



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO – CTC  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – EQA

GUILHERME COLLA

ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA  
TECIDUAL VASCULAR

Florianópolis  
2018



GUILHERME COLLA

**ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA  
TECIDUAL VASCULAR**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutor em  
Engenharia Química  
Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques  
Porto

Florianópolis  
2018

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

Colla, Guilherme

ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE BACTERIANA  
PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR /  
Guilherme Colla ; orientador, Luismar Marques  
Porto , 2018.

117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanocelulose  
bacteriana. 3. Hemocompatibilidade. 4. Biorreator  
de fluxo pulsante. 5. Engenharia tecidual. I.  
Marques Porto , Luismar. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química. III. Título.

GUILHERME COLLA

**ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA  
TECIDUAL VASCULAR**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 12 de março de 2018.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Presidente/Orientador  
UFSC/PósENQ

---

Dr<sup>a</sup>. Janice Koepf  
Membro externo  
BioCellTis

---

Prof. Dr. Luciano H. Campestrini  
Membro externo  
UFSC/BQA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. María Gabriela Paraje  
Membro externo  
Universidad Nacional de Córdoba  
Argentina



Dedico este trabalho aos meus pais,  
Maria de Lurdes e Germano (*in  
memoriam*) e ao meu irmão,  
Edenilson.



## AGRADECIMENTOS

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.

Ao Professor Luismar Marques Porto pela orientação, ensinamentos e amizade.

À Dra Ayumi Aurea Miyakawa do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP), que gentilmente cedeu as células utilizadas neste trabalho.

À minha amiga irmã Emily que atura meu mau humor diário, mas mesmo assim está sempre ao meu lado.

Ao farmacêutico e amigo Fabricio P. F. de Mello que inúmeras vezes me chamou atenção “e a cascata complemento?”, além de coletar o sangue para os testes de hemocompatibilidade.

A todo o grupo do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab): Andrea, Karina, Fernanda, Julia, Maíra, Maick, Kathleen, Camila Schroeder, Karla, Camila Quinetti, Samara pelo companheirismo.

Aos inúmeros amigos que participaram nesta etapa, principalmente à Tuane, Ana Paula Ruani, Rafaela Stock, Juliana Dreyer, Francielly Cesconetto, Priscila, Winie, Allisson, Larissa, Dj Kadhiny, Erich e André Bezerra.

À toda equipe do LCME, pelas análises de MEV, principalmente à Eliana de M. Oliveira e Américo Cruz.

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

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.

Quando acordei hoje de manhã, eu sabia quem eu era, mas acho que já mudei muitas vezes desde então (Lewis Carroll, 1865).

## RESUMO

### Estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana para aplicações em engenharia tecidual vascular

As doenças do aparelho circulatório são as principais causas de mortalidade no mundo. A principal característica das doenças cardiovasculares é a presença da aterosclerose, acúmulo de placas de gorduras nas artérias que impede a passagem do sangue. Na clínica, o tratamento da aterosclerose é realizado através de um *bypass*, e o enxerto autólogo é a prótese preferida para enxertos vasculares de pequeno calibre. Quando estes vasos não estão disponíveis, devido à progressão natural da doença ou por consecutivas cirurgias, a alternativa passa, geralmente, pelo uso de próteses heterólogas ou sintéticas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo a biossíntese de estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana (BNC) de pequeno calibre produzidas pela bactéria *Komagataeibacter hansenii*, além da modificação da BNC com o anticoagulante heparina (BNC-Hep). A BNC-Hep apresentou sua compatibilidade com o sangue melhorada em todos os testes de hemocompatibilidade realizados para cascata de coagulação e dentro da normalidade para a cascata complemento. Nos ensaios de cultura celular in vitro das células musculares lisas e endoteliais de aorta humana a BNC e BNC-Hep demonstraram capacidade de suportar a colonização celular, tendo as células permanecido viáveis após 7 dias de cultura. As estruturas tubulares de BNC-Hep colonizada por 8 dias estaticamente, seguiram para um reator de fluxo pulsante, onde permaneceram por mais sete dias em condição dinâmica. 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 sistema mimetiza aquele encontrado no sistema vascular natural. As células mantiveram seu fenótipo maduro e contrátil confirmados por imunocitoquímica. O sistema de fluxo pulsante mais a estrutura tubular celularizada constituem uma plataforma para aplicações como biorreator de fluxo pulsante, permitindo ensaios com células e outros agentes terapêuticos, através de interações com as células que respondem à estimulação dinâmica de fluxo pulsante.

**Palavras-chave:** Nanocelulose bacteriana. Biorreator de fluxo pulsante. Hemocompatibilidade. Engenharia tecidual.



## ABSTRACT

### Tubular structures of bacterial nanocellulose for vascular tissue engineering applications

Diseases of the circulatory system are the main cause of mortality in the world. Cardiovascular diseases are mostly characterized by presence of atherosclerosis, and accumulation of fat plaques in the arteries that prevents the passage of blood. The treatment at the clinics for atherosclerosis is by a bypass with autologous grafting as the preferred prosthesis for small-caliber vascular grafts. When these vessels are unavailable, due to the natural progression of the disease or consecutive surgeries, the alternative is usually the use of heterologous or synthetic prostheses. In this context, the objective of this work was the biosynthesis of small-caliber tubular structures of bacterial nanocellulose (BNC) of produced by the bacterium *Komagataeibacter hansenii*, in addition to the modification of the BNC with the heparin anticoagulant (BNC-Hep). BNC-Hep had its blood compatibility improved in all blood tests that were performed for coagulation cascade and within normality for complement cascade. The in vitro cell culture of smooth and endothelial muscle cells from human aortic in BNC and BNC-Hep, demonstrated their ability to withstand cell colonization, with the cells remaining viable after 7 days of cell culture. The tubular structures of BNC-Hep colonized for 8 days statically, were placed into a pulsing flow reactor, where they remained for another seven days in a dynamic condition. In dynamic culture conditions the cells presented increase viability and proliferation capacity than in the static control, indicating that the cellular environment provided by the system mimics those found in the natural vascular system. Cells maintained their mature and contractile phenotype, and this can be confirmed by the immunocytochemical. The pulsed flow system plus the cellular tubular structure provide a platform for applications as a pulsed flow bioreactor, allowing assays with cells and therapeutic agents, through interactions with the cells that respond to dynamic pulsed flow stimulation.

**Keywords:** Bacterial nanocellulose. Pulsed flow bioreactor. Hemocompatibility. Tissue engineering.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura anatômica das veias e artérias humanas. ....	29
Figura 2: Linha do tempo do desenvolvimento da substituição vascular. ...	35
Figura 3: Cascata clássica da coagulação sanguínea. ....	38
Figura 4: Cascata moderna da coagulação sanguínea, baseada em superfícies celulares. ....	39
Figura 5: Mecanismos envolvidos na cascata complemento. ....	43
Figura 6: Algumas interações conhecidas entre as cascatas coagulação e complemento. ....	44
Figura 7: Estrutura química da unidade de repetição da nanocelulose bacteriana. ....	46
Figura 8: Estrutura química do polissacarídeo linear de heparina indicando a maior unidade de repetição e a sequência de ligação com a trombina. ....	48
Figura 9: Sistema biomimético empregado para aplicação de fluxo dinâmico e condicionamento de construções tubulares. ....	51
Figura 10: Sequência esquemática da produção das membranas e estruturas tubulares de BNC. ....	54
Figura 11: Representação esquemática da reação química de modificação da superfície da BNC com heparina (a) oxidação do carbono 6 na mistura $\text{HNO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaNO}_2$ (b) derivatização dos grupos ácidos com EDC. ....	56
Figura 12: Representação esquemática dos testes de hemocompatibilidade. ....	58
Figura 13: Esquema representativo de funcionamento do Kit ELISA para detecção da proteína C3a da cascata complemento. ....	63
Figura 14: Sistema completo de fluxo pulsante: câmara de cultura, vaso de nanocelulose, reservatório do meio de cultura, tubulações de silicone e bomba peristáltica. ....	66
Figura 15: Fotos de (a) estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana e (b) membranas de nanocelulose bacteriana. ....	70

- Figura 16: (a) Espectroscopia FTIR das membranas BNC e BNC-Hep (b) membrana BNC-Hep (c) membrana BNC-Hep corada com azul de toluidina. ....72
- Figura 17: Resultados de biodegradação obtidos para (a) BNC e (b) BNC-Hep durante 6 semanas de incubação em plasma. (■) massa (mg) (■) glicose (mg/mL) (■) heparina ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). ....74
- Figura 18: Micrografias da BNC e BNC-Hep (a) e (c) tempo zero da biodegradação (b) e (d) após seis semanas de biodegradação.....75
- Figura 19: Imagens de MEV das plaquetas e eritrócitos provenientes do plasma rico em plaquetas com ampliações de 300 $\times$ , 1000 $\times$  e 5000 $\times$  aderidas sobre BNC, BNC-Hep nos seus diferentes lados das membranas, poroso (P) e denso (D). Silicone e PTFEe foram utilizados como controles. ....78
- Figura 20: Avaliação da coagulação sanguínea por meio dos testes de: (a) coagulação dinâmica (b) formação de trombos. 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 Tukey. ....80
- Figura 21: (a) Potencial hemolítico das membranas de BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe. 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 Tukey. (b) Espectro de absorção da oxihemoglobina do sangue em contato com as amostras. ....83
- Figura 22: (a) Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) (b) tempo de protrombina (PT) (c) tempo de trombina (TT) do plasma original e do plasma em contato com os materiais BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe. Intervalo de referência para um plasma saudável indicado entre o tracejado. 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 Tukey. ....84
- Figura 23: Concentração da proteína C3a da cascata complemento do sangue total em contato com os materiais BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe. 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 Tukey. ....86

- Figura 24: Atividade metabólica celular em membranas de BNC e BNC-Hep e controle placa em diferentes tempos de cultura (dias) de **(a)** HASMC e **(b)** HAEC. 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 Tukey. .... 88
- Figura 25: Biorreator de fluxo pulsante, sistema completo: câmara de controle de temperatura e atmosfera de CO<sub>2</sub>, câmara de cultivo, tubulações e bomba peristáltica, reservatório de meio de cultivo e vaso de NBC-Hep. .... 90
- Figura 26: Análise quantitativa da viabilidade de células HASMC e HAEC cultivadas na BNC-Hep em função do tempo de cultura, através da utilização das técnicas de 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. .... 91
- Figura 27: Confirmação fenotípica das células cultivadas em fluxo dinâmico. HASMCs cultivadas no exterior e das HAECs no interior das estruturas tubulares de BNC-Hep, através da utilização da técnica de imunocitoquímica, onde a proteína CD31 das HAECs estão coradas em verde e a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso das HASMC estão coradas em vermelhos, os núcleos celulares estão corados de azul, utilizando DAPI. .... 92



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Testes de hemocompatibilidade descritos na ISO 10993-4.....	50
Tabela 2: Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímica. ....	65



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APTT:** tempo de tromboplastina parcialmente ativada (*activated partial thromboplastin time*)

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**BNC:** nanocelulose bacteriana

**BNC-Hep:** heparina imobilizada em nanocelulose bacteriana

**BOD:** demanda bioquímica de oxigênio

**BSA:** Albumina de soro fetal bovino (*Bovine Serum Albumin*)

**Dacron<sup>®</sup>:** tereftalato de polietileno

**DO:** densidade óptica

**ETV:** engenharia tecidual vascular

**FTIR:** Infravermelho com Transformada de Fourier

**HAEC:** célula endotelial de aorta humana

**HASMC:** célula muscular lisa de aorta humana

**MEC:** matriz extracelular

**MEV:** microscopia eletrônica de varredura

**PBS:** tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PCT:** placa de cultura de tecidos

**PPP:** plasma pobre em plaquetas

**PRP:** plasma rico em plaquetas

**PT:** tempo de protrombina (*prothrombin time*)

**PTFEe:** poli(tetra-flúor etileno) expandido

**SBF:** soro fetal bovino

**TT:** tempo de trombina (*thrombin time*).



## SUMÁRIO

<b><u>1</u></b>	<b><u>INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</u></b>	<b><u>25</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>OBJETIVOS.....</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>27</b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</u></b>	<b><u>29</u></b>
<b>3.1</b>	<b>VASOS SANGUÍNEOS .....</b>	<b>29</b>
3.1.1	SUBSTITUIÇÃO VASCULAR .....	31
<b>3.2</b>	<b>ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	HEMOCOMPATIBILIDADE.....	37
3.2.2	BIOMATERIAS.....	45
3.2.3	ISO 10993-4 .....	49
<b>3.3</b>	<b>BIORREATORES EM ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR .....</b>	<b>50</b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>MATERIAIS E MÉTODOS .....</u></b>	<b><u>53</u></b>
<b>4.1</b>	<b>PRODUÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>MODIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA .....</b>	<b>55</b>
4.2.1	IMOBILIZAÇÃO DE HEPARINA .....	55
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS DA BNC E BNC-HEP ....	56
4.2.3	QUANTIFICAÇÃO DA HEPARINA IMOBILIZADA .....	56
<b>4.3</b>	<b>HEMOCOMPATIBILIDADE.....</b>	<b>57</b>
4.3.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS .....	57
4.3.2	POPULAÇÃO .....	57
4.3.3	MATERIAL BIOLÓGICO.....	57
4.3.4	BIODEGRADAÇÃO EM PLASMA SANGUÍNEO HUMANO .....	58
4.3.5	ADESÃO PLAQUETÁRIA.....	59
4.3.6	TROMBOGENICIDADE.....	59
4.3.7	COAGULAÇÃO DINÂMICA.....	60
4.3.8	POTENCIAL HEMOLÍTICO.....	60
4.3.9	ATIVAÇÃO POR CONTATO .....	61
4.3.10	ATIVAÇÃO DA CASCATA COMPLEMENTO.....	62
<b>4.4</b>	<b>MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR .....</b>	<b>63</b>
4.4.1	VIABILIDADE CELULAR .....	64
4.4.2	IMUNOCITOQUÍMICA .....	65

4.4.3	CO-CULTURA NOS VASOS DE BNC-HEP .....	65
<b>4.5</b>	<b>SISTEMA DE FLUXO PULSANTE .....</b>	<b>66</b>
4.5.1	BIORREATOR DE FLUXO PULSANTE .....	67
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b>5.1</b>	<b>PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS E ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE BACTERIANA .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA ..</b>	<b>70</b>
<b>5.3</b>	<b>HEMOCOMPATIBILIDADE .....</b>	<b>72</b>
5.3.1	BIODEGRADAÇÃO EM PLASMA SANGUÍNEO .....	73
5.3.2	ADESÃO PLAQUETÁRIA .....	76
5.3.3	TROMBOGENICIDADE E COAGULAÇÃO DINÂMICA.....	79
5.3.4	POTENCIAL HEMOLÍTICO .....	81
5.3.5	ATIVAÇÃO POR CONTATO .....	84
5.3.6	ATIVAÇÃO DA CASCATA COMPLEMENTO .....	85
<b>5.4</b>	<b>CULTURA CELULAR .....</b>	<b>87</b>
<b>5.5</b>	<b>BIORREATOR DE FLUXO PULSANTE.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b><u>CONCLUSÕES .....</u></b>	<b><u>95</u></b>
<b>7</b>	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b><u>97</u></b>
<b>8</b>	<b><u>ANEXO.....</u></b>	<b><u>113</u></b>

## **1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA**

---

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 29,4% das mortes registradas no Brasil anualmente, o que em números absolutos significa mais de 308 mil mortes por infarto e acidente vascular cerebral em um ano (GOMES, 2014).

Doenças cardiovasculares são aquelas que afetam o coração e os vasos sanguíneos, que incluem também arritmias cardíacas, isquemias ou anginas. A principal característica dessas doenças é a presença da aterosclerose, caracterizado por um acúmulo de placas de gorduras nas artérias ao longo dos anos que impede a passagem do sangue.

Na clínica médica os recursos cirúrgicos para restabelecer o fluxo sanguíneo é a cirurgia de bypass, preferencialmente usando um vaso autólogo. Quando estes vasos não estão disponíveis, devido à progressão natural da doença ou por consecutivas cirurgias, a alternativa passa, geralmente, pelo uso de próteses vasculares heterólogas ou sintéticas.

O sistema único de saúde (SUS) gastou no período de dezembro de 2016 a dezembro de 2017 aproximadamente 304 milhões de reais em cirurgias de revascularização miocárdica com ou sem uso de extracorporea, (c/ 2 ou mais enxertos) (DATASUS, 2018)

As próteses sintéticas mais utilizadas são o polietileno de tereftalato com nome comercial de Dacron® e o politetrafluoroetileno expandido PTFEe. Apesar de ambos serem inertes e biestáveis, porém, quando em contato com o sangue ativam a via intrínseca da cascata de coagulação, originando a formação de um coágulo. Este efeito é pouco significativo em prótese de grande calibre (>6mm) e alto fluxo sanguíneo, mas torna-se significativo em vasos de baixo calibre e fluxo (Chlupác, Filová e Bacáková, 2009). Enxertos sintéticos de baixo calibre de PTFEe mostraram uma baixa biocompatibilidade, sendo a patência (capacidade de manter uma via desobstruída) desses vasos sintéticos em membros inferiores de apenas 25% em cinco anos (Teebken e Haverich, 2002).

A incidência de doenças vasculares periféricas vem aumentando gradualmente. No entanto, devido à escassez de vasos utilizáveis e adequados substitutos vasculares, existe uma grande demanda por novos materiais (Arslan et al., 2015; Mirkovic, Stefanovic e Jankovic, 2015). Atualmente, há duas tendências principais no desenvolvimento de um substituto vascular. Uma delas é a busca de novos biomateriais sintéticos ou naturais, além do Dacron e PTFE. Estes materiais têm mais de 30 anos no mercado e apesar de serem utilizados para implantes cardiovasculares não atendem a todas as necessidades clínicas (Teebken e Haverich, 2002).

Alternativamente, a engenharia tecidual vascular visa à construção de um *by-pass* vascular, biodegradável ou não, utilizando células endoteliais e musculares lisas que respondam adequadamente quando em contato com o sangue. A segunda tendência é o desenvolvimento/utilização de biorreatores que possam controlar os processos físicos e condições mecânicas essenciais para o crescimento celular nos vasos artificiais.

Levando em consideração a grande demanda de novos materiais e dispositivos para ETV, faz-se necessário o desenvolvimento de biomateriais que mimetizem os sinais biofísicos e bioquímicos permitindo que as células migrem e cresçam no vaso artificial e respondam aos sinais mecânicos, por exemplo, criados por um biorreator. Nem todos os materiais desenvolvidos para ETV respondem adequadamente ao entrar em contato com o sangue, uma modificação que melhora esta resposta é a introdução de agentes que interfiram na coagulação sanguínea, como a heparina, que tem sido utilizada e tem mostrado resultados satisfatórios no controle da hemocompatibilidade (Sperling, Maitz e Werner, 2018).

Um biomaterial que tem se destacado nas aplicações biomédicas devido suas características é a nanocelulose bacteriana, uma matriz naturalmente estruturada semelhante à membrana basal e matriz extracelular e com propriedades como: alta pureza, alta cristalinidade comparada com a celulose vegetal, alto módulo de elasticidade, alta capacidade de retenção de água e excelente afinidade biológica (Putra et al., 2008; Iguchi, Yamanaka e Budhiono 2000). A nanocelulose bacteriana apresenta uma ampla gama de possibilidades de aplicações na engenharia tecidual, como: tratamentos de feridas, regeneração de cartilagem, regeneração óssea, vasos sanguíneos artificiais, aplicações odontológicas, entre outras (Halib et al., 2017).

Com base no exposto acima, o desenvolvimento de uma estrutura tubular de nanocelulose bacteriana com uma interação melhorada com o sangue, com células provenientes de vasos sanguíneos nativos e a utilização de biorreator define a natureza inédita da pesquisa aqui desenvolvida, onde as características inerentes a um vaso sanguíneo são recriadas para desenvolver um modelo fisiologicamente relevante.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um sistema biomimético para vasos sanguíneos baseado em Nanocelulose Bacteriana (BNC).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Produzir BNC em formato tubular de pequeno diâmetro utilizando a bactéria *Komagataeibacter hansenii*;
- ii. Modificar e caracterizar a superfície da BNC com uma glicosaminoglicana linear (heparina) BNC-Hep, a fim de modular a hemocompatibilidade da BNC;
- iii. Avaliar a hemocompatibilidade da BNC e BNC-Hep em contato com sangue humano;
- iv. Avaliar a viabilidade celular de linhagens celulares que compõem o leito vascular (células endoteliais e/ou musculares lisas) nas membranas BNC e BNC-Hep;
- v. Utilizar coculturas celulares originárias do leito vascular em BNC e BNC-Hep, buscando mimetizar um vaso sanguíneo nativo;
- vi. Investigar a BNC-Hep em formato tubular celularizadas com células do leito vascular em um sistema de fluxo pulsante, construído para tal fim.

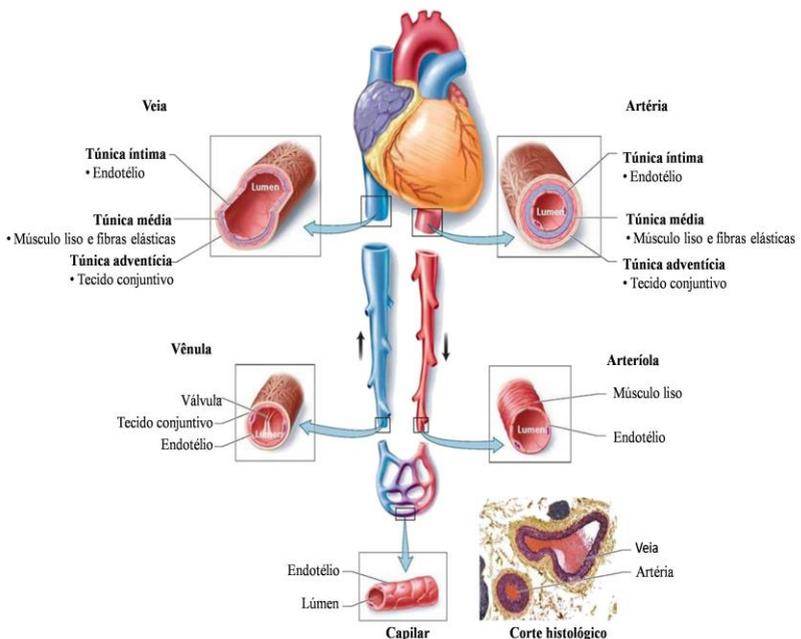


### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 VASOS SANGUÍNEOS

Através de um circuito de vasos no corpo, o sangue é levado para fora do coração pelas artérias, que se ramificam para dar origem a vasos mais estreitos chamados arteríolas. As arteríolas levam a redes de vasos microscópicos chamados capilares, que permitem a troca de materiais entre o sangue e as células do corpo. Os capilares finalmente se fundem para formar vênulas, que por sua vez se unem para formar grandes tubos chamados veias, as vênulas e veias retornam o sangue ao coração para ser oxigenado pelos pulmões, Figura 1.

Figura 1: Estrutura anatômica das veias e artérias humanas.



Fonte: Adaptado de (Pearson Education, 2009)

Vasos sanguíneos humanos são constituídos de três camadas diferentes: túnica íntima, média e adventícia. A composição e estrutura dessas camadas depende 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. As veias muitas vezes contêm válvulas, estas válvulas impedem o refluxo do sangue, permitindo que o sangue mova-se em direção ao coração, mas impedindo-o de fluir para trás. Os capilares, os menores vasos, são uma exceção à estrutura geral; sua função é de fornecer oxigênio ao tecido circundante, e para permitir a difusão de oxigênio as paredes capilares chegam a ter apenas uma célula de espessura (Staubesand, 2013).

A íntima é a camada mais interior das artérias e das veias, e consiste em uma monocamada de células endoteliais, denominada endotélio, que se assenta 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. 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 (Gartner e Hiatt 2007).

### **3.1.1 Substituição vascular**

As artérias sofrem mudanças progressivas e graduais, do nascimento até a morte, sendo difícil estabelecer 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).

A cirurgia de revascularização do miocárdio (ponte aortocoronariana) é um dos procedimentos cirúrgicos mais frequentemente executados (mais de 400.000 por ano nos EUA) (Hillis et al., 2012). As pontes são feitas utilizando-se enxertos de veia safena autóloga revertida (retiradas da perna do próprio paciente) ou da artéria mamária interna (geralmente a artéria mamária interna esquerda, devido à proximidade do coração). A patência de longo prazo para enxertos de veia safena é de 50% em 10 anos em função de alterações patológicas, incluindo trombose (geralmente no início), espessamento da íntima (geralmente vários meses ou anos após a operação) e aterosclerose no enxerto, algumas vezes com ruptura de placas, trombos ou aneurisma sobreposto (geralmente mais de dois ou três anos). Por outro lado,

enxertos de artéria mamária interna possuem uma patência maior que 90% em 10 anos) (Coleman, 2010).

Muitos pacientes recebem enxertos sintéticos ou autólogos que substituem um segmento de vaso, ou que agem como uma ponte sobre as artérias lesadas. O procedimento clínico de enxerto vascular depende principalmente de seu tipo e localização. Os enxertos de Dacron® com diâmetros elevados (12 a 18 mm) atualmente utilizados funcionam bem em locais de fluxo elevado, como na aorta. Por outro lado, enxertos de tecido de pequeno diâmetro (até 6 a 8 mm) utilizados na periferia ou como pontes da artéria coronária não funcionam tão bem (Coleman, 2010).

Os substitutos vasculares de pequeno calibre mais amplamente utilizados são as veias safenas autólogas (veia do próprio paciente) e o politetrafluoroetileno expandido (uma estrutura de Teflon esponjosa). O insucesso das próteses de vasos de pequeno diâmetro (6 mm) é mais frequentemente decorrente de oclusão trombótica, hiperplasia fibrótica da íntima generalizada (em enxertos de veias) ou na junção do enxerto com a vasculatura nativa, ou ocasionalmente, aterosclerose (Huang et al., 2017).

A cicatrização de um enxerto vascular depende da migração e proliferação das células endoteliais e das células musculares lisas (derivadas da artéria adjacente), na junção do enxerto com o vaso nativo (anastomose). A capacidade de endotelização de próteses cardiovasculares em humanos é limitada, e a endotelização total de enxertos clínicos é incomum. A cobertura do lúmen se desenvolve de modo relativamente lento e incompleto; a formação da neointima (uma superfície coberta por células endoteliais) está geralmente restrita a uma zona de 12 a 15 mm próxima à anastomose, e o restante da cobertura do enxerto constitui uma pseudo-íntima (trombo ou outras células, que não as endoteliais) (Coleman, 2010; Schoen, 2005).

### *3.1.1.1 Breve histórico da substituição vascular*

A fisiopatologia e os sintomas da doença coronariana já eram conhecidos e descritos desde o século XVIII, com relatos da angina pectoris (suprimento insuficiente de sangue e de oxigênio para o coração) atribuída à insuficiência coronariana, por Heberden e Hunter em 1764 (Keele, 1966).

Já em 1902 Alexis Carrel publicou, no Lyons Medical, uma técnica para a anastomose dos vasos sanguíneos e em 1910 ele demonstrou que os vasos sanguíneos poderiam ser mantidos por longos períodos em armazenamento frio antes de ser usados como transplantes

em cirurgia, sua pesquisa lhe rendeu o Nobel de fisiologia e medicina em 1912 (Nobelprize.org, 2014).

O primeiro relato de substituto vascular sintético data de 1952, quando o Dr. Arthur B. Voorhees descreveu seu primeiro trabalho com o uso de um tecido chamado *vinylon-N* (policloreto de vinila) utilizado como prótese de aorta em 15 cães (Voorhees, Jaretzki e Blakemore, 1952). O mesmo material foi utilizado em humanos em 1953.

O desenvolvimento de tecidos sintéticos teve continuidade com pesquisas com materiais relativamente impermeáveis, como o *nylon* (poliamida) em 1955, sendo as primeiras próteses confeccionadas artesanalmente criando uma estrutura tubular implantável através de suturas no indivíduo receptor (Edwards e Tapp 1955).

A ideia era eficiente e simples, porém o *nylon* foi logo no início das pesquisas substituído pelo Dacron<sup>®</sup> (poliéster) (Harrison, Swanson e Lincoln, 1957) e esse material, em diferentes formas de trançado, foi o que desde então persistiu como a prótese mais utilizada, particularmente nas artérias de grande calibre como a aorta, ilíacas e femorais (Moll et al., 2011).

Para essas próteses de poliéster fabricadas em máquinas têxteis duas grandes modalidades emergiram as próteses tecidas e as próteses tricotadas. Por um tempo este conceito foi muito valorizado, por aspectos de técnica operatória e de porosidade para crescimento celular (Moreland, 1995).

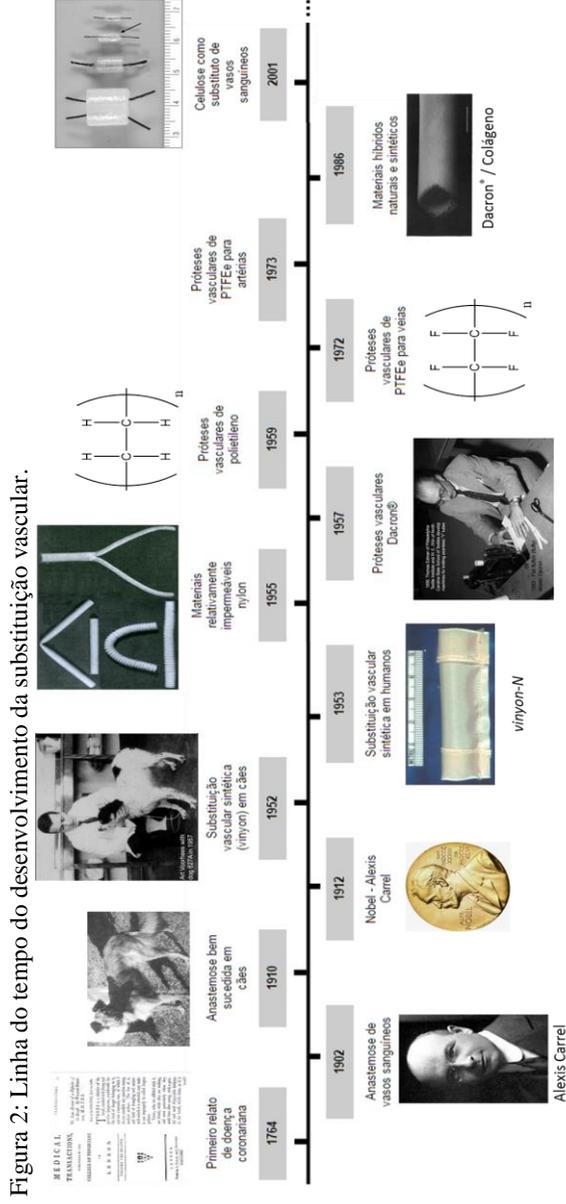
As próteses tricotadas possuem maior porosidade, e são mais maleáveis permitindo passagem da agulha dos fios de sutura com maior facilidade, melhorando seu manuseio (RATNER et al., 2004). Entretanto, essa porosidade, permite a passagem do sangue e isso fez com que fosse necessário o uso de um tempo de pré-coagulação, no qual após a liberação inicial das anastomoses esperava-se que houvesse formação de coágulos entre as tramas do tecido para que o enxerto se tornasse impermeável ao sangue. Isto provocava maior sangramento intra-operatório, mas o benefício do melhor manuseio e de melhor integração futura da prótese pelo crescimento celular sob a prótese são os argumentos que justificam a escolha desse material (Sheehan, Rajah e Kester, 1989). As próteses tecidas são mais rígidas, portanto de mais difícil manuseio cirúrgico, entretanto, são impermeáveis e necessitam tempo de pré-coagulação nem revestimento interno com proteínas (Schmitt, 1994).

Em 1959 foram desenvolvidas próteses vasculares de polietileno na forma de tecido trançado (EDWARDS, 1959). Cerca de vinte anos após o início da experiência com os substitutos de tecidos sintéticos de

poliéster e polietileno, surge o politetrafluoroetileno expandido (PTFEe). O PTFEe é um polímero similar ao polietileno que foi então desenvolvido para prótese de veias em 1972 (Soyer et al., 1972), e de artérias, em 1973 (Matsumoto et al., 1973). Desde então o PTFEe ganhou espaço como prótese vascular com a proposta de substituir artérias de menor calibre e com regime de baixa pressão sanguínea.

Em 1986, Weinberg e Bell, conseguiram produzir a partir de uma abordagem da engenharia tecidual o primeiro vaso sanguíneo artificial híbrido sintético/natural, utilizando uma matriz de Dacron® e colágeno, com células endoteliais, de músculo liso e fibroblastos bovinos, porém, este modelo não dispunha dos requisitos mecânicos necessários para desempenhar corretamente a sua função *in vivo* (Weinberg e Bell, 1986). A partir da publicação de Weinberg e Bell, surgiram então, novos estudos focados em ETV, neste contexto, apenas em 2001 surge à primeira tentativa de utilização de celulose como substituto de vasos sanguíneos, testados com sucesso em ratos (Klemm et al., 2001a).

Apesar do desenvolvimento da engenharia de vasos sanguíneos os dois materiais desenvolvidos na década de 50 e 70, Dacron® e PTFEe, respectivamente, são os preferidos nas cirurgias vasculares até os dias atuais; contudo, quando em contato com o sangue ativam a via intrínseca de coagulação originando a formação de um coágulo. Este efeito, mais significativo em vasos de baixo calibre e fluxo (Chlupác, Filová e Bacáková, 2009; Leitão et al., 2013) (Figura 2).



Fonte: Elaborada pelo autor

### 3.2 ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR

A engenharia tecidual é descrita por Langer e Vacanti, 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, Langer e Vacanti, 2011). O conceito básico de engenharia tecidual inclui um suporte físico (*scaffold* 3D) composto por polímeros sintéticos (Dacron e PTFEe são alguns exemplos) ou materiais naturais (e.g., colágeno, elastina, fibrina), ou ainda uma combinação dos dois (Dacron e colágeno) 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 (Place, Evans e Stevens, 2009).

A parede vascular possui uma arquitetura complexa e propriedades mecânicas únicas, o que faz da engenharia ETV um enorme desafio para a engenharia tecidual. O desenvolvimento de um substituto de vaso sanguíneo motivou grande parte da pesquisa nesta área. Várias metodologias surgiram para a construção de vasos sanguíneos nas três últimas décadas, muitos avanços foram feitos nessa busca, com várias metodologias emergindo. Entre estas, podemos destacar algumas

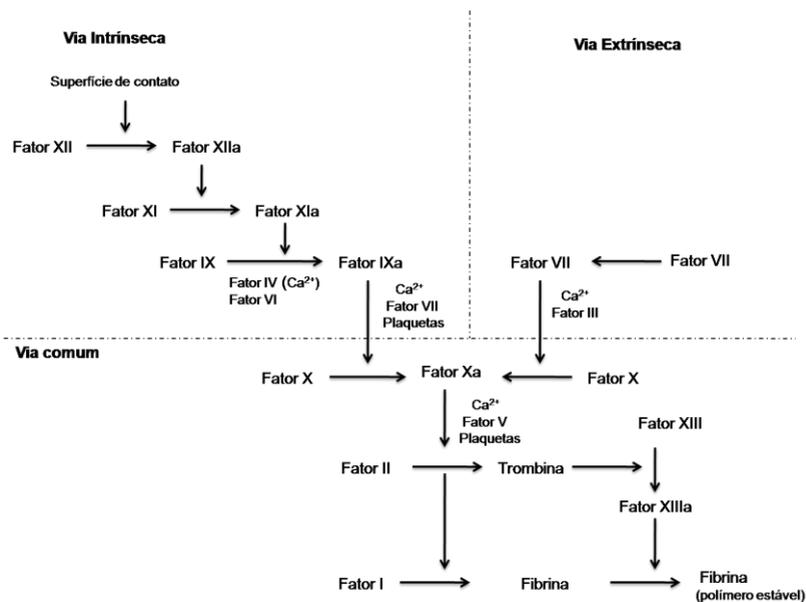
abordagens como: enxertos sintéticos semeados com células endoteliais, análogos de vasos sanguíneos à base de materiais natural como colágeno, construções à base de polímeros sintético biodegradáveis, vasos sanguíneos de automontagem celular e descelularização de tecidos nativos (Nerem; Seliktar, 2001).

### **3.2.1 Hemocompatibilidade**

#### *3.2.1.1 Cascata coagulação*

A via clássica da coagulação (Figura 3) foi proposta em 1964, por Macfarlane, Davie e Ratnoff (Macfarlane, 1964; Davie e Ratnoff, 1964). Apesar deste modelo possuir limitações e não conseguir explicar satisfatoriamente todos os fenômenos ligados à hemostasia in vivo, é aceito até os dias atuais. Este modelo convencional referido como "cascata" foi proposto para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, segundo o qual a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogênio (Fator I) em monômeros de fibrina. Tal proposta divide a coagulação em uma via extrínseca (envolvendo elementos do sangue e também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular) e uma via intrínseca (iniciada por componentes presentes no espaço intravascular), que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X. Na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FIII, FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XII ativado, ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença e íons cálcio (complexo tenase), ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina.

Figura 3: Cascata clássica da coagulação sanguínea.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Grandes avanços ocorreram nos últimos anos quanto à hemostasia, cujo início depende de células que expressam FT em sua superfície. O FT é uma proteína transmembrânica que age como receptor e cofator para o fator VII, estando normalmente expresso em células fora da vasculatura (Edgington et al., 1991).

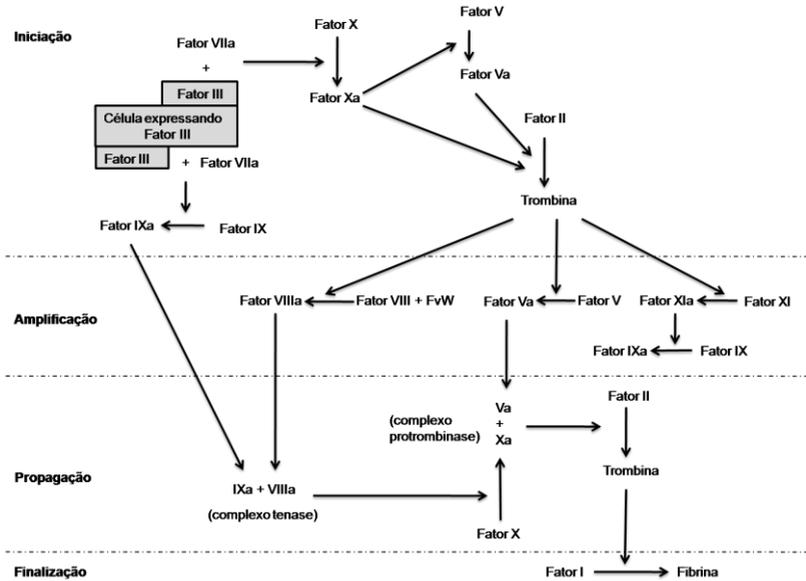
Este entendimento resultou em questionamento do papel da via intrínseca na hemostasia in vivo. Com relação ao fator XII, evidências sugerem que, embora sua deficiência não resulte em problemas de sangramento, a ausência desse não protege contra a trombose (Vine, 2009).

Recentemente foi proposto o modelo baseado em superfícies celulares (Figura 4) no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Neste novo modelo, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de FT na corrente sanguínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Dessa forma, o FT é exposto na circulação

sanguínea pela lesão endotelial e de células vizinhas ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos (Nemerson, 1988).

Muitas evidências sugerem que o FT está também presente no sangue em micropartículas celulares provenientes de membranas fragmentadas de vários tipos de células, como leucócitos, células endoteliais, bem como de plaquetas. Estas micropartículas podem desempenhar importante papel nos processos trombóticos. Sabe-se que o complexo FVIIa / FT ativa não somente o fator X, mas também o fator IX. Além disso, estudos mostram que esse complexo é fundamental para iniciar a coagulação in vivo (Riddell et al., 2007).

Figura 4: Cascata moderna da coagulação sanguínea, baseada em superfícies celulares.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O entendimento atual do processo hemostático considera a inter-relação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que atuam em uma série de estágios ou fases, e não em duas vias (intrínseca e extrínseca) como antes. As fases de iniciação, amplificação, propagação e finalização ilustram o intrigante processo que garante a circulação do sangue na forma líquida, restrita ao leito vascular. Estas quatro fases, resumidas a

seguir, compreendem a atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares (Ferreira et al., 2010).

A fase de iniciação do processo da coagulação ocorre quando células que expressam o FT em sua superfície são expostas aos componentes do sangue no sítio da lesão (VINE, 2009). O FT, uma vez ligado ao FVII presente no sangue, rapidamente o ativa em FVIIa formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa associado com o seu cofator, FVa, forma um complexo denominado protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. O FV pode ser ativado pelo FXa ou por proteases não coagulantes, resultando em FVa necessário para o complexo protrombinase. Esse complexo transforma pequenas quantidades de protrombina (Fator II) em trombina, que são insuficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (Hoffman, 2003a)

Na fase de amplificação, devido ao grande tamanho das plaquetas e do FVIII ligado ao fator de von Willebrand (FvW), as mesmas somente passam para o compartimento extravascular quando há lesão vascular. Quando um vaso é lesado, plaquetas escapam de dentro dos vasos, se ligam ao colágeno e a outros componentes da matriz extracelular no sítio da lesão, onde são parcialmente ativadas, resultando em um tampão plaquetário responsável pela hemostasia primária (Boucher e Traub, 2009).

Neste ponto, pequenas quantidades de trombina produzidas pelas células que expressam o FT podem interagir com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW. Dessa forma, inicia-se o processo hemostático culminando na formação de fibrina estável, que consolida o tampão plaquetário inicial.

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas (Vine, 2009). Primeiramente, o FIXa ativado durante a fase de iniciação pode agora se ligar ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também se produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa (Hoffman, 2003b). Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em

trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial.

Por fim na fase de finalização é formado o coágulo de fibrina sobre a área lesada, o processo de coagulação deve se limitar ao sítio da lesão para se evitar a oclusão trombótica do vaso. Para controlar a disseminação da ativação da coagulação, intervêm quatro anticoagulantes naturais, o inibidor da via do fator tecidual, a proteína C (PC), a proteína S e a antitrombina (Gorbet e Sefton, 2006; Ferreira et al., 2010).

Materiais que possam ser utilizados em contato com sangue sem causar danos, são requeridos em uma variedade de dispositivos médicos. A gama de aplicações é ampla e cobre os implantes no sistema cardiovascular (cateteres, *stents*, válvulas, vasos, dispositivos de assistência circulatória) e também tratamentos sanguíneos extracorpóreos (aférese, hemodiálise, oxigenação/circulação do coração-pulmão).

Dispositivos de uso clínico no momento requerem o uso constante de medicamentos, tais como anticoagulantes, mesmo assim, há uma incidência significativa de trombose e outras complicações (Liu et al., 2014). Danos causados por contato material-sangue incluem a ativação de plaquetas, depleção e desnaturação de proteínas plasmáticas. A calcificação do material leva à perda de propriedades e é também um problema para dispositivos cronicamente implantados. Perda de propriedades do material ao longo do tempo através da biodegradação é similarmente uma limitação de aplicação em longo prazo. No entanto, coágulo e trombo (tromboembolização no caso de implantes) permanecem como os problemas mais graves e mais intratáveis no desenvolvimento de dispositivos de contato com o sangue. Esses fenômenos causam, por exemplo, a oclusão rápida de vasos de diâmetro menor que 6 mm (Chlupác, Filová e Bacáková, 2009), o bloqueio de cateteres de amostragem (Chopra et al., 2012; Yau et al., 2011), falha dos dispositivos de assistência cardíaca (Starling et al., 2014).

Uma vez que as interações sangue-material são fortes, as propriedades químicas e físicas da superfície do material têm sido extensivamente investigadas. Três estratégias gerais têm sido usadas e podem ser descritas como: (1) Passivação de superfície, por exemplo, modificar a interação da superfície do material com o sangue, especialmente a adsorção de proteínas não específicas, materiais modificados com vários polímeros hidrofílicos e/ou zwitteriônico (Chen, Brook e Sheardown, 2004; Higuchi et al., 2002) tem demonstrado ser resistente a adsorção de proteínas. (2) Incorporação de moléculas

bioativas, exemplo, anticoagulantes (heparina) (Linhardt e Xie, 2008), inibidores plaquetários (ácido acetilsalicílico) (Lee et al., 2001; Aldenhoff et al., 2003) e agentes fibrinolíticos (estreptoquinase) (Li, Chen e Brash, 2011). (3) Mimetismo do endotélio vascular (a superfície interna do vasos sanguíneo), a única superfície que pode ser verdadeiramente não trombogênica (Avci-Adali, Ziemer e Wendel, 2010). Materiais com superfícies porosas parece modular uma trombose limitada, que pode reorganizar um pseudo-endotélio inerte (Liu et al. 2014).

### 3.2.1.2 *Cascata complemento*

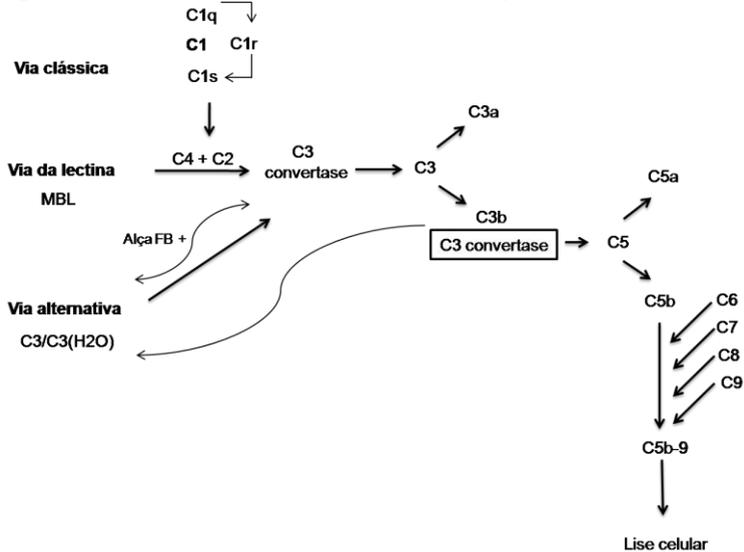
O sistema de complemento desempenha um papel nos mecanismos de defesa do corpo contra infecções. O sistema complemento consiste em mais de 20 proteínas plasmáticas que funcionam como enzimas ou como proteínas de ligação (Figura 5). A ativação do complemento é iniciada através dos caminhos clássicos ou alternativos e o caminho terminal é comum a ambos. Ambas as vias contêm uma enzima inicial que catalisa a formação da C3 convertase, que por sua vez gera a convertase C5 permitindo a montagem do complexo terminal (TCC). Vários produtos da cascata complemento (C3b, C4b e iC3b) ligam-se a superfícies bacterianas e complexos imunes em um processo chamado opsonização (Misoph, Schwender e Babin-Ebell, 1998), que facilita sua absorção por células inflamatórias (fagocitose).

A via clássica é desencadeada por complexos antígeno-anticorpo que se ligam ao complexo C1 (C1q, C1r, C1s) através do componente C1q, este ativa C1s, que é então capaz de clivar o C4. A proteína C4 une-se a proteína C2 formando o complexo C4bC2b, e assim clivar C3 em C3a (anafilatoxina) e C3b. A combinação de C4bC2b e C3b torna-se a convertase C5, que cliva C5 em C5a (anafilatoxina) e C5b. O C5b é o primeiro componente do complexo terminal e tem alta afinidade com C6. C5bC6 liga então C7, C8 e até 12 formando o TCC (também chamado de complexo de ataque de membrana, mC5b-9), assim resultando na lise celular (Gorbet e Sefton, 2006).

A ativação do caminho alternativo não requer anticorpos ou complexos imunes e são ativados por superfícies estranhas, tais como fungos, bactérias, polissacáridos, lipopolissacárideos, partículas e superfícies de biomateriais. A ativação do complemento da via alternativa ocorre espontaneamente a uma taxa baixa. A hidrólise espontânea do grupo tioéster interno de C3 ocorre na fase fluida, gerando C3/H<sub>2</sub>O. Este C3 hidrolisado pode ligar-se e ativar o Fator B e clivar outra molécula C3 em C3a e C3b, assim é formada a C3 convertase alternativa.

A via das lectinas é iniciada por alguns açúcares presentes em bactérias e fungos. Dentre estes açúcares o principal é a manose, em bactérias, fungos e vírus. Também é uma via de ativação não imune, pertence à imunidade natural.

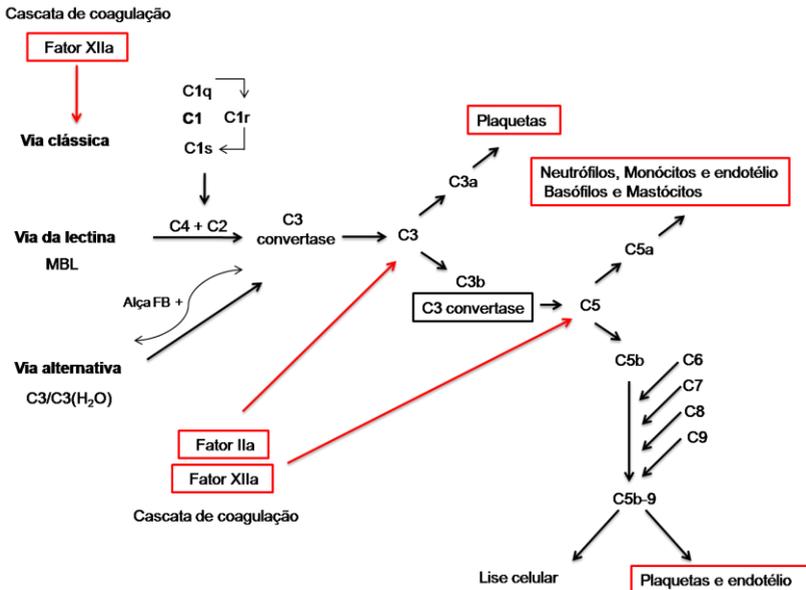
Figura 5: Mecanismos envolvidos na cascata complemento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora as cascatas de coagulação e complemento sejam discutidas separadamente, as duas cascatas parecem interagir significativamente para modular a atividade uma da outra (Figura 6). O fator XIIa e a calicreína são conhecidos por clivar C1s e, portanto, têm a capacidade de ativar a via complemento clássica. Já a trombina (FIIa) ativa C3, C5, C6 e Fator B; calicreína cliva C5 e fator B; o fator XIIa também cliva C3. A atividade da trombina em C3 e C5 pode explicar os níveis mais elevados de C3a e C5a no soro versus plasma (Blajchman; Ozge-Anwar, 1986).

Figura 6: Algumas interações conhecidas entre as cascatas coagulação e complemento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A presença de um biomaterial é acreditada convencionalmente por ativar o complemento através da via alternativa. Os biomateriais são normalmente classificados como superfícies "ativadoras" ou "não-ativadoras". Em uma superfície com grupos carregados negativamente tais como carboxilo, sulfato, ácido siálico e heparina ligada parecem promover associação de alta afinidade entre C3b. Por outro lado, uma superfície de ativação é normalmente caracterizada pela presença de nucleófilos, tais como grupos hidroxilo e amino: estes grupos permitem a ligação covalente de C3b e promovem a formação da convertase C3 e C5. Contudo, mesmo na ausência desses grupos ativadores na superfície, alguns biomateriais, como o poliácridonitrila, são capazes de ativar a cascata complemento (Gorbet e Sefton, 2006).

### 3.2.2 Biomaterias

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 (Grainger, 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, estrutura porosa adequada 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 (Hutmacher, 2001; 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 (Grainger, 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, Gemmell e Gorbet, 2000).

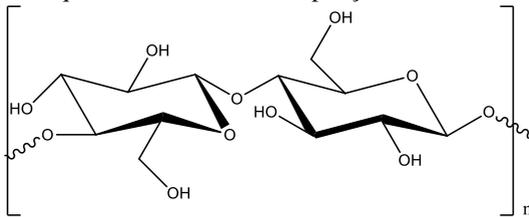
Também as propriedades mecânicas são importantes, e dependem do tecido alvo do enxerto. Para enxertos vasculares, o material deve ser investigado antes que possa ser utilizado como implante, quanto à sua capacidade de suportar a pressão do sangue, devendo apresentar resistência à ruptura, conformidade ao local implantado, força de retenção da sutura e resistência ao desgaste.

O conceito básico da engenharia tecidual inclui um suporte físico (*scaffold*3D) que pode ser composto por materiais naturais ou materiais sintéticos que sirvam 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.

### 3.2.2.1 Nanocelulose 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, Romanovicz e Brown, 2004). Ela é composta por monômeros de glicose do tipo D-Glc- $\beta$ (1-4) ligadas (Figura 7), 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. 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, Park e Jung, 2003).

Figura 7: Estrutura química da unidade de repetição da nanocelulose bacteriana



Fonte: Elaborado pelo autor.

A nanocelulose bacteriana (BNC) 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). Durante sua biossíntese por bactérias, as cadeias de celulose são polimerizadas pela celulose sintase A de glicose ativada. As cadeias simples são extrudadas através da parede celular bacteriana por complexos terminais conhecidos como rosetas. Cerca de 50 a 80 cadeias simples de glicose são extrudadas linearmente ao longo do eixo da roseta (Ross; Mayer; Benziman, 1991), dando origem as microfibrilas. As microfibrilas se agrupam hierarquicamente como um complexo, formando principalmente nanofibras que contêm 10-15 microfibrilas (Bodin et al., 2011). As nanofibras formadas de forma aleatória compreendem cerca de 1000 cadeias lineares de glicose. A contínua fiação das nanofibras de celulose leva à formação de estruturas 3D

altamente puras, estabilizadas intra-fibrilarmente por ligações de hidrogênio (Sulaeva et al., 2015).

A BNC foi originalmente utilizada como alimento (nata de coco) na Ásia, na forma de doces ou cremes, mas suas propriedades únicas também levaram ao seu uso como um curativo para feridas. A produção de BNC para o propósito específico de curativo de feridas remonta ao início dos anos 1980 (Ring, 1986; Farah, 1990). Seu uso como material médico é atribuído às suas características: tem uma alta resistência à tração, flexibilidade, capacidade de retenção de água, permeabilidade pronunciada a gases e líquidos, alta porosidade e área superficial, potencial de introdução e liberação de agentes antimicrobianos, medicamentos ou outros materiais biofuncionais (SHAH et al., 2013) e uma grande compatibilidade com tecidos vivos (Czaja et al. 2006).

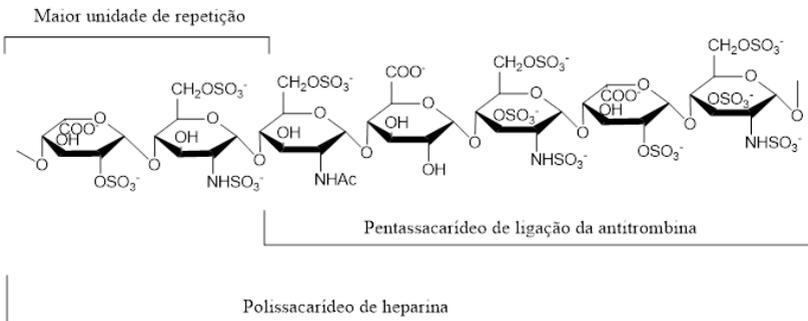
Diversos grupos de pesquisa estudaram a utilização da BNC para aplicações biomédicas. Entre essas aplicações, podem ser incluídas: substituto temporário de pele para recuperação de ferimentos e queimaduras (Ciechańska, 2004; Czaja et al., 2006; Czaja et al., 2007), cirurgias de restituição da laringe (Souza et al., 2011), produção de vasos sanguíneos artificiais (Klemm et al., 2001b), biomaterial para córnea (Jia et al., 2009), 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 et al., 2006; Petersen e Gatenholm, 2011). Estudos de biocompatibilidade da BNC *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 (Bäckdahl et al., 2006; 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 BNC vem sendo amplamente utilizada na engenharia tecidual.

Estruturas tubulares de BNC tem sido relatadas por possuir um grande potencial como vaso sanguíneo artificial, porém carecem de estudos mais aprofundado da interação da BNC com o sangue (Tang et al., 2017; Li et al., 2017; Klemm et al., 2001a).

### 3.2.2.2 Heparina

A heparina é uma glicosaminoglicana linear, que ocorre naturalmente nos seres humanos, que é composta por unidades de dissacarídeos repetidos com ligações 1,4 ácido urônico (D-glucurônico (GlcA) ou ácido L-idurônico (IdoA)) e D-glucosamina, como mostrado na Figura 8. Devido ao alto conteúdo de sulfato e grupos carboxílicos, a heparina tem a maior densidade de carga negativa que qualquer molécula biológica conhecida (Capila e Linhardt, 2002). Normalmente é extraída dos tecidos mucosos porcino com massa molar variando de 5 a 40 kDa. Em aplicações clínicas, a heparina é utilizada como um reagente anticoagulante injetável. Além da sua atividade anticoagulante, a heparina também mostrou atividade antiviral, anticâncer, angiogênica, regulação e inibição da ativação da cascata complemento (Mizrahy e Peer, 2012). A heparina age como um anticoagulante por interferir com a cascata da coagulação sanguínea através da interação com os fatores XIa, IXa, Xa e IIa (trombina) (Verhamme, Bock e Jackson, 2004). Atua como um catalisador para reagir com a antitrombina, Fator Xa, e outros fatores, na qual ocorre uma alteração conformacional que acelera formação do complexo trombina-antitrombina e do fator Xa-antitrombina, assim os fatores são efetivamente eliminados, e então as moléculas de heparina podem ser liberadas novamente e tornar-se livre para um novo processo.

Figura 8: Estrutura química do polissacarídeo linear de heparina indicando a maior unidade de repetição e a sequência de ligação com a trombina.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido à atividade anticoagulante específica, espera-se que interações heparina-sangue semelhantes possam ocorrer quando a heparina é imobilizada sobre uma superfície de membrana que estará em contato com o sangue. O complexo TAT é formado na interface e depois no sangue, fazendo com que a heparina fique disponível num ciclo de reutilização. Assim, a heparinização superficial pode se tornar uma estratégia para a modificação de anticoagulantes e de compatibilidade sanguínea, uma vez que, em princípio, a bioatividade pode ser de longo prazo (Liu et al., 2014).

A avaliação da coagulação sanguínea em contato com membranas modificadas com heparina pode ser realizada de acordo com alguns métodos descritos a seguir: tempo de trombina parcial ativado (APTT), tempo de protrombina (PT), tempo de fibrinogênio e tempo de trombina (TT) são os testes mais utilizados, utilizando plasma pobre em plaquetas (PPP). O APTT relaciona-se principalmente com a via intrínseca da coagulação, a PT relaciona-se principalmente com a via extrínseca, enquanto FT e TT são usados para medir o tempo de conversão do fibrinogênio para fibrina na via comum (Nie et al., 2014; Li et al., 2012). Em alguns casos, o tempo de recalcificação do plasma e tempo de coagulação do sangue total também é testado para fornecer uma avaliação (Li et al., 2012), onde PRT é um indicador da ativação em cascata da coagulação como um todo e o tempo de coagulação é indicado através da formação do coágulo sólido quando o sangue é exposto a uma superfície estranha.

A imobilização de heparina na superfície da BNC já foi relatada para aplicações em ETV, demonstrando resultados promissores na utilização deste compósito (Wan et al., 2011; Peng, Li e Meng, 2017; Tang et al., 2017).

### **3.2.3 ISO 10993-4**

Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 4: Seleção de testes para interações com sangue fornece requisitos gerais para avaliar as interações de dispositivos médicos com sangue. Descreve uma classificação dos dispositivos médicos e odontológicos destinados a serem utilizados em contato com o sangue, com base no uso pretendido e na duração do contato, conforme definido na ISO 10993 - Parte 1: Avaliação e teste dentro de um processo de gerenciamento de risco. Os princípios fundamentais que regem a avaliação da interação de dispositivos com sangue e as justificativas para a seleção estruturada de

testes de acordo com categorias específicas, juntamente com os princípios e bases científicas desses testes.

Tabela 1: Testes de hemocompatibilidade descritos na ISO 10993-4.

<b>Avaliação</b>	<b>Testes</b>
Ativação por contato	PT, APTT, tempo de recalcificação, FVIIa
Ativação complemento	C3a, C4a, C5a
Geração de trombina	TAT (complexo trombina-antitrombina), Dímero F1 + 2 (fibrinogênio + protrombina), Xa, IIa
Conversão de fibrinogênio em fibrina	Derivados de fibrinogênio, tempo de trombina, microscopia óptica
Fibrinólise	Tempo de reptilase, tempo de trombina (TT)
Hemólise	Hemoglobina livre
Proteólise	Elastase, <i>burst</i> oxidativo
Ativação de plaquetas	Microscopia óptica, CD62, CD63
Ativação por contato	PT, APTT, tempo de recalcificação, FVIIa

Fonte: Adaptado de Seyfert; Biehl; Schenk, 2002.

Requisitos detalhados para testes não podem ser especificados devido a limitações no conhecimento e precisão de testes para interações de dispositivos com sangue. A ISO 10993-4 descreve a avaliação biológica em termos gerais e pode não fornecer necessariamente orientação suficiente para métodos de teste para um dispositivo específico.

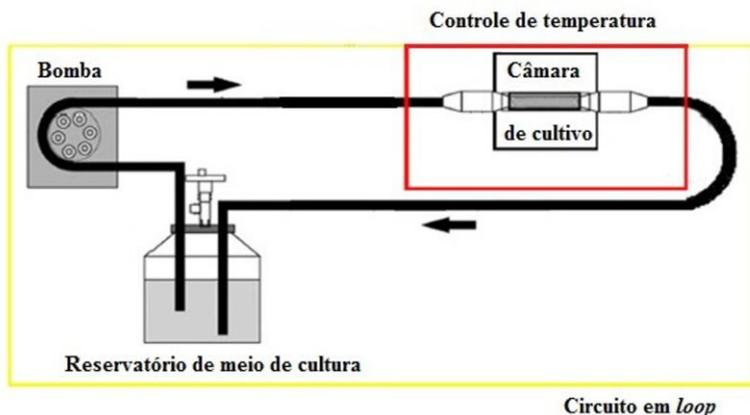
### 3.3 BIORREADORES EM ENGENHARIA TECIDUAL VASCULAR

Muitos estudos têm mostrado que o crescimento de células e tecidos vasculares é influenciado pelo fluxo de fluido sanguíneo (Zang et al. 2015; Lee et al., 2012; Meinhart et al., 2005). Uma abordagem que utiliza o uso de um ambiente dinâmico mecânico é o biorreator. 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).

Biorreatores que possam controlar os processos físicos e condições mecânicas são essenciais para a engenharia de tecidos vascular (Couet e Mantovani, 2012). Existem quatro componentes principais num biorreator vascular, que são: câmaras de cultivo, bombas, reservatórios de meios e um controlador de temperatura (Figura 9). Todos os componentes são montados em um circuito em *loop*, a bomba de fluxo pulsátil conduz o meio de cultura para fornecer oxigênio e nutrientes para as células, além da condição dinâmica do sistema para mimetizar *in vitro* a condição fisiológica de vasos encontrados *in vivo*.

Figura 9: Sistema biomimético empregado para aplicação de fluxo dinâmico e condicionamento de construções tubulares.



Fonte: Adaptado de Zhao et al., 2016.

Enxertos de revascularização de pequeno diâmetro foram desenvolvidos com sucesso, por meio de um *scaffold* de aorta de coelho descelularizado, usando células de músculo liso e endotelial aórtico de rato integrados no sistema de um biorreator vascular controlado, que proporcionou um condicionamento estático e outro dinâmico por duas semanas de cultura. Os resultados mostraram que a taxa de proliferação de células endoteliais e musculares lisas em condicionamento dinâmico foi significativamente maior que a do condicionamento estático, além de uma imitação histológica exata da artéria natural (Song et al., 2012).

Diferentes fontes de células podem resultar de forma diferente, mesmo sob o mesmo sistema de biorreator para ETV. Células endoteliais

e musculares lisas são as escolhas convencionais de fontes celulares para ETV. Células tronco de diversos nichos também estão sendo investigadas como fontes de células, como células tronco adultas, células tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea (EPCs) (Sun et al., 2006). Pesquisas recentes sugerem que a adição de EPCs no ciclo de incubação juntamente com um *scaffold* funcionalizado resultou na imobilização das EPCs na superfície interna do *scaffold* com posterior diferenciação em células endoteliais maduras criando uma monocamada funcional (Andukuri et al., 2013).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 PRODUÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

Para obtenção das estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana, construiu-se um aparato de acrílico com entradas laterais, uma mangueira de silicone de 4 mm de diâmetro externo, um compressor de ar e uma membrana de porosidade de 0,24  $\mu\text{m}$ . O aparato possui três compartimentos individuais possibilitando a produção separadamente. O sistema foi montado com uma mangueira de silicone no interior do aparato de acrílico, deixando as extremidades da mangueira para fora do aparato; 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 do compressor. O sistema aparato/mangueira de silicone foi esterilizado em uma solução aquosa de glutaraldeído 2,0% ativada em solução alcalina, o sistema ficou submerso por 10 horas para esterilização.

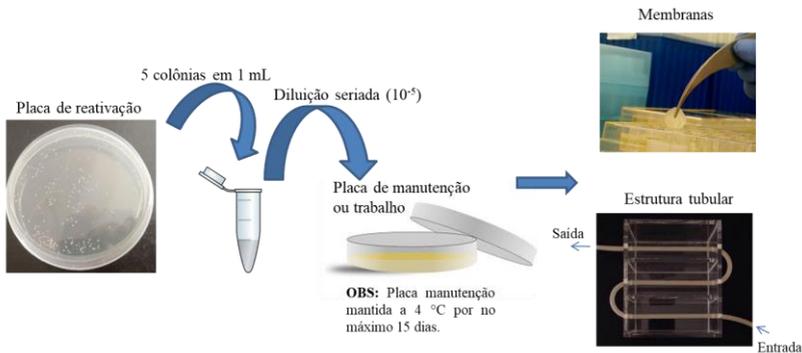
Uma alíquota da bactéria *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 (anteriormente nomeada de *Gluconacetobacter hansenii*), mantida em ultra freezer -80 °C (Nuair, EUA) em glicerol (20%) foi reativada em quatro mL de meio manitol (25 g/L de manitol, 5,0 g/L de extrato de levedura, 3,0 g/L de peptona). Cem  $\mu\text{L}$  desta solução foi plaqueada em placa ágar-manitol e acondicionado em incubadora BOD (Nova Ética, Brasil) a 26 °C por cinco dias, até o crescimento de colônias isoladas (placa de reativação). Para a produção da placa de manutenção e/ou trabalho, foram utilizadas cinco colônias isoladas da bactéria (placa de reativação), previamente ressuspendidas em um mL de meio manitol. A solução foi homogeneizada por 60 s no vórtex (Vision, Coreia), e deixada decantar por 10 s. A densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA), a 660 nm (valor de referência  $\text{DO}_{660} = 0,15$ ). Após leitura, foi realizada uma diluição seriada até  $10^{-5}$ , sendo então plaqueados 100  $\mu\text{L}$  da solução diluída em placa ágar-manitol, que foi mantida na BOD por sete dias a 26 °C. Após o crescimento das colônias isoladas, o procedimento de produção foi realizado ou a placa foi acondicionada a 4 °C por até 15 dias, que servindo como placa de manutenção.

Para produzir as estruturas tubulares ou membranas de BNC, as colônias da placa de trabalho foram ressuspendidas em meio de cultivo manitol, seguindo a relação de 5:1 (colônias/mL). Em seguida, foi homogeneizado em vórtex (Vision, Coreia) por 60 s, deixada decantar por 10 s e feita à leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, a 660 nm

(valor de referência  $DO_{660} = 0,15$ ). Foi realizada uma diluição de 10 vezes em meio de cultivo manitol (inóculo). O inóculo foi distribuído em placas de plástico estéril ou no sistema de produção das estruturas tubulares, onde a mangueira foi ligada a um compressor de ar, circulando oxigênio a 21%. O crescimento microbiano ocorreu em condição estática, à temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), durante um período de 12 dias.

Após 12 dias de cultura bacteriana os vasos de BNC que foram formados no entorno da mangueira de silicone na interface líquido/sólido/ar ou membranas que foram formadas na interface líquido/ar, foram removidos e transferidos para um frasco contendo uma solução de NaOH 0,1M, onde foram mantidos por 24 h a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 estruturas tubulares/membranas de BNC foram em seguida submetidas a lavagens sucessivas com água destilada, ou até que o pH da água de enxágue se equivaler ao da água destilada usada na lavagem. Em seguida os vasos ou membranas foram autoclavados por 20 min a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  e mantidos refrigerados até utilização.

Figura 10: Sequência esquemática da produção das membranas e estruturas tubulares de BNC.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.2 MODIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

### 4.2.1 Imobilização de heparina

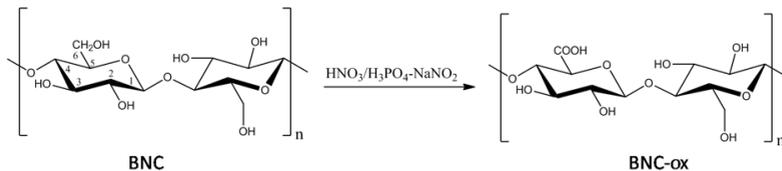
A BNC foi modificada quimicamente com heparina por meio do método de derivatização com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) a partir da BNC oxidada com algumas modificações (Kumar e Yang, 2002) (Figura 11a). A BNC foi imersa em uma solução de ácido nítrico e ácido fosfórico 2:1 (v/v) em seguida foi acrescentado 7% de nitrito de sódio (m/v). A solução foi coberta com uma placa de Petri para evitar a liberação dos gases da reação para a atmosfera. O tempo de reação foi de 24 horas, na ausência de luz, a 25 °C com agitação. Em seguida as membranas foram imersas em uma solução aquosa de 0,2 % (p/p) de glicerol durante 15 minutos para remover o excesso de oxidante. Finalmente as membranas foram lavadas com acetona e deixadas secar a 25 °C.

A imobilização por meio de ligação covalente da heparina nas membranas e estruturas tubulares de BNC foi realizada conforme retratado por Liu e colaboradores (Liu et al., 2005), com modificações (Figura 11b). A BNC oxidada foi imersa em tampão citrato 0,1 M (pH 4,8) contendo 2 mM de EDC durante 24 horas a 4 °C, com suave agitação. Subsequentemente a BNC foi colocada em tampão citrato (pH 4,8) com 1000 UI de heparina (v/v) durante 24 horas a 4 °C com agitação suave. Por fim a BNC modificada com heparina BNC-Hep foi lavada três vezes com tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente realizadas duas lavagens com água destilada.

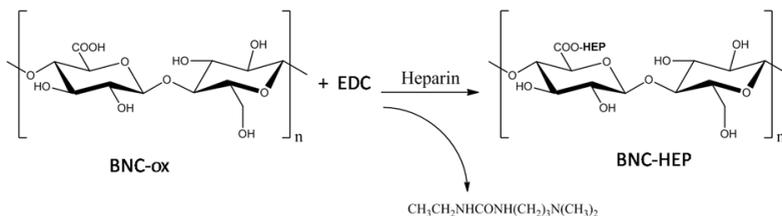
A heparina utilizada neste trabalho é de origem suína e massa molecular heterogênea, variando de 3.000 a 30.000 kDa, conhecida como heparina não fracionada, heparina convencional ou simplesmente heparina (Junqueira et al., 2011) e foi adquirida da empresa BLAU com o nome de Hepamax-s®.

Figura 11: Representação esquemática da reação química de modificação da superfície da BNC com heparina (a) oxidação do carbono 6 na mistura  $\text{HNO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4\text{-NaNO}_2$  (b) derivatização dos grupos ácidos com EDC.

(a)



(b)



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2.2 Caracterização dos grupos funcionais da BNC e BNC-Hep

A BNC e BNC-Hep foram analisadas usando Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Agilent (model Carry 600), com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , e varredura de  $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ , usando refletância total atenuada.

#### 4.2.3 Quantificação da heparina imobilizada

A quantidade de heparina sobre a superfície da BNC foi determinada utilizando o corante azul de toluidina (Bae, Seo e Kang, 1999), com algumas modificações. O corante azul de toluidina 0,005% (p/v) foi dissolvido em ácido clorídrico 0,01 M contendo 0,2% (p/v) de cloreto de sódio. A heparina foi diluída para a concentração de 0,0166% (v/v) com uma solução aquosa 0,2% (p/v) de cloreto de sódio. Para a construção da curva de calibração uma quantidade conhecida de heparina foi adicionada aos tubos que continham a solução de azul de toluidina e solução de cloreto de sódio. As misturas foram agitadas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e após uma hora, hexano foi adicionado. As misturas foram agitadas vigorosamente por 30 s, a fração orgânica (coloração roxa) foi retirada e a absorbância a  $631\text{ nm}$

da fração aquosa (coloração azul) foi medida. Membranas de BNC-Hep de aproximadamente 0,6 cm de diâmetro foram imersas cada uma em uma mistura de 600 µL da solução de azul de toluidina com 300 µL de uma solução de cloreto de sódio durante uma hora a 37 °C. Logo após, a membrana foi retirada do recipiente e 600 µL de hexano foram adicionados e a mistura foi agitada. A absorbância da fase aquosa foi medida em 631 nm. A quantidade de heparina na superfície da membrana foi calculada a partir da curva de calibração construída com heparina padrão e assim foi possível determinar a quantidade de heparina imobilizada por cm<sup>2</sup>.

### 4.3 HEMOCOMPATIBILIDADE

#### 4.3.1 Comitê de ética em pesquisa com seres humanos

Para realização dos estudos de hemocompatibilidade com sangue humano foi redigido um projeto com detalhes dos procedimentos desenvolvidos. O projeto foi submetido junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC) que segue a resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 196/96, em que “toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa” e cabe à instituição onde se realizam pesquisas a aprovação e fiscalização do mesmo, seguindo a constituição do CEP.

#### 4.3.2 População

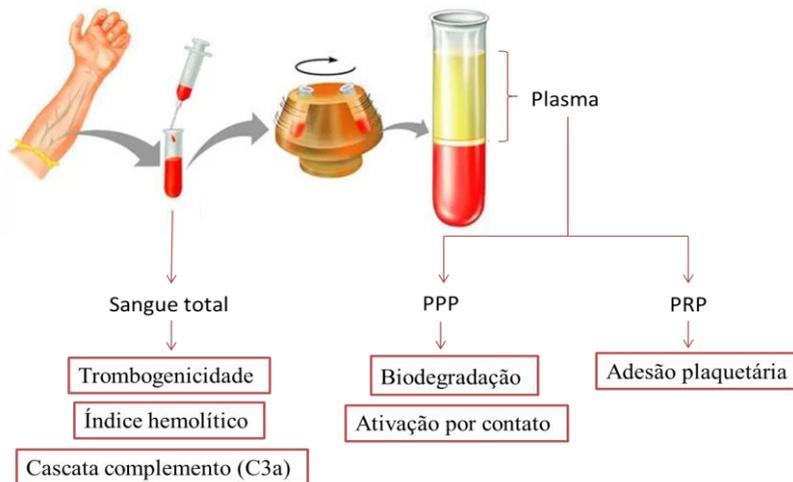
Participaram desta pesquisa voluntários com idade entre 18 a 40 anos, saudáveis, que não fizeram uso de anticoagulante, contraceptivos orais ou qualquer outro medicamento que possa influenciar nos processos de hemostasia. Não participaram deste estudo: gestantes, etilistas, fumantes, bem como qualquer portador de patologia pré-existente relacionada com a coagulação sanguínea. Nessa parte do estudo foi solicitado cinco indivíduos, do qual foi coletado 20 mL de sangue por indivíduo.

#### 4.3.3 Material biológico

O sangue humano necessário para os estudos de hemocompatibilidade foram coletadas pelo sistema a vácuo, em tubos apropriados contendo anticoagulante, no InteLab/UFSC. Todos os

experimentos foram realizados no Intelab. Foi coletado sangue através de punção venosa com seringa e agulhas estéreis, coletado em frascos contendo anticoagulante tampão citrato 0,109 M a 3,2%. A coleta de sangue somente foi realizada após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecida, em anexo no apêndice A. Foi formado um biorrepositório de caráter transitório e de curta duração para os testes de hemocompatibilidade, que foi eliminado ao término dos experimentos. O sangue foi utilizado de três formas distintas, sangue total, plasma pobre em plaquetas (PPP) e o plasma rico em plaquetas (PRP) para diferentes testes de hemocompatibilidade (Figura 12).

Figura 12: Representação esquemática dos testes de hemocompatibilidade.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.3.4 Biodegradação em plasma sanguíneo humano

Os estudos de biodegradação foram realizados em plasma humano em um período de seis semanas, seguindo metodologia descrita por Ferreira e colaboradores (Ferreira, Coelho e Gil, 2008). Cada membrana de BNC e BNC-Hep foi liofilizada e seu peso foi registrado. Em seguida, colocadas dentro de tubos de vidro onde foi adicionado um mL de plasma. Todos os tubos foram fechados e incubados a 37 °C. Em períodos pré-definidos de tempo (48 h e 1, 2, 4 e 6 semanas) três amostras foram removidas do plasma, lavadas com PBS e liofilizadas. Sua massa foi

registrada para calcular a variação da massa. Uma das amostras retiradas no período de incubação de seis semanas, foi reservada para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). O plasma recolhido no decorrer do experimento foi analisado através de ensaio enzimático para determinação de glicose onde 10 µL de plasma foram adicionados a 1000 µL do reagente de cor (glicosidase, peroxidases e 4-aminoantipiridina) e após 10 minutos leu-se a absorbância a 505 nm. O resultado foi comparado a um padrão de glicose nas mesmas condições do teste. Para quantificar a liberação de heparina das membranas BNC-Hep foi utilizado o método do Azul de toluidina já descrito na seção 4.2.3.

#### **4.3.5 Adesão plaquetária**

A avaliação da adesão plaquetária foi realizada seguindo metodologia descrita na literatura (ANDRADE et al., 2011), com modificações. O sangue humano total anticoagulado com citrato foi centrifugado a 2300 rpm a 4 °C durante 4 minutos para se obter o plasma rico em plaquetas (PRP). As membranas de BNC e BNC-Hep foram hidratadas com PBS por cinco vezes durante 10 minutos cada. As membranas reidratadas foram transferidas para o PRP pré-aquecido a 37 °C e incubadas 30 min, e lavadas cuidadosamente com PBS para remover as plaquetas fracamente aderidas. As plaquetas aderentes sobre a superfície das membranas foram fixadas com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em PBS durante 10 min a temperatura ambiente. As plaquetas fixadas sobre a membrana foram lavadas três vezes com PBS, secas e visualizadas por MEV. Como controles foram utilizadas membranas de PTFE e silicone.

#### **4.3.6 Trombogenicidade**

A avaliação da formação de trombos nas superfícies das membranas de BNC e BNC-Hep foi realizada utilizando o método gravimétrico de Imai e Nose (IMAI; NOSE, 1972) com modificações. Sangue humano com anticoagulante foi usado para este fim. Antes da realização dos testes, as membranas foram imersas em solução de PBS a uma temperatura constante de 37 °C. Após 48 h de incubação, o PBS foi removido e o sangue anticoagulado foi adicionado, ficando em contato com a superfície das membranas BNC e BNC-Hep e também com uma superfície de vidro vazia, que atuou como controle positivo. O teste de coagulação do sangue foi iniciado pela adição de 0,02 mL de uma solução 0,10 M de cloreto de cálcio e foi finalizado após 45 minutos através da

adição de cinco mL de água. Os coágulos resultantes foram fixados com cinco mL de solução de formaldeído 36% e, em seguida, secos em papel filtro e pesados.

#### **4.3.7 Coagulação dinâmica**

Os ensaios foram realizados pela recalcificação do sangue total anticoagulado com citrato 3,2%, como descrito por Li e colaboradores (Li et al., 2001) com modificações. Membranas de BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe foram colocadas na parte inferior de um frasco de 100 mL que foi pré-aquecido em banho-maria a 37 °C durante 5 min. Subsequentemente, 0,25 mL de sangue total anticoagulado foi gotejado sobre a superfície da membrana e foi mantido a 37 °C durante 5 min, após esse tempo 0,02 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub> 0,2 M foi gotejada para induzir o início da cascata de coagulação do sangue (Tempo 0). Os frascos foram agitados durante 1 min para misturar uniformemente o CaCl<sub>2</sub> com o sangue. O aquecimento dos frascos foi contínuo a 37 °C durante um tempo pré-determinado (10, 20, 30, 40 e 50 min). Nos tempos determinados os frascos foram removidos do banho-maria e foi agitado durante 10 minutos, seguido da adição de 50 mL de água destilada para lisar os eritrócitos livres. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro UV-VIS. Foi realizado um controle composto por 50 mL de água destilada e 0,25 mL de sangue total anticoagulado.

#### **4.3.8 Potencial hemolítico**

Os ensaios de hemólise foram realizados como descrito pela American Society for Testing and Materials (ASTM, 2000). Três amostras da membrana BNC e BNC-Hep em ambos os lados densos e porosos foram colocadas em tubos de ensaio de polipropileno e foram adicionados dois mL de PBS. Depois de 48 h de incubação a 37 °C o PBS foi retirado e mais dois mL de PBS a 37° C foi colocado sobre as membranas, por fim 300 µL de sangue diluído 1,25 vezes em PBS foi adicionada a cada amostra. Os controles positivos e negativos foram preparados por adição da mesma quantidade de sangue diluído em dois mL de água e PBS, respectivamente. Cada tubo foi invertido suavemente duas vezes a cada 30 min para manter contato do sangue com o material, durante 3 horas. Após a incubação, cada fluido foi transferido para um tubo apropriado e centrifugado a 2000 rpm durante 15 min. A

hemoglobina liberada por hemólise foi medida pela DO dos sobrenadantes a 540 nm utilizando um espectrofotômetro. A percentagem de hemólise foi calculada como descrito na equação abaixo.

$$\text{Potencial hemolítico (\%)} = \left( \frac{DO_{\text{teste}} - DO_{\text{controle negativo}}}{DO_{\text{controle positivo}} - DO_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100$$

Para confirmar que a hemoglobina oxigenada foi lida a 540 nm foi realizada uma varredura espectral de 350-750 nm em espectrofotômetro UV-Vis para confirmar bandas características.

#### 4.3.9 Ativação por contato

O PPP contendo anticoagulante foi preparado por centrifugação do sangue humano a 3500 rpm por 15 min. As membranas BNC e BNC-Hep e os controles silicone e PTFEe foram colocadas em contato com o PPP a uma temperatura de 37 °C durante 10 min. Após a ativação por contato a formação do trombo foi avaliada por meio de uma cinética acompanhada a 540 nm em espectrofotômetro a 37 °C. Como controle os testes foram realizados no plasma retirado diretamente do tubo de coleta. Todos os kits para quantificação da ativação por contato foram adquiridos da Labtest (LAGOA SANTA – MG)

##### 4.3.9.1 Tempo de trombolastina parcialmente ativada (APTT)

As medições do tempo de trombolastina parcialmente ativada foram realizadas com 100 µL de PPP que esteve em contato com as membranas por 10 min, seguida pela adição de 100 µL do reagente I (ácido elágico ≥99 µmol/L; fosfolípídeo de cérebro de coelho ≥0,007%; fenol 320 mmol/L, albumina bovina 0,005%) por 5 minutos, por fim foi adicionado o reagente II (cloreto de cálcio 20 mmol/L) pré-aquecido em seguida foi avaliado o tempo de formação do trombo.

##### 4.3.9.2 Tempo de protrombina (PT)

As medições do tempo de protrombina foram realizadas com 100 µL de PPP que esteve em contato com as membranas por 10 min, seguida pela adição de 200 µL do reagente I (extrato de cérebro de coelho ≥2% em tampão tricina 74,8 mmol/L, cloreto de cálcio 22,2 mmol/L) pré-aquecido a 37 °C, seguido simultaneamente pela avaliação do tempo de formação do trombo.

#### 4.3.9.3 Tempo de trombina (TT)

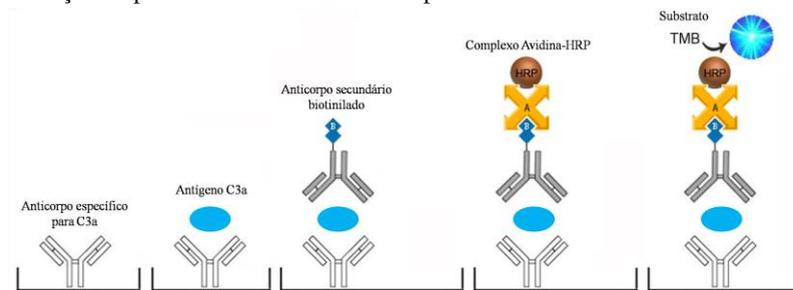
A medida do tempo de trombina foi realizada por adição de 100  $\mu\text{L}$  de PPP que esteve em contato com as membranas por 10 min, diluída 10 vezes no reagente I (tampão imidazol 50 mmol/L, azida sódica  $\leq 0,095\%$ ; polímero coloidal) e deixada em repouso por 6 min a 37 °C, seguida da adição de 100  $\mu\text{L}$  do reagente II (trombina bovina 100 unidades NHI/mL, albumina de soro bovino fração V 0,9%, tampão Tris 123 mmol/L) não aquecida. Em seguida foi avaliado o tempo de formação do trombo.

#### 4.3.10 Ativação da cascata complemento

Para avaliar a ativação da proteína C3 da cascata complemento (Elabsience, EUA), foi utilizado um ensaio comercial imunoenzimáticos ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*). O sangue total foi incubado com as amostras BNC e BNC-Hep durante 2 h e posteriormente foi centrifugado durante 20 min a 2000 g (4 °C) para se obter plasma pobre em plaquetas.

A Figura 13 mostra um esquema representativo do funcionamento da microplaca ELISA que fornece uma camada pré-revestida com um anticorpo específico para C3a. Padrões ou amostras (PPP) que contém os antígenos foram adicionados aos poços da microplaca ELISA e foram ligados aos seus anticorpos específicos. Em seguida, um anticorpo secundário biotilado de detecção específica para C3a foi conjugado, chamado Avidina-Horseradish Peroxidase (HRP) que foi adicionado a cada poço sucessivamente e incubado. Os componentes livres foram lavados. A solução do substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionada a cada poço e apenas os poços que contém C3a, anticorpo de detecção biotilado conjugado com Avidina-HRP apareceu com cor azul. A reação enzima-substrato foi terminada pela adição de uma solução de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A densidade óptica (DO) foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm. O valor de DO foi proporcional à concentração de C3a, que foi calculado por meio de uma curva padrão de C3a.

Figura 13: Esquema representativo de funcionamento do Kit ELISA para detecção da proteína C3a da cascata complemento.



Fonte: Adaptado de (LIFESPAN BIOSCIENCES).

#### 4.4 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR

As linhagens primárias de célula muscular lisa (HASMC) e endotelial (HAEC) de aorta humana foram adquiridas da Lonza® (Basel, Suíça) e gentilmente cedidas pela Dra Ayumi Aurea Miyakawa do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP).

As HASMCs foram rotineiramente mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco®-Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, EUA) a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

As HAECs foram rotineiramente mantidas em meio para crescimento de células endoteliais (EGM-2) suplementado com 2% em volume de SFB, ácido ascórbico, hidrocortisona, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos-2, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento similar à insulina-1, 100 U/mL de penicilina e 100 µM de estreptomicina (Lonza®, Suíça), pH 7,2, a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

HASMC e HAEC foram repicadas quando atingiram a confluência de aproximadamente 80% de preenchimento das placas de cultura de tecidos. O repique iniciou-se com a remoção do meio de cultura seguido de três lavagens com solução PBS para remoção das proteínas da superfície das células. Logo após, foi adicionado 1mL de solução de TrypLE™ Express Enzyme (Triplex). As placas de cultura de tecidos foram transferidas para a estufa incubadora Ultrasafe HF 212UV durante 6 minutos para ativação do triplex e descolamento das células aderidas.

Na câmara de fluxo o triplex juntamente com as células foram removidos e transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas por 3 minutos a 25 °C e 1.200 rcf. A solução sobrenadante, triplex, foi removida 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), que em seguida foram distribuídas em novas placas conforme o planejamento dos experimentos ou para os testes. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas de cultivo.

#### 4.4.1 Viabilidade celular

Membranas de BNC e BNC-Hep estéreis foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços sob fluxo laminar e 500 µL de meio de cultura DMEM ou EGM-2 foram adicionados sobre as membranas que permaneceram em estufa (37° C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas.

A viabilidade celular foi determinada 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 lado denso das membranas e as HAECs no lado com poros maiores na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> (BÄCKDAHL et al., 2006). A viabilidade celular foi avaliada em função do tempo de cultura 1, 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 para evitar falso positivo (as células que eventualmente passaram pela lateral da membrana e aderiram no fundo da 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 permaneceram 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 cultivadas diretamente na placa de cultura; o grupo controle positivo constituiu-se de membranas de BNC e BNC-Hep sem a inoculação de células para avaliar a retenção do MTS nas membranas. O ensaio do MTS quantifica, através da medida de concentração, o formazan solúvel resultante de uma reação de redução do 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.

#### 4.4.2 Imunocitoquímica

As células foram fixadas com formaldeído 4% por 15 min, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,1%) durante 15 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 1% de albumina de SBF em PBS durante uma hora e, após nova lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários específicos segundo a tabela 1, por 14 horas a 4 °C. Após este período, procederam-se três lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) e em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a fluorocromo durante uma hora. Após nova lavagem com PBS-Tween 20, as células foram incubadas com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (50 ng/mL) durante 15 s, à temperatura ambiente, para marcação dos núcleos celulares. As marcações foram analisadas em microscópio de fluorescência.

Tabela 2: Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímica.

<i>Fenótipo</i>	<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Diluição</i>	<i>Anticorpo Secundário</i>	<i>Diluição</i>
Célula de Músculo Liso	Anti- $\alpha$ SMA (anti $\alpha$ actina de músculo liso) – IgG2a de Camundongo	1:500	Cabra contra IgG2a de camundongo conjugado a Alexa594	1:900
Célula Endotelial	Anti - CD31 – IgG1 de camundongo	1:100	Cabra contra IgG1 de camundongo conjugado a Alexa 488	1:500

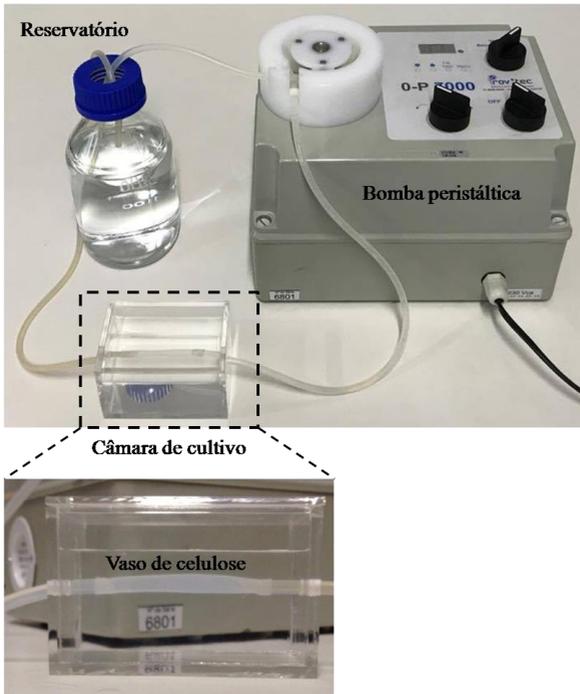
#### 4.4.3 Co-cultura nos vasos de BNC-Hep

Os vasos de BNC-Hep foram previamente semeados com células HASMC no lado externo (superfície mais porosa) na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em condições estáticas, em uma placa de cultura durante 4 dias, com trocas de meio de cultura a cada 48 horas, utilizando meio DMEM. Após as HASMCs estiverem aderidas, as HAECs foram semeadas no lúmen, lado interno (superfície mais densa) na densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em condições estáticas, por mais 4 dias cultura, com trocas de meio de cultura a cada 48 horas, nesta segunda etapa foi utilizado um meio composto da mistura 1:1 dos meios DMEM e EMG-2.

#### 4.5 SISTEMA DE FLUXO PULSANTE

O sistema de fluxo pulsante foi projetado como um sistema de perfusão de *loop* fechado, o qual proporcionou um ambiente para cultura do vaso BNC-Hep sob condições de fluxo. Como mostrado na Figura 14, o reator consiste em quatro partes: uma câmara de cultura, uma bomba peristáltica, reservatório de meio de cultura e tubulações. A câmara de cultura foi construída em acrílico com duas entradas laterais de 4 mm, onde se acoplará o vaso pelo lado interno, e pelo lado externo as tubulações que permitem o fluxo contínuo.

Figura 14: Sistema completo de fluxo pulsante: câmara de cultura, vaso de nanocelulose, reservatório do meio de cultura, tubulações de silicone e bomba peristáltica.



O reservatório de meio possui 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  $\mu\text{m}$ . As tubulações são todas de silicone, e será utilizada uma bomba

peristáltica Provitec 0-P 7000 (Provitec, Jardim Satélite, São Paulo, Brasil) para promover o fluxo pulsante de 1 Hz. Todo o sistema foi autoclavado, com exceção da bomba peristáltica e da câmara de acrílico que foi esterilizado em glutaraldeído 2%. Por fim todo o sistema foi montado dentro da estufa incubadora, para operação à temperatura de 37 °C e sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.5.1 Biorreator de fluxo pulsante**

Depois das HASMC e HAEC estarem aderidas completamente (seção 4.4.3) o vaso celularizado foi colocado na câmara de cultura do sistema de fluxo pulsante, este sistema de fluxo pulsante mais estrutura tubular de BNC-Hep foi denominado biorreator de fluxo pulsante. O meio de cultura na área externa do vaso em contato com as HASMC foi DMEM (Gibco®-Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, EUA). O meio de cultura para as HAEC foi o meio do reservatório que passará pelo lado interno do vaso (lúmem) e foi o meio EGM-2 suplementado com 2% em volume de SFB, ácido ascórbico, hidrocortisona, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos-2, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento similar à insulina-1, 100 U/mL de penicilina e 100 µM de estreptomicina (Lonza®, Suíça).

Após o biorreator de fluxo pulsante montado dentro da estufa com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C 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, sob um regime escoamento laminar. Os vasos foram analisados após sete dias em condições dinâmicas e estáticas por meio da viabilidade e imunocitoquímica, como já descrito anteriormente nas seções 4.3.1 e 4.3.2.

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software Origin 8.0 (OriginLab Data Analysis and Graphing Software. OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os resultados experimentais foram expressos como média ± 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  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

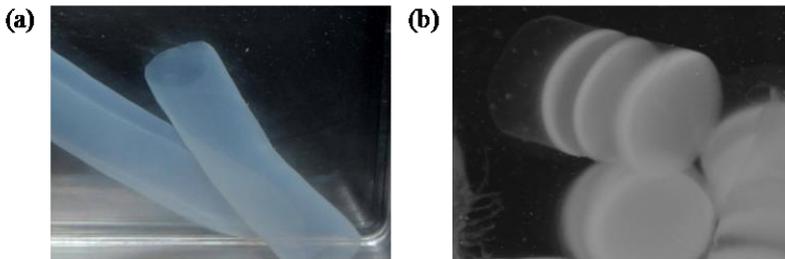
---

### 5.1 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS E ESTRUTURAS TUBULARES DE NANOCELULOSE BACTERIANA

A nanocelulose bacteriana foi produzida quando a bactéria *Komagataeibacter hansenii* foi cultivada em meio de cultura à base de manitol em condições estáticas de cultura, formando assim um filme de celulose na interface líquido/ar. Assim, o aparato desenvolvido neste trabalho (Figura 10) possibilita a produção de estruturas tubulares de BNC 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 um compressor de ar. Trabalhos anteriores mostraram que membranas de celulose podem formar-se sem a circulação de ar (Oliveira, Rambo e Porto, 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 a estrutura tubular de BNC é formada 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.

As estruturas tubulares de BNC produzidos neste trabalho possuem dimensões variando de 5-10 cm de comprimento, 1-4 mm de diâmetro e  $1,01 \pm 0,2$  mm de espessura (Figura 15a) que é considerado um vaso de pequeno calibre (Coleman, 2010). Trabalhos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa demonstraram que as estruturas tubulares produzidas por este método apresenta alto alongamento relativo sob tensão, antes de romper, tendo a ruptura ocorrido a uma deformação de  $24,5 \pm 2,8\%$  e resistência à ruptura de  $0,18 \pm 0,026$  MPa que são valores compatíveis com vasos nativos (Colla e Porto, 2014; Colla, 2014). Do mesmo modo membranas foram produzidas em placas de cultura de 24 poços com diâmetro de 14,4 mm (Figura 15b).

Figura 15: Fotos de (a) estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana e (b) membranas de nanocelulose bacteriana.



A BNC 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 líquido (Borzani e Souza, 1995). Em sua extensão, a BNC ocupa toda a superfície do meio de cultura, resultando em um filme que geralmente apresenta o formato do frasco de cultivo, ou onde houver uma interface líquido/ar.

As estruturas tubulares e membranas de BNC biossintetizadas em condições estáticas de cultivo apresentaram superfícies macroscopicamente distintas, como já amplamente discutido em publicações de nosso grupo (Colla e Porto, 2014; Berti et al., 2013). A microestrutura BNC obtidas por meio do corte transversal 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 que se organizam de forma espaçada (baixa densidade de nanofibras de celulose) (Colla, 2014).

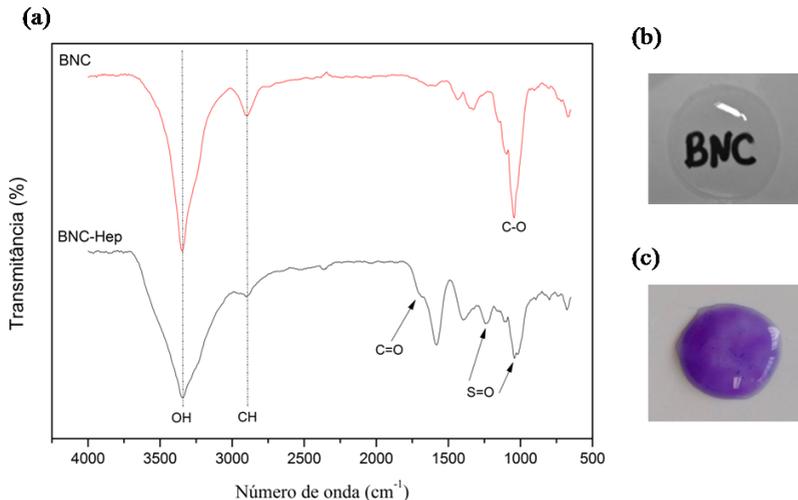
## 5.2 MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

A BNC foi oxidada seletivamente para converter grupos hidroxilas livres dos carbonos CH<sub>2</sub> da glicose (carbono C<sub>6</sub>) em ácidos carboxílicos por meio da oxidação mediada por radicais  $\cdot\text{NO}_2$ ,  $\text{HNO}_2^+$  e  $\text{NO}^+$  (KUMAR; YANG, 2002). Em geral, uma vez que o  $\text{HNO}_3$  contém pequenas quantidades de óxidos de nitrogênio incluindo  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_5$ , entre outros, a oxidação de compostos polissacarídicos por  $\text{HNO}_3$  sozinho é lenta e requer frequentemente um catalisador (por exemplo,

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e um iniciador (por exemplo, NO<sub>2</sub> ou NaNO<sub>2</sub>), e/ou aquecimento a alta temperatura. Neste trabalho, a oxidação da BNC foi realizada no sistema de mistura HNO<sub>3</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NaNO<sub>2</sub> a temperatura ambiente (XU et al., 2014) (Figura 11a).

Uma vez a BNC oxidada os grupos carboxílicos foram ativados com EDC permitindo a posterior imobilização covalente da heparina no grupamento ácido carboxílico e liberação do derivado do EDC (Figura 11b). Os espectros de FTIR comprovaram a presença de heparina em BNC-Hep (Figura 16). As bandas características de BNC apareceram em 3345 cm<sup>-1</sup> e 2898 cm<sup>-1</sup>, onde as bandas de absorção são atribuídas aos grupos hidroxila e ligações carbono e hidrogênio, respectivamente, além do estiramento típico de ligação carbono oxigênio em 1040 cm<sup>-1</sup> (Bae, Seo e Kang, 1999). A BNC-Hep mostrou um pico largo de absorção entre 3100-3690 cm<sup>-1</sup> que foi atribuído a absorção de estiramento sobrepostas dos grupos N-H e OH, foram observadas outras bandas características de heparina em 1701 cm<sup>-1</sup> (C=O) e 1248 cm<sup>-1</sup> (S=O) (Wan et al., 2011). A quantidade de heparina imobilizada na BNC foi quantificada pelo ensaio do corante azul de toluidina, que revelou uma densidade de imobilização de 12,3 µg·cm<sup>-2</sup>, aproximadamente 2,6% do peso seco da BNC-Hep. O corante azul de toluidina quando conjugado com heparina muda sua coloração de azul para roxo (Wang et al., 2015).

Figura 16: (a) Espectroscopia FTIR das membranas BNC e BNC-HEP (b) membrana BNC-Hep (c) membrana BNC-Hep corada com azul de toluidina.



A imobilização e caracterização de heparina em fibras de BNC já foram realizadas com sucesso no desenvolvimento de *scaffolds* para mimetizar a matriz extracelular natural e para promover a compatibilidade com sangue. A morfologia da nanofibra híbrida BNC e heparina foi observada por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. O híbrido foi ainda caracterizado por FTIR, espectroscopia de raios X e difração de raios X (Wan et al., 2011), além da presença da heparina ser confirmada pela conjugação com o corante azul de toluidina (Reis et al., 2016).

### 5.3 HEMOCOMPATIBILIDADE

Neste trabalho, a BNC e BNC-Hep foram utilizados para conduzir uma avaliação da hemocompatibilidade. Curiosamente, embora as aplicações destes materiais baseados em BNC estão bem documentadas para aplicações em engenharia tecidual, falta uma investigação mais profunda sobre a interação destes materiais quando em contato com o sangue.

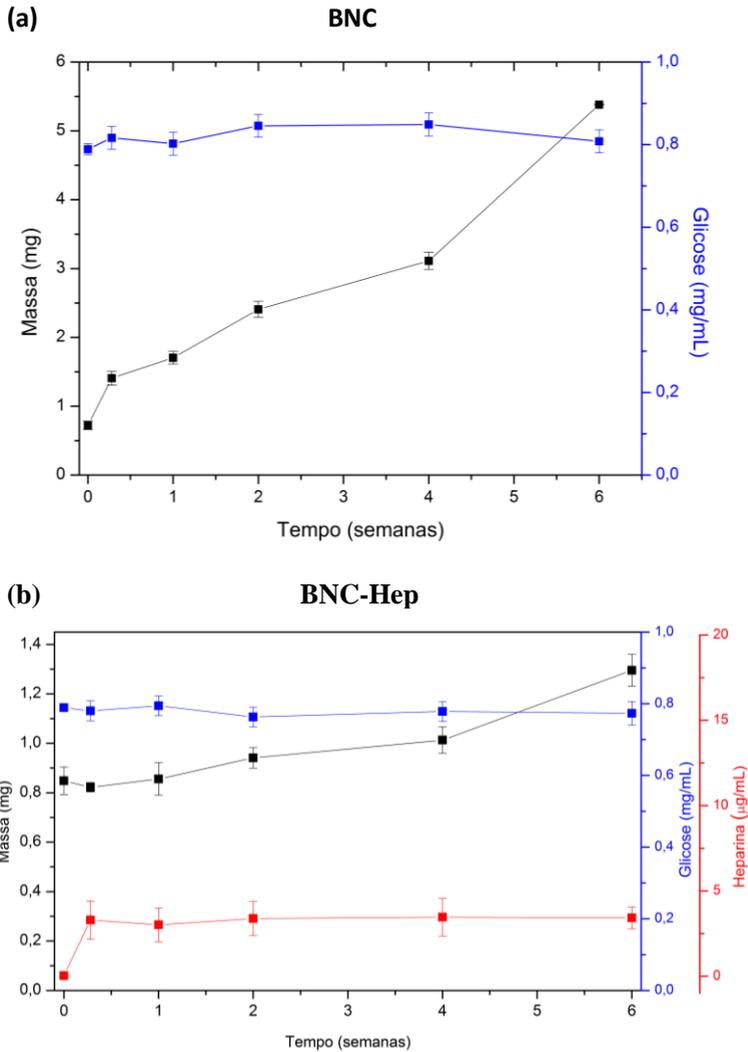
Os estudos de hemocompatibilidade foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sobre com o número de Certificado de apresentação para Apreciação Ética 48296915.8.0000.0121e número de parecer 1342025,

que podem ser consultados na Plataforma Brasil do Ministério da Saúde <<http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil/login.jsf>>.

### **5.3.1 Biodegradação em plasma sanguíneo**

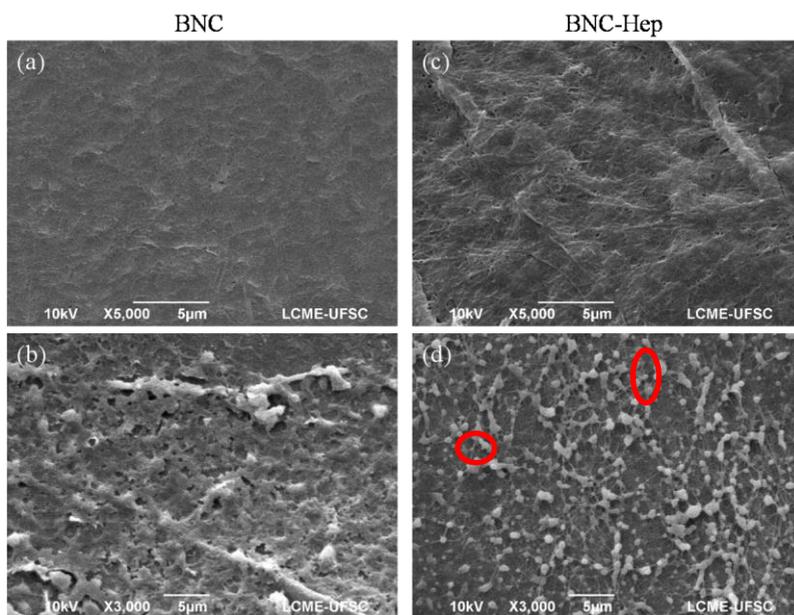
De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que não houve degradação da matriz de nanocelulose bacteriana em nenhuma das duas membranas testadas BNC e BNC-Hep. A quantidade de glicose no plasma, que seria resultante da degradação da celulose, não apresentou variação estatisticamente significativa no decorrer do experimento (Figura 17(a)). A concentração de 0,79 mg/mL de glicose presente no início do experimento é decorrente da glicose do sangue do doador e manteve-se igual durante todo o experimento. Este resultado está de acordo com dados da literatura que mostram que a BNC não se degrada em água e fluidos simulados (Li et al., 2009; Huang et al., 2014; Wang, Zhu e Du, 2011; Oliveira, Rambo e Porto, 2013).

Figura 17: Resultados de biodegradação obtidos para (a) BNC e (b) BNC-Hep durante 6 semanas de incubação em plasma. (■) massa (mg) (■) glicose (mg/mL) (■) heparina ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ).



Uma vez que se esperava uma massa constante das membranas, já que não houve degradação do polímero de glicose como visto na Figura 17(a), o resultado mostrou um aumento da massa das membranas como pode ser visto na Figura 17. Analisando o gráfico temos que a massa das membranas aumentou 7,5 vezes para BNC e 1,5 vezes para BNC-Hep no período observado de seis semanas. A análise de MEV do último ponto do ensaio, Figura 18, proporcionou uma diferente abordagem sobre o acréscimo de massa das membranas.

Figura 18: Micrografias da BNC e BNC-Hep (a) e (c) tempo zero da biodegradação (b) e (d) após seis semanas de biodegradação.



Como visto nas imagens de MEV, Figura 18 (a) e (c), as membranas antes de serem expostas ao plasma sanguíneo, apresenta uma superfície densa e lisa, Figura 18 (c). Nas Figuras 18 (b) e (d), nota-se a formação de uma rede de fibrina sobrepondo as células aderidas, plaquetas e eritrócitos constituintes do plasma para as duas membranas testadas, principalmente para a BNC, onde não é possível visualizar a superfície original da membrana. A formação dessa rede e a aderência das células à superfície do material inferem que, ao entrar em contato com o plasma, o material desencadeou a ativação das plaquetas (processo de

coagulação sanguínea) e, conseqüentemente, a formação de uma rede de fibrina e a entrada dos eritrócitos na estrutura tridimensional das membranas, como já descrito na literatura para materiais que ativavam a cascata de coagulação (Gorbet e Sefton, 2006). Após as seis semanas da biodegradação em plasma sanguíneo, é possível ver uma rede de fibrina cobrindo as membranas. Porém um aspecto importante a ser salientado é que a membrana BNC-Hep teve um acréscimo de apenas 1,5 vezes sua massa inicial, além disso a rede de fibrina formada não ocupou toda a superfície da membrana, sendo possível visualizar algumas fibras da nanocelulose Figura 17(d), indicado pelos círculos vermelhos, resultando assim a importância do papel da heparina no controle da coagulação sanguínea.

Devido à meia-vida curta da heparina no corpo quando livre, uma administração contínua é frequentemente requerida. Esta administração deve ser conduzida de forma altamente controlada para prevenir complicações hemorrágicas (Edelman et al., 2000). Assim, as membranas BNC-Hep foram investigadas quanto à liberação da heparina no plasma sanguíneo *in vitro*. O método de imobilização da heparina na BNC utilizado nesse trabalho origina ligações covalentes entre os grupos funcionais da celulose e heparina. Analisando a concentração de heparina no decorrer do experimento, Figura 16(b), nas primeiras 24 horas de ensaio, houve liberação de heparina de 3,3 µg/mL, que permaneceu constante no decorrer do ensaio. Esta liberação pode ser atribuída a moléculas de heparina que estavam adsorvidas fisicamente na membrana, através de ligações de hidrogênio, ou uma hidrólise inicial das ligações éster ou amida entre os grupos ácidos carboxílicos e a heparina (Kang et al., 1996). Seu aparecimento no plasma, evidencia que a BNC-Hep não libera toda heparina ligada, assim evitando possíveis complicações hemorrágicas proveniente de uma alta concentração de heparina. Além disso, quando se analisa a Figura 17(d), nota-se que a quantidade de heparina restante na membrana foi suficiente para diminuir significativamente o processo de formação da rede de fibrina.

### 5.3.2 Adesão plaquetária

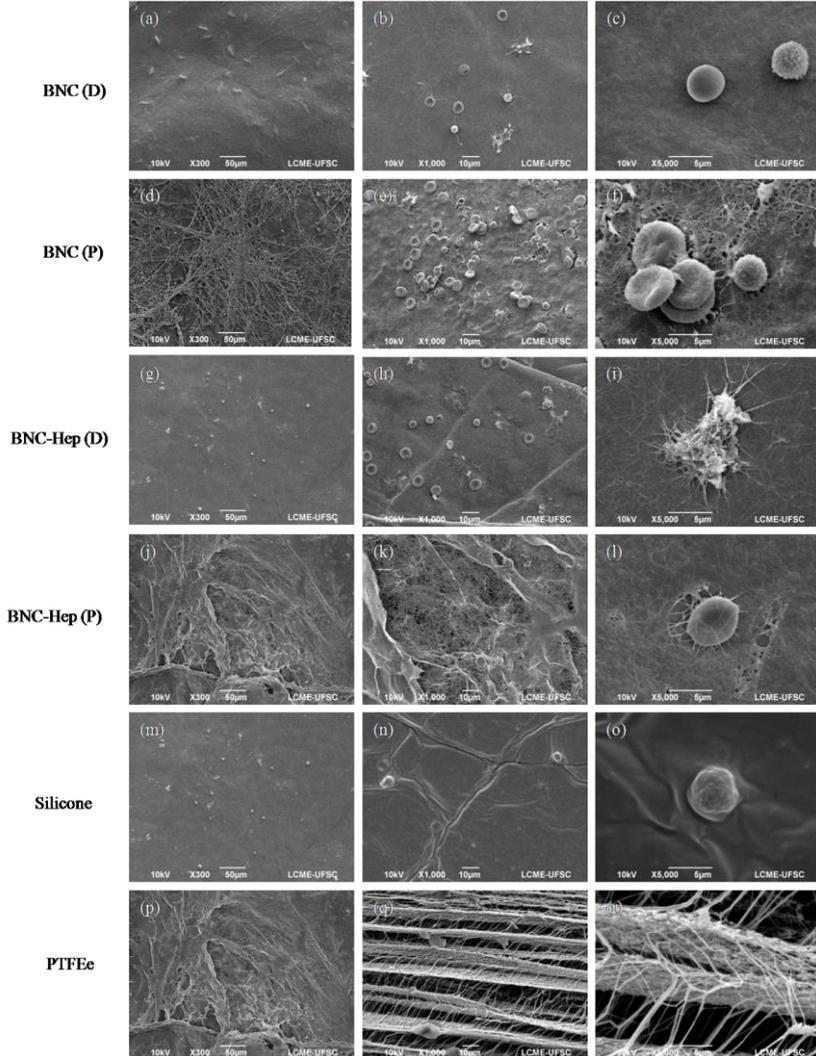
A adesão e a ativação das plaquetas a um material estranho é regulada pela camada de proteínas plasmáticas inicialmente adsorvidas no material. Após adesão e agregação, as plaquetas ativadas podem ainda ativar muitos tipos de fatores de coagulação, resultando em uma rede de fibrina não solúvel com posterior formação do trombos na superfície do material (Lin, Yu e Yang, 2005). Assim, a adesão plaquetária no BNC e

BNC-Hep é um teste importante para a avaliação da compatibilidade com o sangue. A forma das plaquetas aderidas deve ser cuidadosamente observada por MEV, por exemplo. As plaquetas ativadas, apresentam rugosidade na membrana celular e/ou pseudópodes esticados, acompanhados pela agregação das plaquetas (Li et al., 2012).

A Figura 19 mostra as plaquetas aderidas às superfícies dos materiais testados BNC, BNC-Hep, nos seus diferentes lados, denso (D) e poroso (P), além dos controles, silicone e PTFEe. Na BNC (D), Figuras 19(a)-(b), notou-se a presença de plaquetas aderidas e isoladas, algumas com morfologia normal e outras já ativadas com presença de pseudópodes, indicando uma trombogenicidade média do material, pois não há presença de extensa rede de fibrina. Na superfície porosa da membrana BNC (P), Figuras 19(d)-(f), ocorreu à formação de uma grande rede de fibrina, com a aderência e agregação de plaquetas ativadas e hemácias. Este lado é caracterizado como material potencialmente trombogênico. Este resultado está de acordo com achados da literatura, onde membranas de BNC apresentaram aderência e ativação das plaquetas, contudo o trabalho não avaliou a diferença entre a microestrutura da BNC (Leitão et al., 2013; Andrade et al., 2011).

As membranas modificadas com heparina apresentaram uma trombogenicidade reduzida quando avaliadas pelo teste da adesão plaquetária comparadas com a BNC pura. Na BNC-Hep (D), Figuras 19 (g)-(i) é possível visualizar poucas plaquetas rompidas produzindo rede de fibrina, além de eritrócitos aderidos na superfície. Na BNC-Hep (P), Figuras 19(j)-(l), visualizou-se apenas algumas plaquetas aderidas, porém não ativadas, sem presença de rede fibrina, e também sem presença de hemácias, caracterizando o material com pouca aderência de plaquetas e compatível com sangue (Ye et al., 2016). Pode-se sugerir que esse comportamento se dá pelo fato de que o lado poroso da BNC possui mais sítios de ligação, devido aos poros maiores, possibilitando maior incorporação do polímero de heparina nas fibras.

Figura 19: Imagens de MEV das plaquetas e eritrócitos provenientes do plasma rico em plaquetas com ampliações de 300×, 1000× e 5000× aderidas sobre BNC, BNC-Hep nos seus diferentes lados das membranas, poroso (P) e denso (D). Silicone e PTFEe foram utilizados como controles.



O material de referência silicone, Figuras 19(m)-(o), mostrou poucas plaquetas aderidas, porém com morfologia que caracteriza o estado ativado, com a membrana rugosa, entretanto, sem presença de

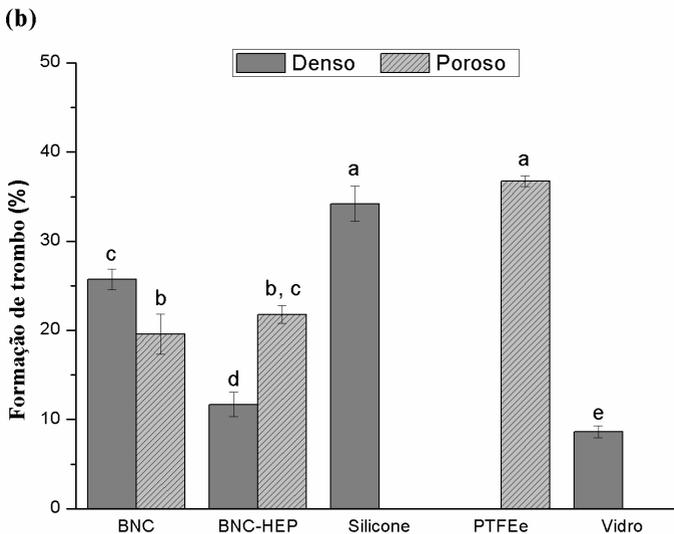
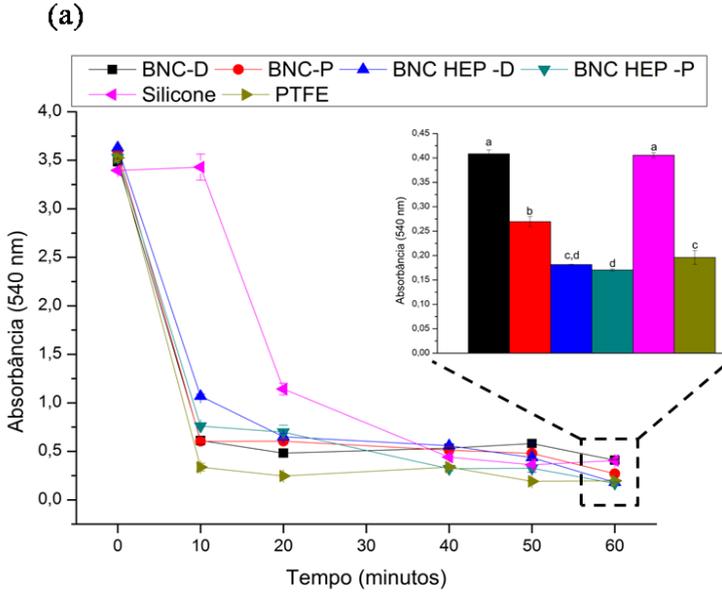
pseudópodes e rede de fibrina, já o outro material de referência PTFEe, Figuras 19 (p)-(q), não apresentou plaquetas aderidas em toda extensão, estes resultados corroboram com dados encontrados na literatura, onde estes materiais de referência apresentam o comportamento encontrado neste trabalho (Ko et al., 2001; Motlagh et al., 2006; Andrade et al., 2011).

### **5.3.3 Trombogenicidade e Coagulação dinâmica**

A coagulação dinâmica avalia o desaparecimento da coloração vermelha do sangue e a trombogenicidade avalia a formação de trombos estáveis na superfície do material testado.

Utilizou-se sangue total para avaliar os tempos de coagulação, Figura 20(a). Neste ensaio, valores de absorvância mais elevados correlacionam-se com tromboresistência melhorada do material, pois menos elementos figurados do sangue se prendem ao trombo, recentemente formado. Os resultados mostraram que, após 60 minutos de adição de cálcio, a absorvância foi 0,41; 0,40; 0,27; 0,20; 0,18 e 0,17 para o BNC(D), silicone, BNC(P), PTFEe, BNC-Hep(D) e BNC-Hep(P), respectivamente. Em cada ponto de tempo medido, o sangue incubado apresentou o mesmo perfil de coagulação dinâmica, com exceção do silicone que resistiu à coagulação nos primeiros 10 minutos.

Figura 20: Avaliação da coagulação sanguínea por meio dos testes de: (a) coagulação dinâmica (b) formação de trombos. 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 Tukey.



Surpreendentemente, a BNC-Hep apresentou uma coagulação sanguínea mais rápida do que os demais materiais testados, uma vez que esta membrana possui um anticoagulante, o processo deveria ser atrasado. Este achado pode ser o resultado de uma área de superfície maior, um parâmetro bastante difícil de controlar nestes experimentos, que influenciam diretamente a interação sangue-material (Andrade et al., 2011). O processo de oxidação mediado pelo sistema 2:1  $H_3PO_4/HNO_3-NaNO_2$  gera uma perda de massa de até 17%, conseqüentemente um aumento significativo na área superficial da nanocelulose oxidada (Xu et al., 2014). Outra explicação é a acomodação das células do sangue nos poros do material, à medida que o tamanho de glóbulos vermelhos humanos é de cerca de 6 - 8  $\mu m$  e, portanto, com a presença de poros superiores a este tamanho sobre a superfície, as células vermelhas poderiam ficar e se encaixar nele, mantendo a sua estrutura original 3D, e desaparecendo do sangue, fazendo assim com que a absorvância diminua. Por outro lado, em superfícies planas, as células vermelhas podem se fixar, mudando sua estrutura celular pelos anexos-proteicos de superfície, espalhando-se sobre a superfície do material (Zhao et al., 2015).

Contudo, o teste de trombogenicidade, Figura 20(b), foi essencial para entender melhor a atividade da heparina na formação de trombos quando incorporado na BNC. Efetivamente, apenas 11,7 e 21,7% do sangue formaram trombos estáveis na superfície das membranas BNC-Hep (P) e BNC-Hep (D), respectivamente, demonstrando que as membranas modificadas com heparina possuem uma superfície com baixa trombogenicidade, comparadas com o materiais de referência silicone e PTFEe com 34,2 e 36,7% de formação de trombo, respectivamente e o material considerado de baixa formação de trombo, o vidro (Ma, 2008), com 8,6%. A BNC pura sem modificação também apresentou uma formação de trombos menores que o silicone e o PTFEe, porém, superior ao vidro e estatisticamente igual a BNC-Hep (P).

#### **5.3.4 Potencial hemolítico**

O potencial hemolítico é uma característica importante da hemocompatibilidade usado para detectar danos aos eritrócitos causados pelos materiais (Amri et al., 2016). Na sua forma mais aguda os materiais hemolíticos podem causar anemia hemolítica severa (MALM et al., 2012)

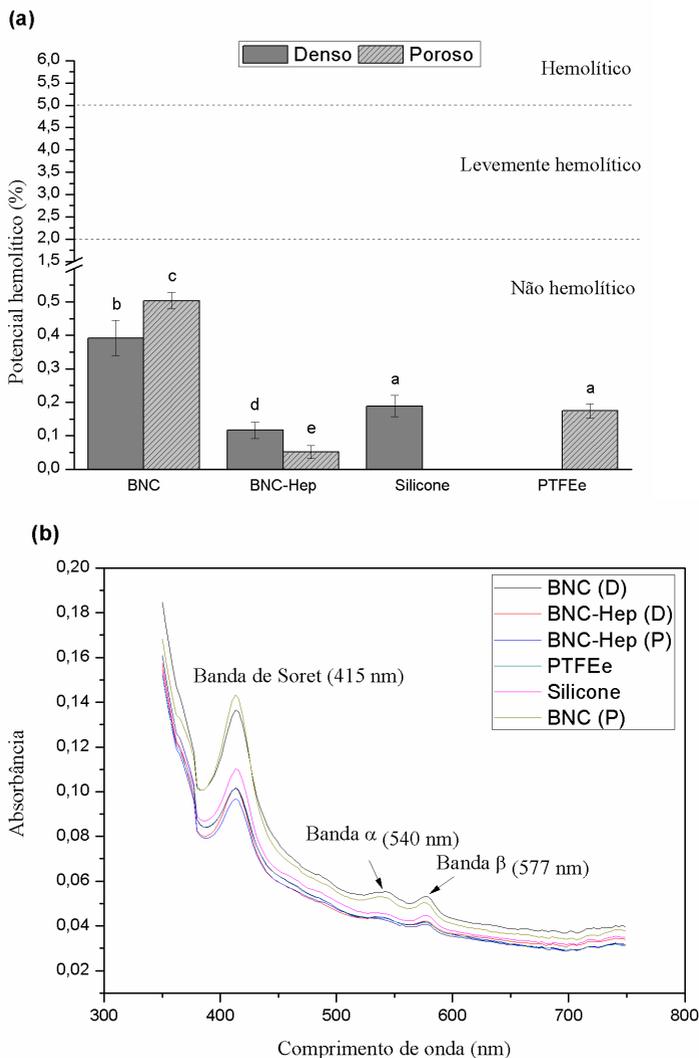
Os resultados da quantificação do potencial hemolítico durante a incubação de sangue com as membranas BNC, BNC-Hep, silicone e

PTFEe são mostrados na Figura 21(a), como controles negativo, 0% de hemólise e positivo, 100% de hemólise, o sangue foi incubado numa solução isotônica (tampão PBS) e água ultra pura, respectivamente.

Pode-se observar que a hemólise ocorre em menos de 2% dos eritrócitos, com rompimento da membrana celular e liberação da hemoglobina oxigenada, assim todos os materiais testados, são classificados como não hemolítico, uma vez que, de acordo com a ASTM , um material pode ser classificado como não hemolíticos (0-2% de hemólise), levemente hemolíticos (2-5% da hemólise) e hemolíticos (> 5% da hemólise). Trabalhos anteriores já demonstraram que a BNC é classificada como não hemolítica (Zang et al., 2015; Andrade et al., 2011), porém, não se encontrou relatos na literatura quanto a BNC imobilizada com heparina.

A fim de comprovar que a hemoglobina quantificada encontra-se na sua forma oxigenada, e que foi quantificada no comprimento de onda correto, foram realizadas varreduras espectrais ao fim do experimento, em todas as amostras testadas, Figura 21(b), pois uma possível alteração do pH plasmático poderia ocasionar uma queda da afinidade da Hb por oxigênio e sua forma desoxigenada é favorecida.

Figura 21: (a) Potencial hemolítico das membranas de BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe. 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 Tukey. (b) Espectro de absorção da oxi-hemoglobina do sangue em contato com as amostras.



As formas da hemoglobina (Hb) são diferenciadas pelos picos de absorvância bem característicos de cada estado conformacional, são elas

banda de Soret, banda  $\alpha$  e banda  $\beta$ . A meta-Hb apresenta pico máximo em 405 nm (banda de Soret) e picos menores em 500 (banda  $\alpha$ ) e 630 nm (banda  $\beta$ ). A oxí-Hb tem pico máximo em 415 nm e picos menores em 541 e 577 nm. A forma desoxigenada possui pico máximo de absorvância em 430 nm e pico menor em 555 nm (Naoum, Radispiel e Moraes, 2004).

### 5.3.5 Ativação por contato

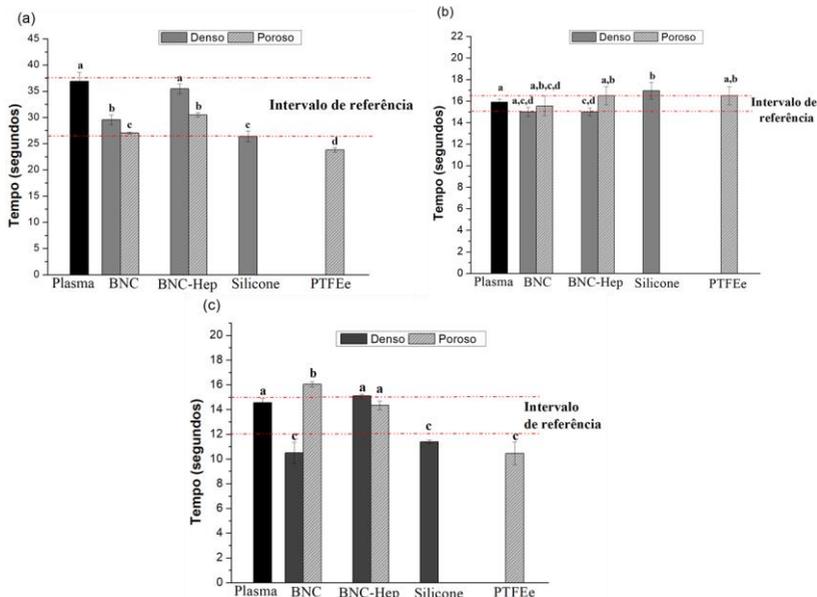
Os tempos de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) protrombina (PT) e trombina (TT) desempenharam funções diferentes na análise da hemostasia. O PT é um índice importante para demonstrar a anormalidade da coagulação sanguínea extrínseca, o APTT pode ser usado para verificar a via de coagulação sanguínea intrínseca, e o TT é usado para testar se há certa propriedade anticoagulante no sangue quando PT e APTT estão prolongados (MOTLAGH et al., 2006). Os valores normais de APTT, PT e TT estão representados na faixa de referência nos gráficos entre as linhas tracejadas, este intervalo é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Aken et al., 2004) para pessoas saudáveis.

O plasma utilizado nos testes de ativação por contato foi avaliado individualmente como controle, a fim de mostrar que o plasma estava dentro da normalidade (26,4 - 37,7 segundos) de uma pessoa saudável com valor de 37 segundos. A Figura 22(a) mostra que a BNC (D) (29,6 s), BNC (P) (27,0 s), BNC-Hep (D) (35,4 s) e BNC-Hep (P) (30,4 s) encontram-se dentro da normalidade dos tempos de APTT, sugerindo que o material não interfere na via intrínseca da coagulação. Já os materiais de referência silicone (27,3 s) e PTFE (23,8 s) estão abaixo ou muito próximos do limite inferior do APTT, é sabido da literatura que devido a alta porosidade do PTFE ele é capaz de interferir na via intrínseca da coagulação sanguínea, ocasionando trombos em regiões de bifurcação e baixo fluxo sanguíneo (Jaganathan et al., 2014).

Todos os materiais testados para o PT não tiveram efeitos significativos nos fatores de coagulação da via extrínseca, os tempos ficaram dentro dos valores de referência (15,0 – 16,5 s), como visto na Figura 22(b).

Figura 22: (a) Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) (b) tempo de protrombina (PT) (c) tempo de trombina (TT) do plasma original e do plasma em contato com os materiais BNC, BNC-Hep, silicone e PTFE. Intervalo de referência para um plasma saudável indicado entre o tracejado. 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 Tukey.



\* Intervalos de referência: LabTest (VAN AKEN et al., 2004)

Na Figura 22(c) podemos ver valores normais de TT (12,0 - 15,0 s) para o plasma (14,5 s), indicando que não existia uma propriedade anticoagulante pronunciada no sangue utilizado. Entretanto, quando analisamos a BNC pura em ambos os lados temos os tempos alterados, o plasma em contato com a BNC (D) (10,5 s) converteu o monômero de fibrina a polímero de fibrina estável mais rapidamente, enquanto a BNC (P) (16,1 s) prolongou o tempo de conversão. Os dois resultados encontram-se fora dos valores de referência. A imobilização da heparina na BNC alterou os valores de conversão para dentro de valores normais de tempo de trombina, BNC-Hep (D) (15,0 s) e BNC-Hep (P) (14,4s). Os controles silicone (11,4 s) e PTFEe (10,4 s) aceleraram a conversão da fibrina em um trombo estável.

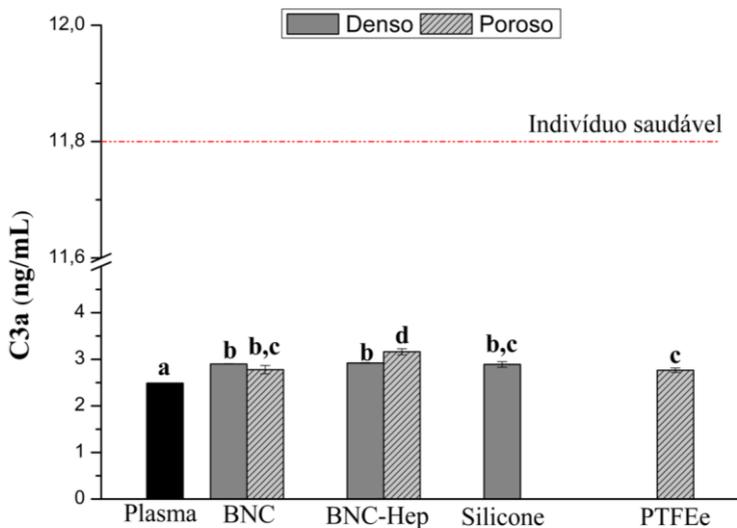
### 5.3.6 Ativação da cascata complemento

A ativação de complemento é o desencadeamento do mecanismo de defesa do hospedeiro gerado por um mediador inflamatório localizado. Membranas poliméricas geralmente ativam o complemento através da via

alternativa. A ativação do complemento pode ser medida pela determinação das anafilatoxinas geradas C3a, C4a e C5a (Idris, Yee e Kee, 2009). Neste estudo, a concentração de C3a foi determinada utilizando um ensaio ELISA para avaliação da ativação do complemento.

Conforme mostrado na Figura 23, todos os materiais testados, aumentaram a concentração de C3a em comparação com a concentração sérica (2,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Além disso, a membrana BNC-Hep (P) (3,1  $\text{ng/mL}$ ) foi a que mais ativou C3. Porém nenhum resultado encontrado está fora da normalidade da concentração de C3a em um indivíduo saudável (até 11,8  $\text{ng/mL}$ ) (Habermann et al., 2006).

Figura 23: Concentração da proteína C3a da cascata complemento do sangue total em contato com os materiais BNC, BNC-Hep, silicone e PTFEe. 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 Tukey.



Alguns pesquisadores apontaram que a ativação de contato, via alternativa do complemento, pode ser ativada por superfícies carregadas negativamente (Chonn, Cullis e Devine, 1991), como os grupos  $\text{COO}^-$  e  $-\text{SO}_3^-$ , presentes na heparina e na celulose oxidada, que são encontradas nas amostras BNC-Hep (D) e (P).

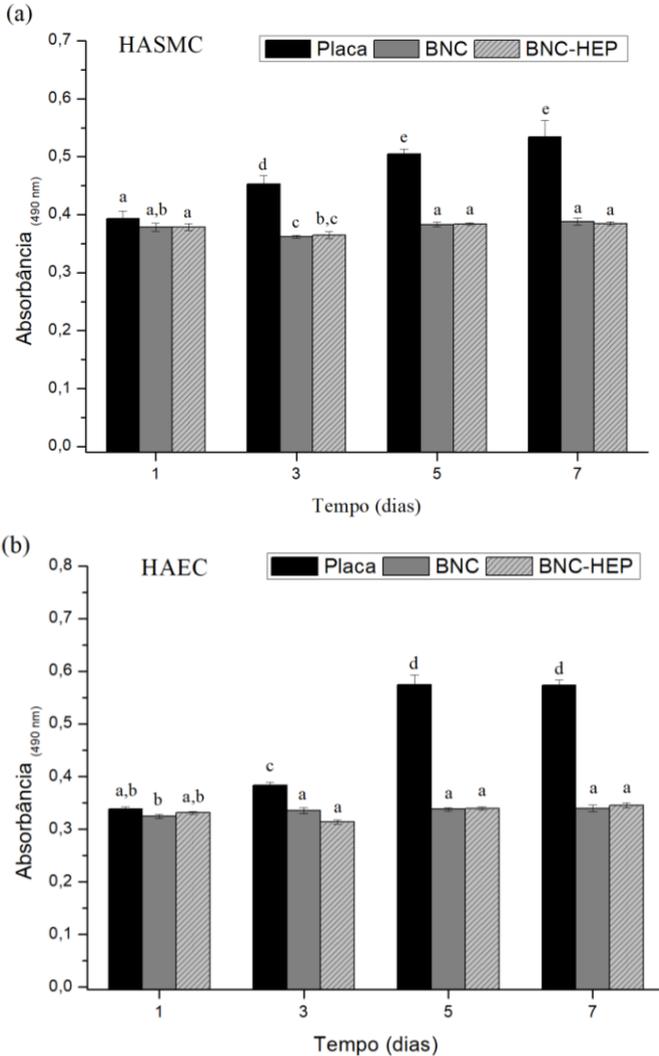
No entanto, relatos na literatura indicam também que derivados da celulose, como acetato de celulose e blendas com quitosana ativam ambos complementos e sistemas de coagulação do sangue (Peng, Li e Meng, 2017).

#### 5.4 CULTURA CELULAR

A Figura 24 mostra a viabilidade das células HASMC e HAEC cultivadas nas membranas de BNC e BNC-Hep e no fundo da placa de cultura celular (grupo controle) durante sete dias de experimento. As duas linhagens celulares testadas proliferaram similarmente nos dois materiais testados BNC e BNC-Hep, evidenciando que a imobilização da heparina na BNC não alterou a compatibilidade com linhagens celulares, já comprovada anteriormente para BNC pura por diversos trabalhos (Godinho et al., 2015; Berti et al., 2013; Stumpf et al., 2013). Contudo, quando cultivadas em TPCS apresentaram proliferação superior durante os sete dias de experimento. Pode ser observado que o perfil de proliferação de ambas as células crescidas na placa de cultura e das crescidas nas membranas não foi similar, ou seja, na placa de cultura as células cresceram continuamente, não apresentando quiescência. Lembrando que a quiescência pode estar relacionada ao equilíbrio entre morte e divisão celular, ou seja, um equilíbrio na renovação das células como acontece em todos os tecidos e órgãos do corpo (Alberts et al., 2014). Observa-se que a partir do 3º dia de cultura as células cresceram mais rápido na placa de cultura do que na superfície das membranas. Este crescimento acentuado na placa mostraram-se similares aos obtidos por Backdahl e colaboradores (2006), que utilizaram membranas de BNC como *scaffold* para cultura de células musculares lisas e também observaram viabilidade e proliferação celulares menores nas membranas de BNC do que na TPCS, utilizadas como controle em curtos períodos de cultura (Bäckdahl et al., 2006).

Nas condições de cultura testadas, as HASMC e HAEC permaneceram viáveis durante todo experimento, porém sem uma proliferação acentuada.

Figura 24: Atividade metabólica celular em membranas de BNC e BNC-Hep e controle placa em diferentes tempos de cultura (dias) de (a) HASMC e (b) HAEC. 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 Tukey.



O estado quiescente das células nas membranas de BNC, após 24 h de cultura, talvez esteja relacionado à capacidade deste biomaterial 3D

em promover um ambiente topográfico adequado para estes tipos de células, ambiente este que estabelece um importante controle das interações célula-célula e célula-biomaterial (Berti et al., 2013), similar ao ambiente *in vivo*. Desta forma, acredita-se que o material sirva como um *scaffold* para este tipo de célula, mantendo sua viabilidade e, mais importante que isso, promovendo quiescência (Methe et al., 2007).

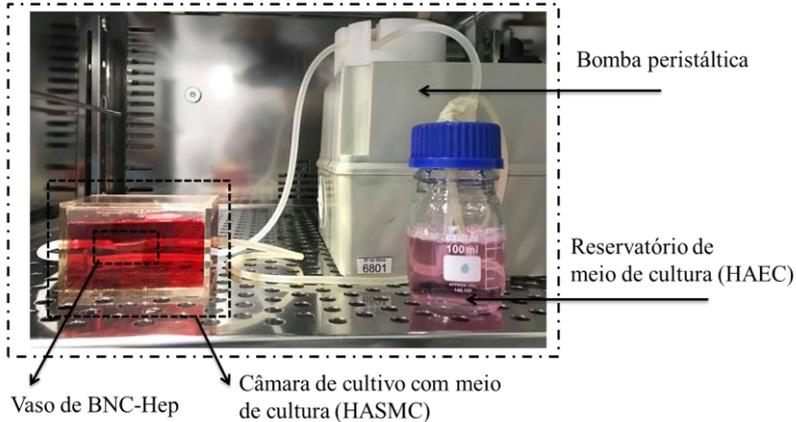
## 5.5 BIORREATOR DE FLUXO PULSANTE

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

As células do leito vascular semeadas e cultivadas nas estruturas tubulares de BNC-Hep sob condições estática e dinâmica de escoamento no sistema de fluxo pulsante foram avaliadas para o desenvolvimento de uma camada semelhante à túnica íntima e média vascular, encontrada nos vasos nativos, dando origem ao biorreator de fluxo pulsante. Em ambas as condições, dinâmica e estática, as estruturas tubulares foram inicialmente cultivadas durante quatro dias em condições estáticas, para garantir a adesão e proliferação celular, onde as HAECs foram semeadas no interior da estrutura para mimetizar o lúmen vascular, o interior da estrutura também foi o lado que apresentou a maior hemocompatibilidade, o lúmen vascular é a região do vaso sanguíneo que está em contato direto com o sangue, por este motivo este lado foi o escolhido para ser semeado com as HAECs. As HASMC foram semeadas no lado externo da estrutura para mimetizar a túnica média. Após o tempo de adesão a estrutura seguiu por 7 dias de cultura dinâmica com controle de temperatura e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, com as células expostas aos seus meios específicos, por meio do reservatório do meio de cultura que forneceu meio para as células HAEC e a câmara de cultivo com meio de cultura para as células HASMC, Figura 25, acompanhada como controle por um vaso em condição estática. Macroscopicamente, os vasos exibiram uma boa integridade, sem deformação durante os 7 dias de cultura no sistema de fluxo pulsante.

Figura 25: Biorreator de fluxo pulsante, sistema completo: câmara de controle de temperatura e atmosfera de CO<sub>2</sub>, câmara de cultivo, tubulações e bomba peristáltica, reservatório de meio de cultivo e vaso de NBC-Hep.

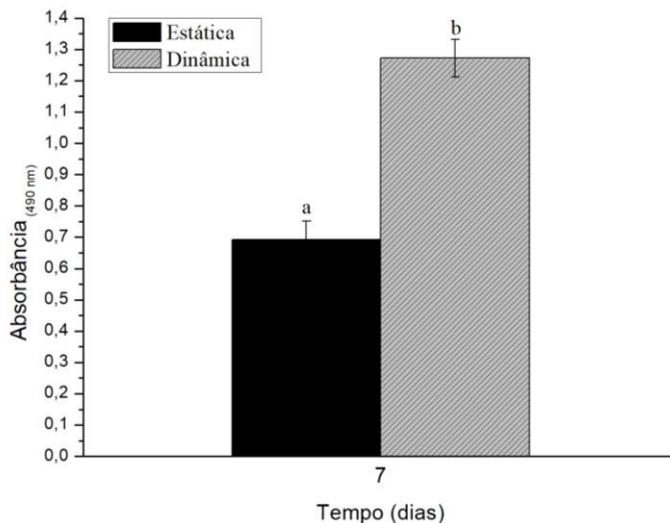
Câmara de controle de temperatura e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>



O estrutura tubular de BNC-Hep celularizada, parte central da câmara de cultivo, apresentou boa elasticidade quando vista a olho nu, mostrando que a parede do vaso pode recuperar a sua forma original, repetidamente com o fluxo pulsante de 1 Hz.

Os resultados de viabilidade celular determinados quantitativamente por ensaio com MTS demonstraram que as células permaneceram viáveis nos vasos de BNC-Hep tanto em cultura estática quanto em cultura dinâmica. A viabilidade das células no vaso sob fluxo pulsante durante 7 dias foi significativamente maior do que na cultura estática (Figura 26), 1,8 vezes maior na cultura dinâmica, o que é corroborado pelos resultados de diversos pesquisadores, que demonstraram um crescimento superior de células musculares sob condições dinâmicas quando comparado com condições estáticas (Jang et al., 2017; Chen et al., 2017; Zhang et al., 2009).

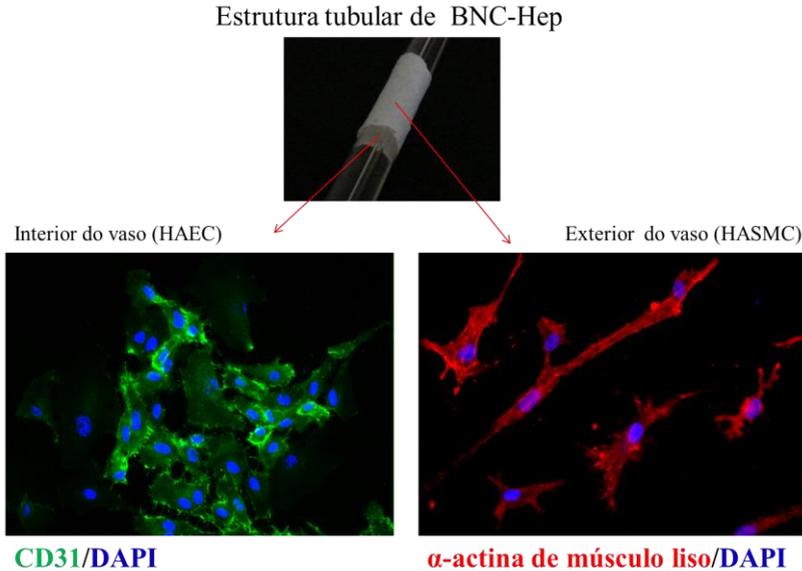
Figura 26: Análise quantitativa da viabilidade de células HASMC e HAEC cultivadas na BNC-Hep em função do tempo de cultura, através da utilização das técnicas de MTS. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; barras com mesma letra indicam que os resultados não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) segundo análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey.



Estudos realizados com análise de *Microarray* de alto rendimento mostraram que as expressões genéticas do sistema dinâmico apresentaram diferenças significativas na proliferação e diferenciação celular em comparação com a condição estática (Generalì et al., 2017).

A imunocitoquímica confirmou o fenótipo de HAECs maduras e HASMCs maduras após 7 dias de cultivo sobre a condição dinâmica (Figura 27). O lúmen vascular foi revestido com HAECs que marcaram positivamente para CD31 (proteína de adesão celular endotelial plaquetária, PECAM-1), enquanto a túnica média foi semeada com HASMCs que marcaram positivamente para proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso (proteína de citoesqueleto).

Figura 27: Confirmação fenotípica das células cultivadas em fluxo dinâmico. HASMCs cultivadas no exterior e das HAECs no interior das estruturas tubulares de BNC-Hep, através da utilização da técnica de imunocitoquímica, onde a proteína CD31 das HAECs estão coradas em verde e a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso das HASMC estão coradas em vermelhos, os núcleos celulares estão corados de azul, utilizando DAPI.



Geralmente, as HASMCs se desdiferenciam de um fenótipo de contração a um fenótipo estático quando são cultivados *in vitro* ao longo do tempo e a  $\alpha$ -actina perde seu fenótipo. Portanto, a quantidade de  $\alpha$ -actina diminuiria rapidamente em grande parte numa cultura estática, mas apenas ligeiramente em uma cultura pulsátil (Jeong et al., 2007). Este resultado sugere que HASMCs em tecidos engenheirados em condições mecanicamente ativas mantêm uma diferenciação fenótipo contrátil, enquanto HASMCs em cultura estática perdem o fenótipo diferenciado. Além do que, a produção de óxido nítrico pelas HAEC desempenha uma importante função na manutenção do fenótipo contrátil das HASMCs, aumentada em condições de fluxo pulsátil.

O biorreator de fluxo pulsante 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 o crescimento de células do leito vascular, mimetizando a túnica íntima e média, que responde ao estímulo

dinâmico, o biorreator 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 cirurgiões.



## 6 CONCLUSÕES

---

Os resultados apresentados nesta tese indicam a aplicabilidade das estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana modificadas com heparina e celularizadas com células do leito vascular como um possível modelo de vaso sanguíneo funcional, com diversas aplicações no campo da engenharia tecidual vascular.

Em síntese, podemos concluir que:

1. Estruturas tubulares de nanocelulose 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.
2. A nanocelulose bacteriana foi passível de modificação com o anticoagulante heparina, por meio de ligações covalentes, confirmadas por FTIR e método azul de toluidina.
3. A BNC não modificada apresentou uma menor hemocompatibilidade, em ambos lados testados. Já quando modificada com heparina houve uma melhora na hemocompatibilidade do biomaterial, destacando o lado denso da estrutura como o com melhor hemocompatibilidade em todos os testes realizados.
4. Os dois tipos celulares utilizadas neste trabalho HASMC e HAEC foram cultivadas em BNC e BNC-Hep e permaneceram viáveis durante todo o tempo de cultura.
5. Um sistema de fluxo pulsante foi desenvolvido em acrílico, acoplado à mangueira de silicone, reservatório de meio e uma bomba peristáltica, o que possibilitou a exposição das estruturas tubulares de nanocelulose bacteriana celularizadas a um fluxo sanguíneo fisiologicamente mimético.
6. As estruturas tubulares de BNC-Hep de 4 mm de diâmetro, foram celularizados com HASMCs no lado externo e HAECs no lado interno (por apresentar a melhor hemocompatibilidade) e cultivadas durante 8 dias em condição estática.

7. Um biorreator de fluxo pulsante foi obtido com as estruturas tubulares de BNC-Hep celularizados com HASMC e HAEC e exposta ao sistema de fluxo pulsante durante 7 dias, sob condição dinâmica. As células na condição dinâmica apresentaram uma viabilidade celular superior à condição estática e as células mantiveram seu fenótipo maduro e contrátil, confirmadas por imunocitoquímica.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell* 6e. **Garland Science**, v. 6, n. 6, p. 1465, 2014.

ALDENHOFF, Y. B. J.; KOOLE, L. H.; CURTIS, A.; DESCOUTS, P. Platelet adhesion studies on dipyridamole coated polyurethane surfaces. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 61–67, 2003.

AMRI, C.; MUDASIR, M.; SISWANTA, D.; ROTO, R. In vitro hemocompatibility of PVA-alginate ester as a candidate for hemodialysis membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 48–53, 2016.

ANDRADE, F. K.; SILVA, J. P.; CARVALHO, M.; CASTANHEIRA, E. M. S.; SOARES, R.; GAMA, M. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 98 A, n. 4, p. 554–566, 2011.

ANDUKURI, A.; SOHN, Y.; ANAKWENZE, C. P.; LIM, D.; BROTT, B. C.; YOON, Y.; JUN, H. Enhanced human endothelial progenitor cell adhesion and differentiation by a bioinspired multifunctional nanomatrix. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 5, p. 375–85, 2013.

ARSLAN, S.; YUKSEL, I. O.; KOKLU, E.; CAGIRCI, G. Clinical and morphological features of patients who underwent endovascular interventions for lower extremity arterial occlusive diseases. **Postępy w kardiologii interwencyjnej = Advances in interventional cardiology**, v. 11, n. 2, p. 114–8, 2015.

ASTM. American Society for testing and Materials ASTM F756-00: Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. 2000.

AVCI-ADALI, M.; ZIEMER, G.; WENDEL, H. P. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization - A review of current strategies. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 119–129, 2010.

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.

BAE, J.-S.; SEO, E.-J.; KANG, I.-K. Synthesis and characterization of heparinized polyurethanes using plasma glow discharge. **Biomaterials**, v. 20, n. 6, p. 529–537, 1999a.

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.

BERTI, F. V. **Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em scaffolds de celulose bacteriana**. 2012. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

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.

BLAJCHMAN, M. A.; OZGE-ANWAR, A. H. The role of the complement system in hemostasis. **Progress in hematology**, v. 14, p. 149, 1986.

BODIN, A.; BACKDAHL, 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.

BODIN, A.; BÄCKDAHL, H.; PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as biomaterial. In: ELSEVIER (Ed.). **Comprehensive Biomaterials**. Oxford, p. 405–410, 2011.

BORZANI, W.; SOUZA, S. J. 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.

BOUCHER, B. A.; TRAUB, O. Achieving hemostasis in the surgical field. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 29, n. 7, p. 2S–7S, 2009.

CAPILA, I.; LINHARDT, R. J. Heparin-protein interactions. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 41, n. 3, p. 391–412, 2002.

CASTRO, C.; ZULUAGA, R.; PUTAUX, J.; 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.

CHEN, H.; BROOK, M. A.; SHEARDOWN, H. Silicone elastomers for reduced protein adsorption. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2273–2282, 2004.

CHEN, W.; YANG, J.; LIAO, W.; ZHOU, J.; ZHENG, J.; WU, Y.; LI, D.; LIN, Z. In vitro remodeling and structural characterization of degradable polymer scaffold-based tissue-engineered vascular grafts using optical coherence tomography. **Cell and tissue research**, v. 370, n. 3, p. 417–426, 2017.

CHLUPÁČ, J.; FILOVÁ, E.; BACÁKOVÁ, L. Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. **Physiological research Academia Scientiarum Bohemoslovaca**, v. 58 Suppl 2, p. S119–139, 2009.

CHONN, a; CULLIS, P. R.; DEVINE, D. V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 12, p. 4234–4241, 1991.

CHOPRA, V.; ANAND, S.; KREIN, S. L.; CHENOWETH, C.; SAINT, S. Bloodstream infection, venous thrombosis, and peripherally inserted central catheters: Reappraising the evidence. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 8, p. 733–741, 2012.

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional Bacterial Cellulose/Chitosan Composite Materials for Medical Applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, n. 4, p. 69–72, 2004.

COLEMAN, J. F. Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease. In: **The American Journal of Surgical Pathology**. v. 34, p. 132, 2010.

COLLA, G. **Desenvolvimento de um Reator Biológico Tecidual Muscular a Partir de Vasos de Celulose Bacteriana**. UFSC, 2014.

COLLA, G.; PORTO, L. M. Development of artificial blood vessels through tissue engineering. **BMC Proceedings**, v. 8, p. 45, 2014.

COUET, F.; MANTOVANI, D. A New Bioreactor Adapts to Materials State and Builds a Growth Model for Vascular Tissue Engineering. **Artificial Organs**, v. 36, n. 4, p. 438–445, 2012.

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.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, 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, p. 403–411, 2004.

**DATASUS**. Disponível em:  
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>>.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310–1312, 1964.

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.

EDELMAN, E. R.; NATHAN, A.; KATADA, M.; GATES, J.; KARNOVSKY, M. J. Perivascular graft heparin delivery using biodegradable polymer wraps. **Biomaterials**, v. 21, n. 22, p. 2279–2286, 2000.

EDGINGTON, T. S.; MACKMAN, N.; BRAND, K.; RUF, W. The structural biology of expression and function of tissue factor. **Thrombosis and haemostasis**, v. 66, n. 1, p. 67–79, 1991.

EDWARDS, W. S. Progress in synthetic graft development: an improved crimped graft of teflon. **Surgery**, v. 45, n. 2, p. 298–309, 1959.

EDWARDS, W. S.; TAPP, J. S. Chemically treated nylon tubes as arterial grafts. **Surgery**, v. 38, n. 1, p. 61–70, 1955.

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.

FERREIRA, P.; COELHO, J. F. J.; GIL, M. H. Development of a new photocrosslinkable biodegradable bioadhesive. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, n. 1–2, p. 172–181, 2008.

FINK, H. **Artificial blood vessels Studies on endothelial cell and blood interactions with bacterial cellulose**. 2009. University of Gothenburg, Göteborg- Sweden, 2009.

FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE 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.

GARCIA JUNQUEIRA, D. R.; VIANA, T. G.; PEIXOTO, E. R. de M.; DE BARROS, F. C. R.; GRAÇAS CARVALHO, M. das; PERINI, E. Farmacovigilância da heparina no Brasil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 3, p. 328–332, 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd., 2007.

GENERALI, M.; KEHL, D.; CAPULLI, A. K.; PARKER, K. K.; HOERSTRUP, S. P.; WEBER, B. Comparative analysis of poly-glycolic acid-based hybrid polymer starter matrices for in vitro tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 203–212, 2017.

GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MULLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 545–555, 2015.

GOMES, R. C. **Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. In: **The**

**Biomaterials: Silver Jubilee Compendium**, p. 219–241.

GRAINGER, D. W. The Williams dictionary of biomaterials. **Materials Today**, v. 2, n. 3, p. 29, 1999.

HABERMANN, J. K.; ROBLICK, U. J.; LUKE, B. T.; PRIETO, D. A.; FINLAY, W. J. J.; PODUST, V. N.; ROMAN, J. M.; OEVERMANN, E.; SCHIEDECK, T.; HOMANN, N.; DUCHROW, M.; CONRADS, T. P.; VEENSTRA, T. D.; BURT, S. K.; BRUCH, H. P.; AUER, G.; RIED, T. Increased Serum Levels of Complement C3a Anaphylatoxin Indicate the Presence of Colorectal Tumors. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1020–1029, 2006.

HALIB, N.; PERRONE, F.; CEMAZAR, M.; DAPAS, B.; FARRA, R.; ABRAMI, M.; CHIARAPPA, G.; FORTE, G.; ZANCONATI, F.; POZZATO, G.; MURENA, L.; FIOTTI, N.; LAPASIN, R.; CANSOLINO, L.; GRASSI, G.; GRASSI, M. Potential applications of nanocellulose-containing materials in the biomedical field. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 977, 2017.

HARRISON, J. H.; SWANSON, D. S.; LINCOLN, A. F. A comparison of the tissue reactions to plastic materials: dacron, ivalon sponge, nylon, orlon, and teflon. **AMA archives of surgery**, v. 74, n. 1, p. 139–144, 1957.

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. 76, n. 2, p. 431–438, 2006.

HIGUCHI, A.; SHIRANO, K.; HARASHIMA, M.; YOON, B. O.; HARA, M.; HATTORI, M.; IMAMURA, K. Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2659–2666, 2002.

HILLIS, L. D.; SMITH, P. .; ANDERSON, J. .; BITTL, J. .; BRIDGES, C. .; BYRNE, J. .; CIGARROA, J. .; DISESA, V. .; HIRATZKA, L. .; HUTTER, A. M.; JESSEN, M. . ACCF/AHA guideline for coronary artery bypass graft surgery: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 143, n. 1, p. 4–34, 2012.

- HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood reviews**, v. 17, p. 1–5, 2003a.
- HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 16, n. 1, p. 17–20, 2003b.
- HUANG, Y.; JI, J.; DING, X.; LI, X. The Potential Tissues and Their Properties. In: **Tissue Repair**. Singapore: Springer, 2017.
- 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.
- HUTMACHER, D. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, n. 1, p. 107–124, 2001.
- IDRIS, A. N. I.; YEE, H. E. W. K. A.; KEE, C. M. Preparation of cellulose acetate dialysis membrane using d-glucose monohydrate as additive. **Jurnal Teknologi**, v. 51, p. 67–76, 2009.
- IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 2, p. 261–270, 2000.
- IMAI, Y.; NOSE, Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. **Journal of biomedical materials research**, v. 6, n. 3, p. 165–172, 1972.
- IN JEONG, S.; KIM, S. Y.; CHO, S. K.; CHONG, M. S.; KIM, K. S.; KIM, H.; LEE, S. B.; LEE, Y. M. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. **Biomaterials**, v. 28, n. 6, p. 1115–1122, 2007.
- JAGANATHAN, S. K.; SUPRIYANTO, E.; MURUGESAN, S.; BALAJI, A.; ASOKAN, M. K. Biomaterials in cardiovascular research: applications and clinical implications. **BioMed research international**, v. 2014, n. 8, p. 1–14, 2014.
- JANG, B. S.; CHEON, J. Y.; KIM, S. H.; PARK, W. H. Small diameter vascular graft with fibroblast cells and electrospun poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds: Cell Matrix Engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p. 1–18, 2017.

JIA, H.; JIA, Y.; WANG, J.; HU, Y.; ZHANG, Y.; JIA, S. Potentiality of bacterial cellulose as the scaffold of tissue engineering of cornea. In: **In Biomedical Engineering and Informatics, 2009. BMEI'09.** 2nd International Conference, 2009.

JUNQUEIRA; CARNEIRO. Histologia Básica. **Histología Básica**, p. 524, 2008.

KANG, I. K.; KWON, O. H.; LEE, Y. M.; SUNG, Y. K. Preparation and surface characterization of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes by plasma glow discharge. **Biomaterials**, v. 17, n. 8, p. 841–847, 1996.

KEELE, K. D. John Hunter's contribution to cardio-vascular pathology. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 39, n. 4, p. 248, 1966.

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, 2001a.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - Artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001b.

KO, Y. G.; KIM, Y. H.; PARK, K. D.; LEE, H. J.; LEE, W. K.; PARK, H. D.; KIM, S. H.; LEE, G. S.; AHN, D. J. Immobilization of poly(ethylene glycol) or its sulfonate onto polymer surfaces by ozone oxidation. **Biomaterials**, v. 22, n. 15, p. 2115–2123, 2001.

KUMAR, V.; YANG, T. HNO<sub>3</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NANO<sub>2</sub> mediated oxidation of cellulose - Preparation and characterization of bioabsorbable oxidized celluloses in high yields and with different levels of oxidation. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, n. 4, p. 403–412, 2002.

LANZA, R. .; LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Principles of tissue engineering.** [s.l.] Academic press, 2011.

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.

LEE, Y. M.; SEOL, Y. J.; LIM, Y. T.; KIM, S.; HAN, S. B.; RHYU, I. C.; BAEK, S. H.; HEO, S. J.; CHOI, J. Y.; KLOKKEVOLD, P. R.; CHUNG, C. P. Performance of a polyurethane vascular prosthesis carrying a dipyridamole (Persantin?) coating on its luminal surface. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 54, n. 2, p. 224–233, 2001.

LEITÃO, A. F.; GUPTA, S.; PEDRO, J.; REVIKINE, I.; GAMA, M. Hemocompatibility study of a bacterial cellulose / polyvinyl alcohol nanocomposite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 493–502, 2013.

LI, D.; CHEN, H.; BRASH, J. L. Mimicking the fibrinolytic system on material surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 1–6, 2011.

LI, J.; WAN, Y.; LI, L.; LIANG, H.; WANG, J. Preparation and characterization of 2,3-dialdehyde bacterial cellulose for potential biodegradable tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 5, p. 1635–1642, 2009.

LI, L.; CHENG, C.; XIANG, T.; TANG, M.; ZHAO, W.; SUN, S.; ZHAO, C. Modification of polyethersulfone hemodialysis membrane by blending citric acid grafted polyurethane and its anticoagulant activity. **Journal of Membrane Science**, v. 405–406, p. 261–274, 2012.

LI, L.; TU, M.; MOU, S.; ZHOU, C. Preparation and blood compatibility of polysiloxane / liquid-crystal composite membranes. **Blood**, v. 22, p. 2595–2599, 2001.

LI, X.; TANG, J.; BAO, L.; CHEN, L.; HONG, F. F. Performance improvements of the BNC tubes from unique double-silicone-tube bioreactors by introducing chitosan and heparin for application as small-diameter artificial blood vessels. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 394–405, 2017.

LIFESPAN BIOSCIENCES. **Mouse AGE ELISA Kit (Sandwich ELISA) - LS-F14150**.

LIN, W. C.; YU, D. G.; YANG, M. C. Blood compatibility of thermoplastic polyurethane membrane immobilized with water-soluble chitosan/dextran sulfate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 44, n. 2–3, p. 82–92, 2005.

LINHARDT, R. J. S. M.; XIE, J. Immobilization of heparin: approaches and applications. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 8, n. 2, p. 80–100, 2008.

LIU, T. Y.; LIN, W. C.; HUANG, L. Y.; CHEN, S. Y.; YANG, M. C. Hemocompatibility and anaphylatoxin formation of protein-immobilizing polyacrylonitrile hemodialysis. **Biomaterials**, v. 26, n. 12, p. 1437–1444, 2005.

LIU, X.; YUAN, L.; LI, D.; TANG, Z.; WANG, Y.; CHEN, G.; CHEN, H.; BRASH, J. L. Blood compatible materials: State of the art. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 35, p. 5718–5738, 2014.

MA, P. X. Biomimetic materials for tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 184–198, 2008.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498–499, 1964.

MALM, C. J.; RISBERG, B.; BODIN, A.; BÄCKDAHL, H.; JOHANSSON, B. R.; GATENHOLM, P.; JEPSSON, A. Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 46, n. 1, p. 57–62, 2012.

MATSUMOTO, H.; HASEGAWA, T.; FUSE, K.; YAMAMOTO, M.; SAIGUSA, M. A new vascular prosthesis for a small caliber artery. **Surgery**, v. 74, n. 4, p. 519–523, 1973.

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.

METHE, H.; GROOTHUIS, A.; SAYEGH, M. H.; EDELMAN, E. R. Matrix adherence of endothelial cells attenuates immune reactivity: induction of hyporesponsiveness in allo- and xenogeneic models. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 7, p. 1515–1526, 2007.

MIRKOVIC, N.; STEFANOVIC, S.; JANKOVIC, S. Analysis of risk factors for occlusions of a synthetic femoropopliteal bypass graft. **Vojnosanitetski preglad**, v. 72, n. 6, p. 517–522, 2015.

MISOPH, M.; SCHWENDER, S.; BABIN-EBELL, J. Response of the Cellular Immune System to Cardiopulmonary Bypass Is Independent of the Applied Pump Type and of the Use of Heparin-Coated Surfaces. **The Thoracic and Cardiovascular Surgeon**, v. 46, n. 4, p. 222–227, 1998.

MIZRAHY, S.; PEER, D. Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics. **Chemical Society reviews**, v. 41, n. 7, p. 2623–40, 2012.

MOLL, F.; POWELL, J.; FRAEDRICH, G.; VERZINI, F.; HAULON, S.; WALTHAM, M.; HERWAARDEN, J.; HOLT, P.; KEULEN, J.; RANTNER, B.; SCHLÖSSER, F.; SETACCI, F.; RICCO, J. Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery. **European Journal of Vascular & Endovascular Surgery**, v. 41, n. S1, p. S1–S58, 2011.

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A. Biotechnological production of cellulose by Gluconacetobacter Xylinus from agricultural waste. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 94–101, 2011.

MOTLAGH, D.; YANG, J.; LUI, K. Y.; WEBB, A. R.; AMEER, G. a. Hemocompatibility evaluation of poly(glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 24, p. 4315–4324, 2006.

NAOUM, P. C.; RADISPIEL, J.; MORAES, M. D. S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 26, n. 1, p. 19–22, 2004.

NEMERSON, Y. Tissue factor and hemostasis [published erratum appears in Blood 1988 Apr; 71 (4): 1178. **Blood**, v. 71, n. 1, p. 1–8, 1988.

NEREM, R. M.; SELIKTAR, D. Vascular tissue engineering. **Annual review of biomedical engineering**, v. 3, n. 1, p. 225–243, 2001.

NIE, S.; TANG, M.; CHENG, C. (Sage); YIN, Z.; WANG, L.; SUN, S.; ZHAO, C. Biologically inspired membrane design with a heparin-like interface: prolonged blood coagulation, inhibited complement activation, and bio-artificial liver related cell proliferation. **Biomaterials Science**, v. 2, n. 1, p. 98–109, 2014.

NOBELPRIZE.ORG. **Alexis Carrel - Biographical.**

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, p. 83–88, 2003.

PENG, L.; LI, H.; MENG, Y. Layer-by-layer structured polysaccharides-based multilayers on cellulose acetate membrane: Towards better hemocompatibility, antibacterial and antioxidant activities. **Applied Surface Science**, v. 401, p. 25–39, 2017.

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, 2011.

PLACE, E. S.; EVANS, N. D.; STEVENS, M. M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 8, n. 6, p. 457–470, 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.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterial Science - An Introduction to Materials in Medicine**. 2nd. ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2004.

REIS, E. M. dos; COLLA, G.; BERTI, F. V.; PORTO, L. M. Incorporation of heparin and albumin into bacterial nanocellulose for endothelial tube induction. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 1, 2016.

RIDDEL, J. P.; AOUIZERAT, B. E.; MIASKOWSKI, C.; LILICRAP, D. P. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

SANI, A.; DAHMAN, Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 151–164, 2010.

SCHOEN, F. J. Cardiac valves and valvular pathology: Update on function, disease, repair, and replacement. **Cardiovascular Pathology**, v. 14, n. 4, p. 189–194, 2005.

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.

SEYFERT, U. T.; BIEHL, V.; SCHENK, J. In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2–6, p. 91-96, 2002.

SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p. 1585–1598, 2013.

SHEEHAN, S. J.; RAJAH, S. M.; KESTER, R. C. Effect of preclotting on the porosity and thrombogenicity of knitted Dacron?? grafts. **Biomaterials**, v. 10, n. 2, p. 75–79, 1989.

SONG, L.; ZHOU, Q.; DUAN, P.; GUO, P.; LI, D.; XU, Y.; LI, S.; LUO, F.; ZHANG, Z. Successful development of small diameter tissue-engineering vascular vessels by our novel integrally designed pulsatile perfusion-based bioreactor. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42569, 2012.

SOYER, T.; LEMPINEN, M.; COOPER, P.; NORTON, L.; EISEMAN, B. A new venous prosthesis. **Surgery**, v. 72, n. 6, p. 864–872, 1972.

SPERLING, C.; MAITZ, M. F.; WERNER, C. Test methods for hemocompatibility of biomaterials. **Hemocompatibility of Biomaterials for Clinical Applications**, p. 77–104, 2018.

STARLING, R. C.; MOAZAMI, N.; SILVESTRY, S. C.; EWALD, G.; ROGERS, J. G.; MILANO, C. a; RAME, J. E.; ACKER, M. a; BLACKSTONE, E. H.; EHRLINGER, J.; THUITA, L.; MOUNTIS, M. M.; SOLTESZ, E. G.; LYTLE, B. W.; SMEDIRA, N. G. Unexpected abrupt increase in left ventricular assist device thrombosis. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 1, p. 33–40, 2014.

STAUBESAND, J. Sobotta. Atlas de Anatomía Humana. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2013. .

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.

SULAEVA, I.; HENNIGES, U.; ROSENAU, T.; POTTHAST, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

SUN, H. J.; BAHK, Y. Y.; CHOI, Y. R.; SHIM, J. H.; HAN, S. H.; LEE, J. W. A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 11, p. 2059–2071, 2006.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419–431, 2005.

TANG, J.; LI, X.; BAO, L.; CHEN, L.; HONG, F. F. Comparison of two types of bioreactors for synthesis of bacterial nanocellulose tubes as potential medical prostheses including artificial blood vessels. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1218–1228, 2017.

TEEBKEN, O. E.; HAVERICH, A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts. **European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery**, v. 23, n. 6, p. 475–485, 2002.

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.

VAN AKEN, W. G.; DE LOS ANGELES CORTES CASTILLO, M.; DOBBELAER, R.; GRACHEV, V.; MAKELA, P. H.; MINOR, P. D.; OFOSU, F.; HAI-JUN, Z.; ZOON, K.; SPIESER, J. M.; BUCHHEIT, K. H.; ESHKOL, A.; THIJSSSEN, J. H. H.; DUCHÊNE, M.; VINCENT-FALQUET, J. C.; PEAKE, I.; VON HOEGEN, L.; DABBAH, R. WHO Expert Committee on Biological Standardization. In: **World Health Organization - Technical Report Series**, 924, 2004.

VERHAMME, I. M.; BOCK, P. E.; JACKSON, C. M. The preferred pathway

of glycosaminoglycan-accelerated inactivation of thrombin by heparin cofactor II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 9785–9795, 2004.

VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, v. 29, n. 1, p. 1–7, 2009.

VOORHEES, A. B.; JARETZKI, A.; BLAKEMORE, A. H. The Use of Tubes Constructed from Vinyon “N” Cloth in Bridging Arterial Defects: A Preliminary Report\*. **Annals of surgery**, v. 135, n. 3, p. 332–336, 1952.

WAN, Y.; GAO, C.; HAN, M.; LIANG, H.; REN, K.; WANG, Y.; LUO, H. Preparation and characterization of bacterial cellulose/heparin hybrid nanofiber for potential vascular tissue engineering scaffolds. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, n. 12, p. 2643–2648, 2011.

WANG, J.; ZHU, Y.; DU, J. Bacterial cellulose: A natural nanomaterial for biomedical applications. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, v. 11, n. 2, p. 285–306, 2011.

WANG, W.; HU, J.; HE, C.; NIE, W.; FENG, W.; QIU, K.; ZHOU, X.; GAO, Y.; WANG, G. Heparinized PLLA/PLCL nanofibrous scaffold for potential engineering of small-diameter blood vessel: Tunable elasticity and anticoagulation property. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 103, n. 5, p. 1784–1797, 2015.

WEINBERG, C.; BELL, E. A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. **Science**, v. 231, p. 397–400, 1986.

XU, Y.; LIU, X.; LIU, X.; TAN, J.; ZHU, H. Influence of HNO<sub>3</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-NANO<sub>2</sub> mediated oxidation on the structure and properties of cellulose fibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 955–963, 2014.

YAU, J. W.; STAFFORD, A. R.; LIAO, P.; FREDENBURGH, J. C.; ROBERTS, R.; WEITZ, J. I. Mechanism of catheter thrombosis: comparison of the antithrombotic activities of fondaparinux, enoxaparin, and heparin in vitro and in vivo. **Blood**, v. 118, n. 25, p. 6667–6674, 2011.

YE, C.; WANG, Y.; SU, H.; YANG, P.; HUANG, N.; MAITZ, M. F.; ZHAO, A. Construction of a fucoidan / laminin functional multilayer to direction vascular cell fate and promotion hemocompatibility. **Materials Science and Engineering C**, v. 64, p. 236–242, 2016.

YILDIZ, O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 353–360, 2007.

ZANG, S.; ZHANG, R.; CHEN, H.; LU, Y.; ZHOU, J.; CHANG, X.; QIU, G.; WU, Z.; YANG, G. Investigation on arti fi cial blood vessels prepared from bacterial cellulose. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 111–117, 2015.

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.

ZHAO, J.; FARHATNIA, Y.; KALASKAR, D. M.; ZHANG, Y.; BULTER, P. E. M.; SEIFALIAN, A. M. The influence of porosity on the hemocompatibility of polyhedral oligomeric silsesquioxane poly (caprolactone-urea) urethane. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 68, p. 176–186, 2015.

## 8 ANEXO

---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **Título do projeto: Biofuncionalidade e hemocompatibilidade de membranas poliméricas de celulose bacteriana (CB)**

#### **Introdução**

Você está sendo convidado(a) a participar voluntariamente de um estudo de pesquisa. Antes de obter seu consentimento, é importante que todas as informações a seguir sejam lidas com atenção, e que todas as dúvidas sejam esclarecidas.

#### **Objetivo do estudo**

O principal objetivo deste estudo será avaliar a hemocompatibilidade *in vitro* de membranas de celulose bacteriana (polímeros de glicose). A hemocompatibilidade será avaliada, através de teste de interação com o sangue, adesão plaquetário, hemólise, tempos de tromboplastina, trombina e pré-trombina. A realização deste estudo consiste apenas na busca por novos tratamentos compatíveis com funções vitais humanas. O sangue será processado em laboratório sobre condições assépticas para manutenção da integridade e não contaminação das amostras. As análises realizadas estão descritas no projeto submetido ao comitê de ética intitulado: “Biofuncionalidade e hemocompatibilidade de membranas poliméricas de celulose bacteriana (CB)” e será disponibilizado ao voluntário quando solicitado.

#### **Participação no estudo**

Este estudo destina-se a indivíduos voluntários com idade entre 18 a 40 anos, que não façam uso de nenhum tipo de medicação ou que tenha qualquer doença. Não serão aceitos gestantes, alcoólatras e fumantes é necessário também que o paciente não tem ingerido nenhum tipo de bebida alcoólica nas últimas 48 horas. Serão requeridos aproximadamente 5 indivíduos e coletado 20 mL (o que corresponde aproximadamente 2 colheres de sopa) por indivíduo. A sua participação é totalmente voluntária e você tem a liberdade de não querer participar desta pesquisa.

#### **Confidencialidade**

Todas as informações obtidas serão mantidas em poder dos pesquisadores envolvidos com o projeto de pesquisa, sendo que você terá acesso a elas

sempre que desejar. Sua identidade ficará em sigilo. Seus dados pessoais não serão apresentados em relatórios e nem na publicação deste estudo. Será formado um biorrepositório de caráter transitório e de curta duração. Ao final do estudo todas as amostras e experimentos serão destruídos.

### **Riscos e desconfortos**

A coleta de sangue que será obtida com auxílio de agulha e seringa, no Laboratório de Tecnologias Integradas – EQA - UFSC, sendo a responsável pelos procedimentos de coleta e técnicos o farmacêutico Fabricio Perez Ferraz de Mello. Ao participar desta pesquisa, você poderá sentir um pequeno desconforto no momento da picada da agulha necessária para a coleta. Eventualmente poderá ocorrer à formação de pequenos hematomas no local onde a agulha foi inserida, devido à coleta, aconselha-se a colocar uma compressa de gelo no local. Com o passar de dias esse hematoma desaparecerá.

### **Despesas e compensações**

Não há despesas pessoais para o voluntário em qualquer fase do estudo. Não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Em caso de dano pessoal direto/índireto, imediato e tardio ao participante desta pesquisa este terá direito à assistência médica integral gratuita, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Caso necessário será garantido ao participante (voluntário) e seu acompanhante o ressarcimento de eventuais despesas com transporte, alimentação e outros eventuais gastos relacionados à participação no estudo.

### **Benefícios**

Embora a informação coletada neste estudo possa não trazer benefícios diretamente a você, os resultados podem ajudar profissionais da área da saúde no desenvolvimento de novos tratamentos médico.

Caso você aceite fazer parte deste estudo, duas vias do termo serão entregues a você, onde todas as páginas deverão ser rubricadas e todos os dados respondidos corretamente. Assim que os primeiros resultados sejam publicados, em revistas ou congressos, você será informado e terá acesso a essas informações por e-mail ou correspondência, por isso é importante que você preencha este item corretamente.

**CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do presente estudo como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Nome:

Assinatura do Sujeito ou Responsável:

Telefone para contato:

E-mail:

Local e data:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto (coordenador)

Departamento de Eng. Química e Eng. de Alimentos – UFSC

InteLab – Laboratório de Tecnologias Integradas

João Pio Duarte Silva, s/n, Córrego Grande, Florianópolis/SC

(48) 3721-2526

Guilherme Colla (pesquisador)

Departamento de Eng. Química e Eng. de Alimentos – UFSC

InteLab – Laboratório de Tecnologias Integradas

João Pio Duarte Silva, s/n, Córrego Grande, Florianópolis/SC

(48) 3721-4068

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - UFSC

Prédio Reitoria II

Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC

Horário de atendimento: 10h às 12h e 16h às 18h

(48) 3721-6094