

Scaffolds Vasculares Descelularizados Provenientes de Vasos Sanguíneos de Placenta Bovina

Decellularized Vascular Scaffolds Derived from Bovine Placenta Blood Vessels

Tarley Santos Oliveira,¹ Igor Smirnow,¹ Kadija Mohamed Santee,¹ Maria Angelica Miglino,¹ Rodrigo da Silva Nunes Barreto¹

Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,¹ São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: As doenças associadas ao aparelho circulatório são as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, implicando a necessidade de implantes vasculares. Assim, a produção de biomateriais vasculares tem se mostrado uma alternativa promissora às terapias utilizadas em estudos e pesquisas relacionados à fisiologia vascular.

Objetivos: O presente projeto visa ao desenvolvimento artificial de vasos sanguíneos pela recelularização de *scaffolds* vasculares derivados de vasos placentários bovinos.

Métodos: A superfície corioalantoide da placenta bovina foi utilizada para produzir biomateriais descelularizados. Para a recelularização, $2,5 \times 10^4$ células endoteliais foram semeadas acima de cada fragmento de vaso descelularizado durante três ou sete dias, quando a cultura foi interrompida e os fragmentos foram fixados para análise de adesão celular. Biomateriais descelularizados e recelularizados foram avaliados por histologia básica, microscopia eletrônica de varredura e imuno-histoquímica.

Resultados: o processo de descelularização produziu vasos que mantiveram a estrutura natural e o conteúdo de elastina, e não foram observadas células e gDNA remanescentes. Além disso, células precursoras endoteliais se ligaram ao lúmen e à superfície externa do vaso descelularizado.

Conclusão: nossos resultados mostram a possibilidade de usos futuros desse biomaterial na medicina cardiovascular, como, por exemplo, no desenvolvimento de vasos artificiais.

Palavras-chave: Matriz Extracelular Descelularizada; Bioengenharia; Vasos Sanguíneos.

Abstract

Background: Diseases associated with the circulatory system are the main causes of worldwide morbidity and mortality, implying the need for vascular implants. Thus, the production of vascular biomaterials has proven to be a promising alternative to therapies used in studies and research related to vascular physiology.

Objectives: The present project aims to achieve the artificial development of blood vessels through the recellularization of vascular scaffolds derived from bovine placental vessels.

Methods: The chorioallantoic surface of the bovine placenta was used to produce decellularized biomaterials. For recellularization, 2.5×10^4 endothelial cells were seeded above each decellularized vessel fragment during three or seven days, when culture were interrupted, and the fragments were fixed for cell attachment analysis. Decellularized and recellularized biomaterials were evaluated by basic histology, scanning electron microscopy, and immunohistochemistry.

Results: The decellularization process produced vessels that maintained natural structure and elastin content, and no cells or gDNA remains were observed. Endothelial precursor cells were also attached to lumen and external surface of the decellularized vessel.

Conclusion: Our results show a possibility of future uses of this biomaterial in cardiovascular medicine, as in the development of engineered vessels.

Keywords: Decellularized Extracellular Matrix; Bioengineering; Blood Vessels.

Full texts in English - <https://abccardiol.org/en/>

Correspondência: Rodrigo da Silva Nunes Barreto •

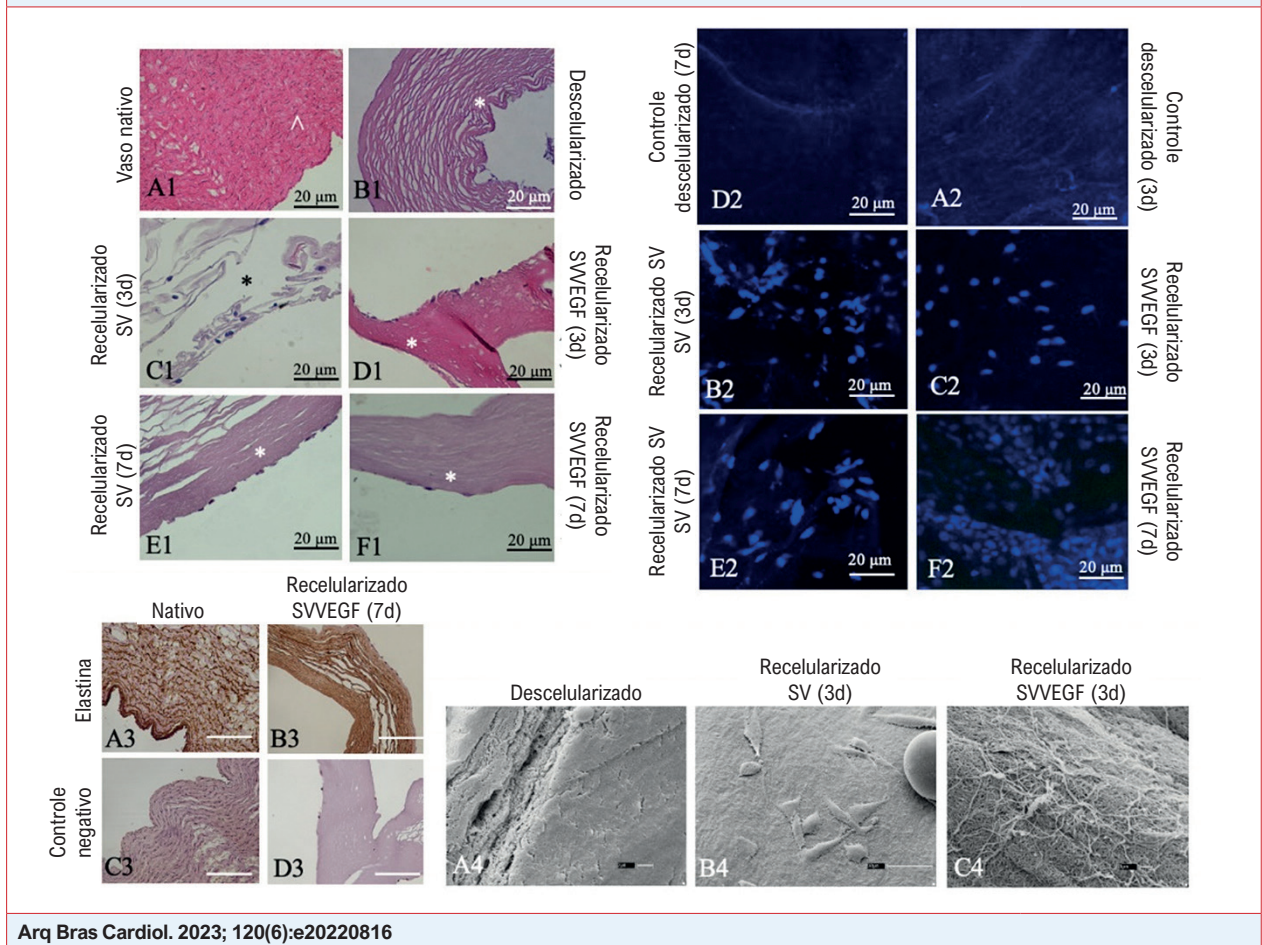
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP) - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n. CEP 14884-900, Jaboticabal, SP – Brasil

E-mail: rodrigo.barreto@unesp.br

Artigo recebido em 23/11/2022, revisado em 10/02/2023, aceito em 05/04/2023

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20220816>

Figura Central: Scaffolds Vasculares Descelularizados Provenientes de Vasos Sanguíneos de Placenta Bovina



Arq Bras Cardiol. 2023; 120(6):e20220816

Análise de vasos de placenta bovina descelularizada. Hematoxilina eosina, (A1) Vaso nativo, Bar= 20 μ m, (^) lúmen: fibras da matriz extracelular coradas em rosa e núcleo celular em roxo; (B1) Descelularizado, Bar= 20 μ m, (*) superfície externa: núcleos celulares ausentes; (C-F1) Recelularizado, Bar= 20 μ m, (*) superfície externa: (C1), Recelularizado três dias (linha SV), núcleos celulares corados em roxo aderidos à superfície externa do biomaterial; (D1), Recelularizado três dias com células do saco vitelino canino com superexpressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e proteína verde fluorescente aumentada (eGFP) (linhagem SV-VEGF), fibras da matriz extracelular coradas em rosa e núcleos celulares em roxo aderidos à superfície externa do biomaterial; (E1), Células do saco vitelino caninas recelularizadas com sete dias (linhagem SV), núcleos celulares corados em roxo aderidos à superfície externa do biomaterial. (F1), Recelularizado sete dias com células (linhagem SV-VEGF), fibras da matriz extracelular coradas em rosa, núcleos celulares em roxo aderidos à superfície externa do biomaterial. (A4) bar = 2 μ m, descelularizado: Observe a preservação das fibras da matriz extracelular do biomaterial vascular; Recelularização com três dias de cultura (B4, C4): (B4) bar = 30 μ m, com células da VS aderidas à parede do biomaterial vascular; (C4) bar = 10 μ m, células SV-VEGF aderidas à parede do biomaterial vascular. Ensaio de imuno-histoquímica: expressão de elastina no biomaterial vascular da superfície corioalantoide bovina nativa e recelularizada com células SV-VEGF. Legenda: Bar=20 μ m, (A3) Vaso sanguíneo nativo da superfície corioalantoide da placenta bovina, observe a expressão de elastina em toda a parede vascular; (B3) Vaso sanguíneo nativo da superfície corioalantoide da placenta bovina, controle negativo corado com hematoxilina; (C3) Recelularização de 7 dias de biomaterial vascular placentário bovino com células SV-VEGF, observando a expressão de elastina em toda a parede vascular; (D3) Recelularização de 7 dias de biomaterial vascular placentário bovino com células SV-VEGF, controle negativo corado com hematoxilina. Ensaio de recelularização: Barra 20 μ m; (A2-C2) 3 dias de cultivo; (A2) Biomaterial vascular controle descelularizado, observe a ausência de núcleos; (B2) Biomaterial recelularizado com células progenitoras endoteliais (SV) do saco vitelino canino, observe núcleos corados em azul por 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI); (C2) Biomaterial recelularizado com células SV-VEGF, observe núcleos corados em azul por DAPI, eGFP não observada; (D2-F2) 7 dias de cultivo; (D2) controle descelularizado de biomaterial vascular, observe a ausência de núcleos; (E2) Biomaterial recelularizado com células SV, observe núcleos corados em azul por DAPI; (F2) Biomaterial recelularizado com células SV-VEGF, observe núcleos corados em azul por DAPI.

Introdução

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) têm aumentado principalmente devido ao sedentarismo, alimentação industrializada, ingestão calórica alta, consumo de álcool e tabagismo. Dentre as DCNT, as relacionadas à insuficiência do sistema circulatório são as

principais causas de morbidade e mortalidade mundial.¹⁻³ Essa insuficiência é majoritariamente tratada por cirurgia vascular e são necessários vasos viáveis, que geralmente são derivados da dissecação de vasos periféricos autólogos e implantação no local afetado. No entanto, são comumente descritas complicações infecciosas, necrose e deiscência

no local da retirada dos vasos. Em alguns casos, coloca-se um stent no vaso lesionado em vez do fragmento do vaso periférico, porém possíveis complicações são fraturas e hiperplasia intimal.^{4,5}

Nesse cenário, avanços significativos foram alcançados pela bioengenharia na produção de novos órgãos funcionais ou funcionalizados, como o desenvolvimento de vasos sanguíneos projetados para dar suporte à vascularização funcional.⁶⁻⁸ Até agora, vasos de pequena escala foram produzidos e a maioria deles é formada a partir de derivados de polímeros sintéticos rígidos.^{6,9} Por outro lado, vasos projetados que mantenham sua função estrutural e celular por períodos longos ainda não foram produzidos.

Assim, a produção de biomateriais vasculares por recelularização, e especialmente por bioimpressão, tem se mostrado uma alternativa promissora às terapias utilizadas em doenças e estudos relacionados à fisiologia vascular.^{9,10} Nosso objetivo aqui é produzir biomateriais vasculares derivados de vasos placentários bovinos descelularizados que possam ser usados como sua estrutura tridimensional natural ou como biogéis.

Materiais e Métodos

Amostra e células

Para isolamento dos vasos, placenta bovina com idade estimada de 270 dias de gestação foi obtida em abatedouro. Para os ensaios de citocompatibilidade, duas células progenitoras endoteliais foram utilizadas: saco vitelino canino (SV) e células do saco vitelino canino com superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da proteína verde fluorescente (eGFP) (SV-VEGF).¹¹ Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 9715100718.

Protocolo de descelularização

A superfície corioalantóide da placenta bovina foi utilizada para produzir biomateriais descelularizados. O corioalantoide foi individualizado e as artérias umbilicais foram canuladas com cateteres nº 14 e conectadas ao biorreator ORCA (Harvard Apparatus, EUA). Inicialmente, a perfusão foi realizada com solução tampão de fosfato (PBS: 136,9 mM NaCl, 26,8 mM KCl, 14,7 mM KH₂PO₄ e 8,1 mM Na₂HPO₄·7H₂O; pH 7,2) com volume constante de 0,5 ml/min até completa limpeza do sistema vascular, aproximadamente 24 horas. Em seguida, uma solução de dodecil sulfato de sódio a 0,01% (SDS, Sigma-Aldrich 11767289001) foi perfundida em água destilada também a 0,5ml/min por 24 horas. Posteriormente, a solução foi alterada para SDS 0,1% por dois dias, para 0,25% por um dia, para 0,5% por 1 dia e para 1,0% por um dia. O corioalantoide descelularizado foi então perfundido com Triton X-100 a 1% (#0694-1L, Amresco-Solon, EUA) por três horas. Por fim, foi lavado com PBS por 24 horas, perfazendo um total de 10 dias.

Após a descelularização, todo o sistema vascular da superfície alantocoriônica foi isolado do cotilédone e da membrana. Em seguida, os vasos foram preservados em paraformaldeído (PFA) a 4% para validação da descelularização ou congelados rapidamente para ensaio de citocompatibilidade e produção de hidrogel.

Validação da descelularização

Para validação da descelularização por análise histológica, as amostras preservadas em PFA foram rotineiramente desidratadas, diafanizadas e embebidas em parafina. Em seguida, foram seccionadas em micrótomo manual (Leica RM2125 RT) em fatias de 5 µm de espessura e transferidas para lâminas histológicas. Para verificar a ausência de núcleos celulares visíveis, as lâminas foram coradas em hematoxilina e eosina (HE) ou 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) e observadas em microscópio Nikon Eclipse 80I sob luz ou epifluorescência, respectivamente.

Além disso, a validação da descelularização foi realizada pela quantificação do ácido desoxirribonucleico genômico remanescente (gDNA) que foi extraído por precipitação de sal, adaptado de Olerup e Zetterquist,¹² conforme descrito por Barreto et al.¹³

Ensaio de recelularização

Primeiramente, fragmentos de vasos descelularizados de 4 cm foram esterilizados por lavagem com suplemento de PBS com 2% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), seguido de banho de álcool 70% e luz ultravioleta (UV).

Para a recelularização, 2,5 x 10⁴ células SV ou 2,5 x 10⁴ células SV-VEGF foram semeadas acima de cada fragmento de vaso descelularizado durante três ou sete dias, quando a cultura foi interrompida e os fragmentos foram fixados para análise de adesão celular. A cultura foi realizada com meio alfa mínimo essencial (α-MEM) (LGC Biotechnology), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, sob temperatura de 37 °C e 5% de CO₂.

Validação da recelularização

Para verificar a adesão celular, alguns fragmentos de vasos recelularizados foram corados com DAPI e observados sob microscópio confocal a laser (Olympus Fluo View 1000 - FV1000). Os demais fragmentos foram fixados em Karnovsky (4% PFA e 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) e posteriormente fixados em tetróxido de ósmio a 1% (SEM R 148- HATFIELD, EUA) por 90 minutos. Eles foram desidratados em uma série crescente de etanol sob agitação, depois passaram por um processo de secagem automatizado (MSCPD 300, Leica) e foram metalizados com ouro (#K550, Emitech-Ashford, Reino Unido). Também foi realizada imunohistoquímica, consequentemente,¹³ para verificar a elastina na parede do vaso e VEGF da linha celular SV-VEGF.

Resultados

Após a descelularização, não foram observados núcleos visíveis nos fragmentos dos vasos nem pela coloração

por hematoxilina e eosina (HE) nem pela coloração por DAPI (Figura Central – D2). Além disso, foi quantificado menos de 50 ng de gDNA por mg de vaso descelularizado (Figura 1). Com relação à conservação do arranjo vascular dos vasos da placenta bovina, observou-se, mesmo em vasos de até 5 mm de diâmetro (Figura 1-F), pela microscopia eletrônica de varredura, que os vasos descelularizados apresentavam manutenção estrutural e lúmen poroso (Figura Central – A4).

Após a recelularização, mesmo no terceiro dia de cultura, foi possível observar células na superfície e no lúmen do vaso descelularizado; entretanto, visualmente, o número de células aumentou no sétimo dia. Além disso, as células SV-VEGF foram mais numerosas do que as células SV, tanto no terceiro quanto no sétimo dia. Essas células foram observadas pelas colorações HE e DAPI (Figura Central – D1 e F2).

O padrão de distribuição da elastina foi semelhante nos vasos placentários nativos, descelularizados e recelularizados (Figura Central – A3, B3 e D3).

Discussão

A placenta bovina é um órgão que, após a descelularização, pode ser utilizado como fonte de biomaterial, principalmente *scaffolds* vasculares. Mesmo após o processo de descelularização, tanto os cotilédones¹³ quanto a membrana corioalantoide¹⁴ mantiveram sua estrutura e composição da matriz extracelular preservadas. Aqui produzimos vasos descelularizados com estrutura e manutenção da elastina, mesmo em vasos de pequeno diâmetro. Além disso, esses vasos descelularizados apresentavam citocompatibilidade com células precursoras endoteliais (células SV e SV-VEGF) e os resultados morfológicos e comportamentais dessas linhagens celulares já haviam sido descritos e permanecem de acordo com os apresentados pela recelularização em outros biomateriais, conforme demonstrado por Fratini et al.¹⁵

Ademais, outra alternativa para o uso desse vaso descelularizado é sua digestão para produzir biogéis ricos em colágeno, que podem ser usados para produzir vasos de bioengenharia com diâmetros e tamanhos diferentes.^{6,16,17}

Conclusão

Os vasos da placenta bovina podem produzir biomateriais descelularizados viáveis e citocompatíveis que podem ser uma fonte de biomateriais vasculares estruturalmente naturais, bem como perspectivas futuras para vasos de bioengenharia.

Referências

1. Malta DC, Silva Jr JB. Brazilian Strategic Action Plan to Combat Chronic Non-Communicable Diseases and the global targets set to confront these diseases by 2025: A Review. *Epidemiol Ser Saúde*. 2013;22(1):151-64. doi: 10.5123/S1679-49742013000100016.
2. Brasil. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

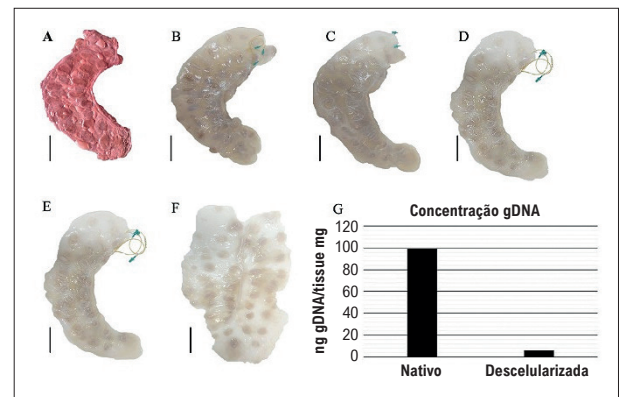


Figura 1 – Descelularização dos vasos placentários bovinos: A: bar = 10 cm, placenta dissecada e artéria e veia umbilical canuladas. B: bar = 10 cm, início do processo de descelularização. C-E: bar = 10 cm, avanço da descelularização. F: bar = 10 cm, conclusão da descelularização, com manutenção da estrutura. G: ácido desoxirribonucleico genômico (gDNA) nos scaffolds vasculares da superfície corioalantoide da placenta bovina descelularizada.

Agradecimentos

Todas as imagens de microscópio tiveram o apoio do Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem (CADI-FMVZ-USP).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise e interpretação dos dados e Redação do manuscrito: Oliveira TS, Cordeiro IS, Barreto RSN; Obtenção de dados: Oliveira TS, Cordeiro IS, Santee KM, Barreto RSN; Obtenção de financiamento: Miglino MA, Barreto RSN; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Barreto RSN.

Potencial conflito de interesse

Não há conflito com o presente artigo

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (bolsa FAPESP nº 2014/50844-3) e parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Tarley Santos Oliveira pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

- World Health Organization. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2011.
- Imada BC, Chen SR. Regional Vascular Anatomy. In: Gilani R, Mills JL Sr, editors. *Vascular Complications of Surgery and Intervention*. New York: Springer; 2022. p. 3-35.
- Bertanha M. Perspectivas de Uso de Células-Tronco em Cirurgia Vascular. *J Vasc Bras*. 2016;15(3):173-5. doi: 10.1590/1677-5449.006516.
- Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. Three-Dimensional Bioprinting of Thick Vascularized Tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(12):3179-84. doi: 10.1073/pnas.1521342113.
- Debbi L, Zohar B, Shuhmaher M, Shandalov Y, Goldfracht I, Levenberg S. Integrating Engineered Macro Vessels with Self-Assembled Capillaries in 3D Implantable Tissue for Promoting Vascular Integration In-Vivo. *Biomaterials*. 2022;280:121286. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121286.
- Moore MJ, Tan RP, Yang N, Rnjak-Kovacina J, Wise SG. Bioengineering Artificial Blood Vessels from Natural Materials. *Trends Biotechnol*. 2022;40(6):693-707. doi: 10.1016/j.tibtech.2021.11.003.
- Solis DM, Czekanski A. 3D and 4D Additive Manufacturing Techniques for Vascular-Like Structures – A Review. *Bioprinting*. 2022;25: e00182.
- Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the Key Challenge in Tissue Engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4-5):300-11. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.004.
- Fratini P, Carreira AC, Alcântara D, Oliveira e Silva FM, Rodrigues MN, Miglino MA. Endothelial Differentiation of Canine Yolk Sac Cells Transduced with VEGF. *Res Vet Sci*. 2016;104:71-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.11.010.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR Typing by PCR Amplification with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP) in 2 Hours: An Alternative to Serological DR Typing in Clinical Practice Including Donor-Recipient Matching in Cadaveric Transplantation. *Tissue Antigens*. 1992;39(5):225-35. doi: 10.1111/j.1399-0039.1992.tb01940.x.
- Barreto RDSN, Romagnoli P, Mess AM, Miglino MA. Decellularized Bovine Cotyledons May Serve as Biological Scaffolds with Preserved Vascular Arrangement. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(4):e1880-e1888. doi: 10.1002/term.2618.
- Ballesteros AC, Puello HRS, Lopez-Garcia JA, Bernal-Ballen A, Mosquera DLN, Forero DMM, et al. Bovine Decellularized Amniotic Membrane: Extracellular Matrix as Scaffold for Mammalian Skin. *Polymers*. 2020;12(3):590. doi: 10.3390/polym12030590.
- Fratini P, Rigoglio NN, Matias GSS, Carreira ACO, Rici REG, Miglino MA. Canine Placenta Recellularized Using Yolk Sac Cells with Vascular Endothelial Growth Factor. *Biores Open Access*. 2018;7(1):101-6. doi: 10.1089/biores.2018.0014.
- Choudhury D, Tun HW, Wang T, Naing MW. Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? *Trends Biotechnol*. 2018;36(8):787-805. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.03.003.
- Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing Three-Dimensional Tissue Analogues with Decellularized Extracellular Matrix Bioink. *Nat Commun*. 2014;5:3935. doi: 10.1038/ncomms4935.

