascular;
2. Aprofundar estudos de trombogenicidade da celulose bacteriana, já que este é um critério importante para o desenvolvimento de um biomaterial que estará em contato com o sangue, quando implantado;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALOBALD, N.; SALACINSKI, H. J.; SALES, K. M.; RAMESH, B.; KANNAN, R. Y.; HAMILTON, G.; SEIFALIAN, A. M. Nanocomposite Containing Bioactive Peptides Promote Endothelialisation by Circulating Progenitor Cells: An In vitro Evaluation. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 32, n. 1, p. 76-83, 2006.
- ASAKURA, T.; KARINO, T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. **Circulation Research**, v. 66, n. 4, p. 1045-66, April 1, 1990 1990.
- BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.
- BALCELLS, M.; EDELMAN, E. R. Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 191, n. 2, p. 155-161, 2002.
- BARBEE, K. A.; DAVIES, P. F.; LAL, R. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. **Circulation Research**, v. 74, n. 1, p. 163-71, January 1, 1994 1994.
- BARBEE, K. A.; MUNDEL, T.; LAL, R.; DAVIES, P. F. Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 4, p. H1765-H1772, 1995.
- BARRON, V.; LYONS, E.; STENSON-COX, C.; MCHUGH, P. E.; PANDIT, A. Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 31, n. 9, p. 1017-1030, 2003/10/01 2003.
- BERTI, F. V. **Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em Scaffolds de celulose bacteriana**. 2012. (Doutorado ). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis -SC.
- BERTI, F. V.; RAMBO, C. R.; DIAS, P. F.; PORTO, L. M. Nanofiber density determines endothelial cell behavior on hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4684-4691, 2013.
- BODIN, A.; BÄCKDAHL, H.; FINK, H.; GUSTAFSSON, L.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Influence of cultivation conditions on mechanical and

- morphological properties of bacterial cellulose tubes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 425-434, 2007.
- BORZANI, W.; SOUZA, S. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1271-1272, 1995/11/01 1995.
- BOURGET, J.-M.; GAUVIN, R.; LAROUCHE, D.; LAVOIE, A.; LABBÉ, R.; AUGER, F. A.; GERMAIN, L. Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 36, p. 9205-9213, 2012.
- BRAY, D. F.; BAGU, J.; KOEGLER, P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. **Microscopy Research and Technique**, v. 26, n. 6, p. 489-495, 1993.
- CAMPBELL, J. H.; EFENDY, J. L.; CAMPBELL, G. R. Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity. **Circulation Research**, v. 85, n. 12, p. 1173-1178, December 3, 1999 1999.
- CARRIER, R. L.; PAPADAKI, M.; RUPNICK, M.; SCHOEN, F. J.; BURSAC, N.; LANGER, R.; FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. **Biotechnology and bioengineering**, v. 64, n. 5, p. 580-589, 1999.
- CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.-L.; CARO, G.; MONDRAGON, I.; GAÑÁN, P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 96-102, 2011.
- CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, p. 48, 2004.
- CONKLIN, B. S.; RICHTER, E. R.; KREUTZIGER, K. L.; ZHONG, D. S.; CHEN, C. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. **Medical Engineering & Physics**, v. 24, n. 3, p. 173-183, 2002.
- CUMMINGS, C. L.; GAWLITTA, D.; NEREM, R. M.; STEGEMANN, J. P. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen–fibrin mixtures. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3699-3706, 2004.

- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, n. 3-4, p. 403-411, 2004/09/01 2004.
- CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2007/01/01 2006.
- DAHMAN, Y.; JAYASURIYA, K.; KALIS, M. Potential of Biocellulose Nanofibers Production from Agricultural Renewable Resources: Preliminary Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1647-1659, 2010/11/01 2010.
- DALBY, M. J. Topographically induced direct cell mechanotransduction. **Medical Engineering & Physics**, v. 27, n. 9, p. 730-742, 2005.
- DALBY, M. J.; RIEHLE, M. O.; SUTHERLAND, D. S.; AGHELI, H.; CURTIS, A. S. G. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 159-169, 2004.
- DAVIES, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. **Physiological reviews**, v. 75, n. 3, p. 519, 1995.
- DAVIES, P. F.; REMUZZI, A.; GORDON, E. J.; DEWEY, C. F.; GIMBRONE, M. A. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 7, p. 2114-2117, April 1, 1986 1986.
- DE SOUZA, F. C.; OLIVAL-COSTA, H.; DA SILVA, L.; PONTES, P. A.; LANCELLOTTI, C. L. P. Bacterial Cellulose as Laryngeal Medialization Material: An Experimental Study. **Journal of Voice**, v. 25, n. 6, p. 765-769, 2011.
- DEPAOLA, N.; GIMBRONE, M. A.; DAVIES, P. F.; DEWEY, C. F. Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 12, n. 11, p. 1254-7, November 1, 1992 1992.
- DEWEY, C. F.; BUSSOLARI, S. R.; GIMBRONE, M. A.; DAVIES, P. F. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. **Journal of biomechanical engineering**, v. 103, n. 3, p. 177-185, 1981.

- FAGER, G.; HANSSON, G. K.; OTTOSSON, P.; DAHLLÖF, B.; BONDJERS, G. Human arterial smooth muscle cells in culture: Effects of platelet-derived growth factor and heparin on growth in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 176, n. 2, p. 319-335, 1988.
- FINK, H. **Artificial blood vessels Studies on endothelial cell and blood interactions with bacterial cellulose**. 2009. (Doctoral ). Department of Surgery - Institute of Clinical Sciences, University of Gothenburg, Göteborg- Sweden.
- FLAHERTY, J. T.; PIERCE, J. E.; FERRANS, V. J.; PATEL, D. J.; TUCKER, W. K.; FRY, D. L. Endothelial Nuclear Patterns in the Canine Arterial Tree with Particular Reference to Hemodynamic Events. **Circulation Research**, v. 30, n. 1, p. 23-33, January 1, 1972 1972.
- FONTANA, J. D.; SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, n. 1, p. 253-264, 1990/03/01 1990.
- FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Tissue engineering bioreactors. **Principles of tissue engineering**, v. 2, p. 143-156, 2000.
- FREED, L. E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. **Culture environments: cell-polymer-bioreactor systems**. Academic Press, San Diego, 2002.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Elsevier, 2007.
- GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHY, S. N.; BAWA, A. S. Physico-Mechanical Properties of Chemically Treated Bacterial (Acetobacter xylinum) Cellulose Membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8-9, p. 1323-1327, 2005/12/01 2005.
- HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, n. 2, p. 431-438, 2006.
- HOERSTRUP, S. P.; ZÜND, G.; SODIAN, R.; SCHNELL, A. M.; GRÜNENFELDER, J.; TURINA, M. I. Tissue engineering of small caliber vascular grafts. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 20, n. 1, p. 164-169, July 1, 2001 2001.

- HOSHI, R. A.; VAN LITH, R.; JEN, M. C.; ALLEN, J. B.; LAPIDOS, K. A.; AMEER, G. The blood and vascular cell compatibility of heparin-modified ePTFE vascular grafts. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 30-41, 2013.
- HU, J.-J.; CHAO, W.-C.; LEE, P.-Y.; HUANG, C.-H. Construction and characterization of an electrospun tubular scaffold for small-diameter tissue-engineered vascular grafts: A scaffold membrane approach. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 13, n. 0, p. 140-155, 2012.
- HUANG, Y.; ZHU, C.; YANG, J.; NIE, Y.; CHEN, C.; SUN, D. Recent advances in bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2014/02/01 2014.
- IYER, R. K.; CHIU, L. L.; REIS, L. A.; RADISIC, M. Engineered cardiac tissues. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 706-714, 2011.
- JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica-texto e atlas:Tecido muscular**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 2008.
- KESHK, S. M.; RAZEK, T. M.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 17, 2006.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.
- KU, D. N.; GIDDENS, D. P.; ZARINS, C. K.; GLAGOV, S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 5, n. 3, p. 293-302, May 1, 1985 1985.
- KUMAR, S. T.; KRISHNAN, L. K. A stable matrix for generation of tissue-engineered nonthrombogenic vascular grafts. **Tissue engineering**, v. 8, n. 5, p. 763-770, 2002.
- L'HEUREUX, N.; PÂQUET, S.; LABBÉ, R.; GERMAIN, L.; AUGER, F. A. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. **The FASEB Journal**, v. 12, n. 1, p. 47-56, January 1, 1998 1998.
- LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Principles of tissue engineering**. Academic press, 2011.
- LATIMER, C. A.; NELSON, M.; MOORE, C. M.; MARTIN, K. E. Effect of collagen and elastin content on the burst pressure of human blood vessel

- seals formed with a bipolar tissue sealing system. **Journal of Surgical Research**, v. 186, n. 1, p. 73-80, 2014.
- LEE, J. T. Y.; CHOW, K. L. SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. **Scanning**, v. 34, n. 1, p. 12-25, 2012.
- LEE, P.-H.; TSAI, S.-H.; KUO, L.; HWANG, C.-Y.; KUO, C.-Y.; YANG, V. C.; CHEN, J.-K. A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3342-3348, 2012.
- LEVENBERG, S.; GOLUB, J. S.; AMIT, M.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; LANGER, R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 7, p. 4391-4396, April 2, 2002 2002.
- MANTANIS, G. I.; YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. **Cellulose**, v. 2, n. 1, p. 1-22, 1995/03/01 1995.
- MCCLENDON, M. T.; STUPP, S. I. Tubular hydrogels of circumferentially aligned nanofibers to encapsulate and orient vascular cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 23, p. 5713-5722, 2012.
- MEINHART, J. G.; SCHENSE, J. C.; SCHIMA, H.; GORLITZER, M.; HUBBELL, J. A.; DEUTSCH, M.; ZILLA, P. Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts precoated with RGD-cross-linked fibrin. **Tissue engineering**, v. 11, n. 5-6, p. 887-895, 2005.
- MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control Geneva: World Health Organization. 2011.
- MIRONOV, A. A.; REKHTER, M. D.; KOLPAKOV, V. A.; ANDREEVA, E. R.; POLISHCHUK, R. S.; BANNYKH, S. I.; FILIPPOV, S. V.; PERETJATKO, L. P.; KULIDA, L. V.; OREKHOV, A. N. Heterogeneity of smooth muscle cells in embryonic human aorta. **Tissue and Cell**, v. 27, n. 1, p. 31-38, 1995.
- MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. **Iran J Biotechnol**, v. 9, p. 94-101, 2011.
- NAKAGAITO, A. N.; NOGI, M.; YANO, H. Displays from transparent films of natural nanofibers. **MRS bulletin**, v. 35, n. 03, p. 214-218, 2010.

- NGUYEN, V. T.; GIDLEY, M. J.; DYKES, G. A. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 471-478, 2008.
- NIKLASON, L. E.; GAO, J.; ABBOTT, W. M.; HIRSCHI, K. K.; HOUSER, S.; MARINI, R.; LANGER, R. Functional Arteries Grown in Vitro. **Science**, v. 284, n. 5413, p. 489-493, April 16, 1999 1999.
- OLIVEIRA, V. A.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Production and in vitro degradation of bacterial cellulose tubular structures. **Polímeros**, v. 23, n. 4, p. 559-564, 2013.
- PARK, J.; PARK, Y.; JUNG, J. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* PJK isolated from rotten apple. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 2, p. 83-88, 2003/04/01 2003.
- PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277-1286, 2011/09/01 2011.
- PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, n. 5963, p. 30-33, 1984.
- POURRAMEZAN, G.; ROAYAEI, A.; QEZELBASH, Q. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. **Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 150-154, 2009.
- PUTRA, A.; KAKUGO, A.; FURUKAWA, H.; GONG, J. P.; OSADA, Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. **Polymer**, v. 49, n. 7, p. 1885-1891, 2008.
- RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 549-554, 2008.
- RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; BERTI, F. V.; CARMINATTI, C. A.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 151-157, 2011.
- REMUZZI, A.; MANTERO, S.; COLOMBO, M.; MORIGI, M.; BINDA, E.; CAMOZZI, D.; IMBERTI, B. Vascular smooth muscle cells on hyaluronic

- acid: culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct. **Tissue engineering**, v. 10, n. 5-6, p. 699-710, 2004.
- RICHARDSON, T. P.; PETERS, M. C.; ENNETT, A. B.; MOONEY, D. J. Polymeric system for dual growth factor delivery. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 1029-1034, 2001.
- ROEDER, R.; WOLFE, J.; LIANAKIS, N.; HINSON, T.; GEDDES, L. A.; OBERMILLER, J. Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, n. 1, p. 65-70, 1999.
- SAIBUATONG, O.-A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 455-460, 2010.
- SALTZMAN, W. M. **Biomedical engineering: bridging medicine and technology**. Cambridge University Press, 2009.
- SANI, A.; DAHMAN, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 151-164, 2010.
- SEFTON, M. V.; GEMMELL, C. H.; GORBET, M. B. What really is blood compatibility? **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 11, n. 11, p. 1165-1182, 2000.
- SELIKTAR, D.; BLACK, R.; VITO, R.; NEREM, R. Dynamic Mechanical Conditioning of Collagen-Gel Blood Vessel Constructs Induces Remodeling In Vitro. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 28, n. 4, p. 351-362, 2000/04/01 2000.
- SHAREFKIN, J. B.; LATKER, C. H.; D'AMORE, P. A.; TRINIDAD-VASQUEZ, M.; RICH, N. M. Seeding of dacron vascular prostheses with endothelium of aortic origin. **Journal of Surgical Research**, v. 34, n. 1, p. 33-43, 1983.
- SHUM-TIM, D.; STOCK, U.; HRKACH, J.; SHINOKA, T.; LIEN, J.; MOSES, M. A.; STAMP, A.; TAYLOR, G.; MORAN, A. M.; LANDIS, W.; LANGER, R.; VACANTI, J. P.; MAYER JR, J. E. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 68, n. 6, p. 2298-2304, 1999.
- SIKAVITSAS, V. I.; BANCROFT, G. N.; MIKOS, A. G. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 1, p. 136-148, 2002.

- SLÍŽOVÁ, D.; KRS, O.; POSPÍŠILOVÁ, B. Alternative Method of Rapid Drying Vascular Specimens for Scanning Electron Microscopy. **Journal of Endovascular Therapy**, v. 10, n. 2, p. 285-287, 2003/04/01 2003.
- STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 8, p. 4739-4745, 2013.
- SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.
- TURNER, N. J.; KIELTY, C. M.; WALKER, M. G.; CANFIELD, A. E. A novel hyaluronan-based biomaterial (Hyaff-11®) as a scaffold for endothelial cells in tissue engineered vascular grafts. **Biomaterials**, v. 25, n. 28, p. 5955-5964, 2004.
- TUTTOLOMONDO, A.; DI RAIMONDO, D.; PECORARO, R.; ARNAO, V.; PINTO, A.; LICATA, G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 28, p. 4266-4288, 2012.
- UNSWORTH, B. R.; LELKES, P. I. Growing tissues in microgravity. **Nature medicine**, v. 4, n. 8, p. 901-907, 1998.
- WAN, W.; HUTTER, J.; MILLON, L.; GUHADOS, G. Bacterial cellulose and its nanocomposites for biomedical applications. **Cellulose nanocomposites: Processing, characterization, and properties**, v. 938, p. 221-241, 2006.
- WANG, C.; CEN, L.; YIN, S.; LIU, Q.; LIU, W.; CAO, Y.; CUI, L. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 621-630, 2010.
- WATANABE, M.; SHIN'OKA, T.; TOHYAMA, S.; HIBINO, N.; KONUMA, T.; MATSUMURA, G.; KOSAKA, Y.; ISHIDA, T.; IMAI, Y.; YAMAKAWA, M. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. **Tissue engineering**, v. 7, n. 4, p. 429-439, 2001.
- WEINBERG, C.; BELL, E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. **Science**, v. 231, n. 4736, p. 397-400, January 24, 1986 1986.

- WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials.** Liverpool University Press, 1999.
- YILDIZ, O. Vascular Smooth Muscle and Endothelial Functions in Aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, n. 1, p. 353-360, 2007.
- ZAHEDMANESH, H.; MACKLE, J.; SELLBORN, A.; DROTZ, K.; BODIN, A.; GATENHOLM, P.; LALLY, C. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: mechanical characterization and constitutive model development. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 97, n. 1, p. 105-113, 2011.
- ZHANG, X.; WANG, X.; KESHAV, V.; WANG, X.; JOHANAS, J. T.; LEISK, G. G.; KAPLAN, D. L. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3213-3223, 2009.