



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em
Scaffolds de Celulose Bacteriana**

FERNANDA VIEIRA BERTI

FLORIANÓPOLIS

2012

Fernanda Vieira Berti

**Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em
Scaffolds de Celulose Bacteriana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto (EQA-UFSC)

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Rambo (EEL-UFSC)

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando Dias (BEG-UFSC)

Florianópolis

2012

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

Berti, Fernanda Vieira

Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em Scaffolds de Celulose Bacteriana [tese] / Fernanda Vieira Berti ; orientador, Luísmar Marques Porto - Florianópolis, SC, 2012.

147 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Engenharia de tecidos. 3. Celulose bacteriana. 4. Células endoteliais humanas. I. Marques Porto, Luísmar. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

We drew our own constellations.
(Jack Johnson)

Dedico este trabalho ao meu amigo e
companheiro, Leonardo, pelos nossos
momentos diários de felicidade e
cumplicidade!!!

É para você, Léo, com todo o meu
amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço os momentos de aprender, de agir e executar, de pensar, de ouvir, de refletir, de escrever, de sentir, de suspirar, de sorrir, de chorar; há os momentos de chorar... estes me ensinaram o quanto são valiosos os momentos de lembrar... desde as primeiras semanas até o infinito....meu pai que saudades! Obrigado ao meu pai Honório por ter me ensinado a gostar de aprender e, hoje escrevi esta tese como resultado de todo incentivo que tive na vida, muito obrigado pai! Saudades.

Agradeço os ensinamentos do Prof. Dr. Luismar Marques Porto, Prof. Dr. Carlos Renato Rambo e do Prof. Dr Paulo Fernando Dias, obrigado pela orientação, oportunidade, apoio, dedicação, incentivo, compreensão e valiosa amizade;

À Prof. Dr^a Cíntia Soares, Prof. Dr^a Rosa Maria Ribeiro do Valle, pelos momentos de descontração e valiosa contribuição.

Aos meus colegas e amigos do Intelab:

À Julia pelos momentos plenos que vivemos juntas! Impossível encontrar uma pessoa mais plena, com uma energia incrível; sinceridade; força; nossa quanta força você me deu! Obrigado por tudo; uma bela amizade que o tempo construiu; Julia e Heitor adoro vocês;

À Rezinha pela grande e antiga amizade, você acompanhou esta jornada de longe e agora de bem perto, obrigada pelo incentivo, você sabe o quanto me ajudou; obrigada por tudo, meu amuleto da sorte;

À Nati pela valiosa contribuição com a manutenção do Lab; pelos dias intensos de experimentação que acabaram por construir uma amizade maravilhosa; tenho você como uma irmã mais nova;

À Dalí pela nossa grande amizade, ao apoio incondicional, aos momentos de diversão e aprendizado, às palavras de conforto... Carlos e Dalí, adoro muito vocês;

À Gisele, Janice, Valdelucia, Derce, Tatiane, Sabrina, Joana, Cassini, Taísa, Vanessa, Amanda, Beatriz, Vinícios, Natan, João Caetano, João

Henrique, Edroaldo e Juli pelo companheirismo, amizade e bons momentos de convívio laboratorial;

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal:
À Bia pela valiosa contribuição, pelos ensinamentos e pela garra; uma mulher guerreira com uma personalidade incrível; obrigado por tudo;

À Shirley, Susane, Cristiane, Fernanda, Dani, Simone e Vivi obrigado pelo apoio sempre;

Ao Éder por ser um exemplo de pesquisador, comprometido e sempre disposto a ajudar; muito obrigado pela valiosa contribuição;

À Chirle e o Demétrio do FluorBEG muito obrigado pelos ensinamentos de microscopia e pelas horas e horas de companhia; Ao Giustino pelo auxílio com a liofilização das amostras;

Ao Dr. Marcos do CEOSP-São Miguel por ter aberto as portas de seu laboratório e ter contribuído para o andamento da tese;

Ao amigo Luciano Henrique Campestrini, o apoio, o incentivo, a paciência. Saudades de você Lu;

Aos meus pais, Honório (*in memoriam*) e Maria Helena, e ao meu irmão Rodrigo pela maravilhosa família que somos! Muito obrigada pelas lições que tive desde os primeiros momentos de vida... Cheguei até aqui porque vocês estiveram ao meu lado durante todo o caminho... Devo tudo que sei e sou a vocês. Vocês iluminam meu viver;

A você Léo, o amor que me faz forte, a alegria de estar ao teu lado, a paz do meu coração, a simplicidade de ver a vida, a energia que me encanta. Obrigado por iluminar meus momentos e estar sempre ao meu lado; seu apoio foi e é fundamental. Amo você;

Aos meus sogros Alcidia e Balduino e aos meus cunhados Aline e Denis; as palavras de conforto, o incentivo, o apoio incondicional, e por entenderem as minhas ausências. Obrigado pelo carinho, amo muito vocês;

Ao meu amado sobrinho Lorenzo pelo olhar que me encanta;

A você Ni minha amiga do coração, a nossa iluminada amizade, aos momentos bons e difíceis em que você esteve ao meu lado, aos dias e noites de muita conversa; Ni, Neto e Lipe obrigado por alegrar a minha vida;

Ao Binho pelo amor incondicional; companhia em cada linha desta tese; um ser que com apenas um olhar me encoraja e que sem palavras fico para dizer o quanto significa pra mim;

À Carol pelos momentos maravilhosos de descontração quinzenal; amiga, obrigado pelo apoio incondicional; pela alegria de ter uma amizade como a nossa, te adoro muito;

Aos amigos de Nova Veneza: Fefa, Juli, Tici, Ana, Carla, Cris, Aroldo, Fran, Negão, Evandro, Vicente, Thaís, Dado e Ingrid pelos bons momentos de confraternização e pela valiosa amizade.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos, colegas e familiares, pelo incentivo, insistência, carinho, paciência, companheirismo e compreensão;

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

Pesquisadores estão buscando soluções baseadas na adequação do microambiente físico para controlar respostas biológicas. Estudos recentes sugerem que alterações no microambiente influenciam substancialmente o comportamento das células endoteliais e apenas recentemente propriedades topográficas foram incorporadas como um componente essencial para a engenharia de tecidos vasculares. A celulose bacteriana (CB) tem sido investigada como biomaterial. A CB sintetizada pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* em condições de cultura estáticas forma uma membrana na interface entre o ar e o meio de cultivo. A membrana é constituída de uma superfície pelicular lisa (SP-BCM) formada na interface ar; seguida por uma região tecidual esponjosa (ST-BCM) que se estende até a outra superfície de interface com o meio de cultivo. Em condições agitadas de cultura bacteriana foram obtidas macroestruturas de CB meta-vascularizada. Adesão, viabilidade, proliferação, migração e morte celular das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram avaliados em função das características de superfície da CB (ST-BCM e SP-BCM). As HUVECs aderem em ambas as superfícies da CB, apresentando-se morfologicamente arredondas na ST-BCM e espaiadas na SP-BCM. As HUVECs permaneceram viáveis em ambas as superfícies da membrana de CB após 20 dias de cultura, mas em maior quantidade na ST-BCM possivelmente pela capacidade de penetração, das HUVECs através desta superfície. Após três dias de cultura, houve declínio de viabilidade celular em ambas as superfícies da CB, sendo mais pronunciada na SP-BCM. A morte celular foi experimentalmente identificada como necrose, mas acredita-se que necrose secundária seja a causa da morte celular. Após caracterização do comportamento das HUVECs nas superfícies da CB as macroestruturas de CB foram endotelizadas. A endotelização dos meta-vasos da macroestrutura da CB foi alcançada após 30 dias de cultivo das HUVECs no interior dos vasos. A macroestrutura de celulose bacteriana mostrou ser uma plataforma promissora para o desenvolvimento de tecidos ou órgãos vascularizados, por permitir a endotelização, que compreende uma das etapas mais críticas dos processos *in vitro*.

Palavras chave: Celulose Bacteriana, HUVECs, Topografia de superfície, Comportamento celular, Endotelização.

ABSTRACT

Researchers have focused on solutions for adequacy of the physical microenvironment to control biological responses. Recent studies suggest that changes in the microenvironment greatly influence the behavior of endothelial cells and topographic properties have only recently been incorporated as an essential component of vascular tissue engineering. Bacterial cellulose (BC) synthesized by the bacterium *Gluconacetobacter hansenii* in static culture conditions as a membrane at the air/medium interface has been investigated as a biomaterial. The BC membrane obtained consists of a smooth peel surface (SP-BCM) formed at the interface with air, followed by a spongy tissue surface (ST-BCM), which extends to the other surface of interface with the medium. Under agitation conditions into the bacterial culture medium were obtained meta-vascularized BC macrostructures. Cell adhesion, viability, proliferation, migration and cell death of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) regarding their interaction with the surface properties of the membrane of BC (SP-BCM and ST-BCM) were evaluated. The HUVECs adhere to both surface of the BC and displays a morphologically rounded shape in the ST-BCM but an elongated feature as in SP-BCM. HUVECs remained viable in both surfaces of BC membrane even after 20 days of culture, but in higher quantities in the ST-BCM possibly due to the HUVECs capacity for invading that surface. After a 3-day period of culture, cell viability decrease in both BC surfaces, mainly on SP-BCM. Cell death was identified as necrosis, but interestingly its feature suggests that cell death was due to a secondary necrosis. After characterization of HUVEC lineage behavior on the both surfaces of BC membrane, the macrostructure was endothelized. The endothelization process of meta-vessels inside of BC macrostructure was attained after a period of 30 days of HUVECs-culture. The BC macrostructure properties has shown promising as a 3D-platform for development of vascular tissues or organs, by allowing endothelization, which comprises one of the most critical events of *in vitro* cell processes.

Keywords: Bacterial Cellulose, HUVECs, Topography, Cell Behavior, Endothelization.

LISTA DE ABREVIATURAS

CB: celulose bacteriana

EPM: erro padrão da média

PCT: placa de cultura de tecidos

EDS: espectroscopia dispersiva de raios X

HMDS: hexametildisilazano

HUVEC: células endoteliais da veia umbilical humana

MEC: matriz extracelular

MEV: microscopia eletrônica de varredura

PBS: solução fosfato salina

SFB: soro fetal bovino

SP-BCM: superfície pelicular lisa da membrana de celulose bacteriana, superfície que apresenta maior densidade de nanofibras de celulose entrelaçadas (superfície densa)

ST-BCM: superfície tecidual esponjosa da membrana de celulose bacteriana, superfície que apresenta menor densidade de nanofibras de celulose, topograficamente irregular (superfície porosa).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inóculo produzido em frascos cônicos de 125 mL; meio de cultura bacteriana composto de manitol, extrato de levedura e peptona, após autoclavagem; e placa de cultura de 24 poços onde foram preparadas as membranas de celulose bacteriana.....**60**

Figura 2 – Membranas de celulose bacteriana produzidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio base manitol após purificação. (a) detalhes da membrana de celulose bacteriana utilizada nos ensaios experimentais que possuem diâmetro (d) de aproximadamente 1,54 cm. (b) mostra membranas CB autoclavadas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização.....**62**

Figura 3 – Membranas de celulose bacteriana obtidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio de cultura manitol. (a) Membranas de celulose bacteriana após purificação com NaOH 0,1M. As membranas foram sintetizadas em placas de cultura de 24 poços e possuem 1,54 cm de diâmetro. As setas indicadas em (a), (b) e (c) destacam a estrutura 3D apresentada pelas membranas. (b) e (c) mostram ampliação de membrana de celulose bacteriana onde é possível observar diferenças de densidade das nanofibras de celulose bacteriana na parte superior da membrana (parte mais esbranquiçada), denominada superfície pelicular lisa (SP-BCM) e à parte inferior que é denominada superfície tecidual esponjosa (ST-BCM).....**66**

Figura 4 – Membranas de celulose bacteriana obtidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio de cultura manitol. (a) A membrana de celulose bacteriana é formada por uma película superior lisa (SP-BCM) e seguida de uma região tecidual esponjosa que se estende até a superfície oposta (inferior) (ST-BCM). (b) e (c) mostram detalhes da SP-BCM enquanto (d) e (e) mostram detalhes da ST-BCM.....**67**

Figura 5 – Membrana de celulose bacteriana secas por três diferentes métodos de secagem após sete dias de cultura com HUVECs. (a) e (d) mostram a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e a superfície pelicular lisa (SP-BCM), respectivamente, da membrana de celulose bacteriana secas por evaporação de álcool; (b) e (e) mostram as superfícies de celulose bacteriana secas por

HMDS, respectivamente, enquanto (c) e (f) mostram superfícies secas por ponto crítico de CO₂.....70

Figura 6 – Adesão e morfologia de células endoteliais (HUVECs) cultivadas na membrana de celulose bacteriana e secas através da técnica do ponto crítico de CO₂. (a), (b) e (c) mostram detalhes de células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da celulose bacteriana. (d), (e) e (f) mostram detalhes de células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre a superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana. As células foram cultivadas por sete dias.....72

Figura 7 – HUVEC aderida à superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de celulose bacteriana. Análise quantitativa por EDS-MEV para comprovação da incorporação de ósmio nos lipídios da membrana plasmática.....73

Figura 8 – Membranas de celulose bacteriana cultivadas com células endoteliais (HUVECs) por sete dias e secas através da técnica do ponto crítico de CO₂ com a realização de apenas uma troca de solventes (etanol/CO₂ líquido) na câmara de Balzer. (a) e (b) mostram ampliações da microestrutura da membrana de celulose bacteriana, onde rachaduras podem ser visualizadas, resultantes da falha na substituição de solventes do método. (c) e (d) mostram ampliações das células aderidas à membrana de celulose bacteriana que também tiveram sua morfologia afetada em função da falha nas etapas de substituição dos solventes.....74

Figura 9 – Influência das distintas microestruturas de superfície da celulose bacteriana na morfologia das células endoteliais (HUVECs) semeadas na densidade de 10⁵ células/membrana. (a), (b), (e), (f), (i), (j) mostram HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana; (c), (d), (g), (h), (k) e (l) mostram HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM). Os filamentos de F-actina do citoesqueleto foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).....86

Figura 10 – Influência das distintas microestruturas de superfície da celulose bacteriana na morfologia das células endoteliais (HUVECs) semeadas na densidade de 10⁶ células/membrana. (a), (b), (e), (f), (i), (j) mostram HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana; (c), (d), (g), (h), (k) e (l) mostram HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da

membrana. Os filamentos de F-actina do citoesqueleto foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).....87

Figura 11 – Análise quantitativa e qualitativa da viabilidade de células endoteliais humanas (HUVECs) cultivadas sobre as superfícies tecidual esponjosa (●) (ST-BCM) e pelicular lisa (▲) (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana em função do tempo de cultura através da utilização das técnicas de (a) MTS e (b) Live/Dead®, respectivamente.....89

Figura 12 – Citogramas do comportamento das células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre a membrana de celulose bacteriana, obtidos por citometria de fluxo através da utilização de anexina V-FITC e iodeto de propídio. (a), (b) e (c) mostram os citogramas das HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e (d), (e) e (f) mostram citogramas das HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana após 3, 7 e 20 dias de cultura.....93

Figura 13 – Migração vertical de células endoteliais cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do hidrogel de celulose bacteriana após sete dias de cultura. (a) Corte transversal do hidrogel seco através da técnica do ponto crítico de CO₂. (c, d e e) mostram ampliações das células endoteliais no interior do hidrogel de celulose bacteriana. (b) migração vertical das células endoteliais (verde) no interior do hidrogel de celulose através da técnica de Live/Dead®95

Figura 14 – Produção das macroestruturas de celulose bacteriana: (a) frascos cônicos contendo meio de cultura e a bactéria *G. hansenii* no início da cultura bacteriana, adaptados à plataforma shaker orbital, (b) celulose bacteriana se formando em volta do fio de nylon (seta) em cultura agitada após três dias de cultura bacteriana, (c) Macroestrutura de celulose bacteriana purificada e esterilizada após dez dias de cultura bacteriana (o fio de nylon se encontra no interior da macroestrutura), (d) e (e) mostram detalhes da celulose bacteriana se formando ao redor do fio de nylon (setas), após cinco dias de cultura bacteriana, (f) detalhe do vaso formado dentro da macroestrutura de celulose bacteriana após cinco dias de cultivo.....105

Figura 15 – Micrografias de cortes transversais e longitudinais da macroestrutura de celulose bacteriana meta-vascularizada: (a)

detalhe do meta-vaso interno no interior da macroestrutura de celulose bacteriana liofilizada e seccionada transversalmente; (b) detalhe da entrada do canal mostrando o contraste de porosidade entre a região interior e exterior do vaso; (c) corte longitudinal da macroestrutura de celulose bacteriana; (d) Macroestruturas meta-vascularizadas de celulose bacteriana hidratadas; (e) detalhe da organização das nanofibras de celulose bacteriana no interior do canal, similar à estrutura pelicular lisa da membrana de celulose bacteriana; (f) interface entre o interior do vaso e o exterior obtido através de corte longitudinal da macroestrutura liofilizada; (g) detalhe da entrada no meta-vaso correspondente à amostra apresentada em (d); (h) e (i) detalhe da estrutura porosa que envolve o vaso interno da macroestrutura de celulose bacteriana.....106

Figura 16 – Micrografia de MEV-FEG da ruptura da superfície do meta-vaso interno produzido na macroestrutura de celulose bacteriana. A imagem mostra que toda a estrutura pelicular lisa (SP-BCM) do vaso é envolta por uma rede porosa de nanofibras de celulose bacteriana.....107

Figura 17 – Secções transversais da macroestrutura de celulose bacteriana cultivada por 30 dias com células endoteliais humanas (HUVECs) obtidas através da técnica de inclusão em historesina e coradas com azul de toluidina. (a), (c) e (d) detalhes do meta-vaso interno da macroestrutura de celulose bacteriana, sendo que as HUVECs recobriram toda a superfície interna do canal e (b) migração das HUVECs pelas paredes do meta-vaso.....108

Figura 18 – Micrografia e imagens de MEV e microscopia de fluorescência da macroestrutura da celulose bacteriana. (a) mostra detalhe do canal interno à macroestrutura de celulose bacteriana após liofilização técnica que permitiu a remoção da estrutura porosa que envolvia este canal. (b) imagens da entrada do meta-vaso interno à macroestrutura de celulose bacteriana contendo células endoteliais revestindo a superfície interna, sendo que as células foram coradas com o kit Live/Dead[®]. As células viáveis estão coradas em verde (calceína) e as células mortas em vermelho (homodímero de etídio). (c), (d), (e), (f) e (g) mostram imagens de corte longitudinal do canal mostrado em (b) comprovando que as HUVECs endotelizam o canal interno à macroestrutura de celulose bacteriana em toda a sua extensão.....109

SUMÁRIO

Desenvolvimento de estruturas vasculares endotelizadas em scaffolds de celulose bacteriana.....	1
CAPÍTULO 1.....	31
1. Introdução, motivação, justificativa e objetivos.....	33
1.1. Introdução e motivação.....	33
1.2. Objetivos.....	35
CAPÍTULO 2.....	37
2. Fundamentação teórica.....	39
2.1. Engenharia de tecidos ou engenharia tecidual.....	39
2.2. Celulose bacteriana - aplicações em engenharia de tecidos.....	40
2.3. Vasos sanguíneos.....	44
2.4. Engenharia de tecidos vascularizados.....	47
CAPÍTULO 3.....	55
3. Efeito da microestrutura da celulose bacteriana na adesão de células endoteliais.....	57
3.1. Introdução.....	57
3.2. Materiais e métodos.....	60
3.2.1. Meio e condições de cultura bacteriana.....	60
3.2.2. Produção de celulose bacteriana.....	60
3.2.3. Purificação das membranas de celulose bacteriana.....	61
3.2.4. Caracterização da celulose bacteriana.....	61
3.2.5. Cultura de células endoteliais.....	62
3.2.6. Ensaio de adesão das células endoteliais.....	63
3.2.7. Caracterização de adesão celular por microscopia eletrônica de varredura.....	63
3.2.7.1. Secagem com etanol.....	64
3.2.7.2. Secagem com HMDS.....	64
3.2.7.3. Secagem por ponto crítico de CO ₂	64
3.2.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	65
3.3. Resultados e discussão.....	65
3.3.1. Caracterização da membrana de celulose bacteriana.....	65
3.3.2. Adesão de células endoteliais na celulose bacteriana.....	68
3.4. Considerações finais.....	75
CAPÍTULO 4.....	77
4. Influência da microestrutura da celulose bacteriana no comportamento de células endoteliais.....	79
4.1. Introdução.....	79
4.2. Materiais e métodos.....	82

4.2.1.	Produção, condições de cultura e purificação de celulose bacteriana.....	82
4.2.2.	Cultura de células.....	82
4.2.3.	Contato direto para avaliação de adesão, densidade e morfologia celular.....	83
4.2.4.	Viabilidade e proliferação celular.....	83
4.2.5.	Migração vertical.....	84
4.2.6.	Morte Celular.....	84
4.2.7.	Análise Estatística da viabilidade e proliferação celular	85
4.3.	Resultados e discussão.....	85
4.4.	Considerações finais.....	97
CAPÍTULO 5.....		99
5.	Endotelização de macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas.....	101
5.1.	Introdução.....	101
5.2.	Materiais e Métodos.....	103
5.2.1.	Produção de macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas.....	103
5.2.2.	Purificação das macroestruturas de celulose bacteriana	103
5.2.3.	Caracterização das macroestruturas de celulose bacteriana.....	103
5.2.4.	Endotelização.....	104
5.2.5.	Inclusão em Historesina.....	104
5.2.6.	Microscopia de fluorescência.....	105
5.3.	Resultados e Discussão.....	105
5.3.1.	Caracterização de macroestruturas de celulose bacteriana.....	105
5.3.2.	Endotelização de meta-vasos em macroestruturas de celulose bacteriana.....	108
5.4.	Considerações finais.....	112
CAPÍTULO 6.....		113
6.	Conclusões e sugestões.....	115
6.1.	Conclusões.....	115
6.2.	Sugestões para trabalhos futuros.....	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		119

GLOSSÁRIO

Actina: abundante proteína que forma os filamentos de actina nas células eucarióticas. Os filamentos de actina são os maiores constituintes do citoesqueleto de todas as células eucarióticas. A forma polimérica da actina é denominada F-actina.

Angiogênese: crescimento de um novo vaso sanguíneo através da ramificação de um vaso sanguíneo pré-existente.

Biocompatibilidade: conceito amplo que traduz um conjunto de fenômenos relacionados com o envolvimento biológico a que o material fica sujeito no organismo humano. Materiais biocompatíveis devem apresentar pelo menos duas das 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 diferentes presentes na vascularização (células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos) e outros tipos celulares (órgão específicas); excelente estrutura porosa com uma ampla área superficial que permite às células migrarem e interagirem entre si; resistência mecânica para suportar a organização celular; e a capacidade para se conformar em várias formas.

Biomaterial: material utilizado no desenvolvimento de próteses ou substratos que entram em contato direto com células, tecidos e órgãos vivos. Material com estrutura coordenada no tempo e organizada no espaço, capaz de codificar (induzir ou inibir) sinais físicos, químicos e biológicos dentro de uma microestrutura que controle o comportamento celular. O material deve se enquadrar no conceito de biocompatibilidade.

Scaffold: Estruturas capazes de suportar a formação tridimensional de um tecido biológico.

Características físicas e químicas: composição, densidade, microestrutura, propriedades termodinâmicas e elétricas.

Engenharia de tecidos: é uma área interdisciplinar relativamente nova e combina conhecimentos de engenharia e ciências da vida, que se destina a produzir substitutos viáveis para a restauração, manutenção ou

melhoramento da função dos tecidos ou órgãos humanos. A engenharia de tecidos tem como objetivo desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual.

Lâmina basal: uma fina camada de matriz extracelular que separa as células endoteliais das células musculares lisas que revestem os vasos sanguíneos.

Matriz extracelular: complexa rede de polissacarídeos e proteínas secretada pelas células e na qual as células estão embebidas.

Macroestruturas de celulose bacteriana: corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana, produzidos em cultivo agitado da bactéria *G. hansenii*. Estes corpos tridimensionais podem atingir aproximadamente 150 cm³.

Meta-vaso: vaso artificial produzido por biosíntese no interior de macroestruturas de celulose bacteriana, que mimetiza um vaso sanguíneo.

Propriedades mecânicas: elasticidade, resistência, dureza e fadiga.

Vasculogênese: a formação de novos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras.

ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

Esta tese descreve a endotelização de meta-vasos bio-sintetizados em macroestruturas de celulose bacteriana. A tese está organizada em capítulos da seguinte forma:

O conteúdo do **Capítulo 1** apresenta uma introdução sobre quais foram os fatores que motivaram a execução desta tese. As justificativas apresentadas esclarecem a importância da endotelização de biomateriais *in vitro*. Neste capítulo também será apresentado o objetivo principal da tese e as questões que levaram à execução de cada etapa.

O **Capítulo 2** apresenta uma revisão bibliográfica sobre os temas que envolvem a multidisciplinaridade desta tese. A revisão bibliográfica tem como foco destacar a importância do desenvolvimento de tecidos e/ou órgãos vascularizados para o futuro da engenharia tecidual.

O **Capítulo 3** descreve a importância das características físicas das superfícies de biomateriais na morfologia das células endoteliais. Neste capítulo a adesão de células endoteliais foi avaliada em função das características microestruturais das nanofibras de celulose bacteriana. Técnicas de secagem da membrana de celulose bacteriana contendo células endoteliais serão apresentadas como uma alternativa para avaliação das características morfológicas celulares em hidrogéis de celulose bacteriana por microscopia eletrônica de varredura.

O **Capítulo 4** descreve o quanto as alterações na morfologia das células endoteliais (avaliada no **Capítulo 3**) podem alterar processos como, por exemplo, a viabilidade, proliferação, migração e morte celular. Assim, neste capítulo serão discutidos e apresentados os resultados relacionados ao comportamento das células endoteliais quando cultivadas em distintas superfícies da membrana de celulose bacteriana.

O **Capítulo 5** mostra a endotelização de meta-vasos da macroestrutura de celulose bacteriana obtidos após avaliação prévia do comportamento das células endoteliais em microestruturas da celulose bacteriana, estudados no **Capítulo 3 e 4**.

O **Capítulo 6** apresenta as conclusões finais da tese e as sugestões para continuidade deste estudo.

O **Capítulo 7** apresenta as referências científicas utilizadas para execução deste estudo.

CAPÍTULO 1

Introdução, Motivação, Justificativa e Objetivos

Neste capítulo será apresentada uma breve descrição sobre o trabalho realizado nos capítulos 3, 4 e 5. Apresenta também os principais motivos que levaram à execução dos objetivos aqui propostos.

1. Introdução, Motivação, Justificativa e Objetivos

1.1. Introdução e Motivação

O desenvolvimento de novos produtos biomédicos é de grande interesse para o aprimoramento de novas técnicas que possibilitem melhoria no tratamento de saúde e na qualidade de vida. Segundo dados do relatório de Materiais Avançados no Brasil (2010-2022), do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE), em 2008 a população brasileira atingiu a expectativa de vida ao nascer de 73 anos e estima-se, para 2020, 30 milhões de brasileiros com mais de 60 anos (Medeiros and Filho, 2010). O incremento da longevidade aumenta também a demanda por produtos e tecnologias avançadas que melhorem as condições de sobrevivência da população. Os EUA gastam mais de US\$ 1,5 trilhão por ano em saúde. Atualmente, a prioridade do governo americano é combater os gastos decorrentes do envelhecimento populacional; o governo brasileiro está apostando na pesquisa e desenvolvimento com abordagens em biomedicina como uma das alternativas mais promissoras para a solução de problemas voltados à saúde pública; no Brasil este tipo de abordagem vem sendo incorporado recentemente às políticas de incentivo público (Medeiros and Filho, 2010). O alto nível de prioridade atribuído à engenharia tecidual não surpreende, pela tendência de evolução da medicina na direção da regeneração de órgãos e tecidos, de uma forma personalizada.

A engenharia de tecidos é uma área que tem como objetivo controlar e ampliar a capacidade natural de regeneração tecidual, adotando diferentes abordagens como: o desenvolvimento de dispositivos médicos e órgãos artificiais, engenharia tecidual e biomateriais, terapia celular e testes clínicos (Palsson and Bhatia, 2004; Tsang and Bhatia, 2004; Tsuda *et al.*, 2007). Pesquisadores apostam que em 10 anos, soluções médicas baseadas em biomedicina/biomateriais devam estar disponíveis para o tratamento de pacientes, isto se os incentivos governamentais forem concretizados (Medeiros and Filho, 2010). O projeto de um *scaffold* objetiva mimetizar o funcionamento da matriz extracelular (MEC) através da construção de uma estrutura coordenada no tempo e organizada no espaço, capaz de codificar (induzir ou inibir) sinais físicos, químicos e biológicos dentro de uma microestrutura que controle o comportamento celular (Discher *et al.*, 2005; Methe *et al.*, 2008; Kniazeva and Putnam, 2009). Inúmeros materiais têm se mostrado opções promissoras para aplicações médicas. Esses biomateriais podem ser de origem cerâmica, metálica e/ou

polimérica (Ifkovits and Burdick, 2007). Um dos maiores obstáculos que limitam o rápido crescimento da engenharia de tecidos complexos é a inabilidade de sustentar grandes massas celulares incorporadas à macroestrutura. Isto se deve ao fato de que em distâncias celulares maiores ou iguais a 150 μm o sistema vascular é essencial para o fornecimento de oxigênio e nutrientes. Adicionalmente, em função das limitações de difusão de oxigênio, a viabilidade das células está limitada à presença de vascularização (Awwad *et al.*, 1986; Griffith *et al.*, 2005). Desta forma estratégias de vascularização são primordiais para o avanço da engenharia tecidual. Assim, o processo de vascularização de biomateriais *in vitro* é uma das áreas mais motivadoras da investigação médica.

A celulose produzida por bactérias é um polímero que tem despertado grande interesse na área médica e vem sendo estudada para ser utilizada como biomaterial em diversas aplicações da engenharia de tecidos devido às suas propriedades vantajosas (Fontana *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1993; Klemm *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2005; Backdahl *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2006; Helenius *et al.*, 2006; Backdahl *et al.*, 2008; Rambo *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2010; Zaborowska *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2011; Petersen and Gatenholm, 2011; Recouvreux *et al.*, 2011; Zahedmanesh *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2012). Entretanto, o potencial da celulose bacteriana (CB) para o desenvolvimento de produtos de alto valor biotecnológico ainda não foi completamente explorado, e a celulose bacteriana permanece pouco citada em comparação a outros polímeros.

Diversos ramos da engenharia podem contribuir substancialmente para o desenvolvimento da medicina na medida em que suas técnicas e métodos são fundamentais para a obtenção em escala laboratorial e industrial desses produtos em particular. As contribuições de engenharia química para este novo campo de estudos tem sido fundamentais (Langer and Vacanti, 1993; Langer, 2000a). Uma plataforma macroestruturada baseada em Celulose Bacteriana (CB) foi desenvolvida pelo Laboratório de Tecnologias Integradas – IntelLab (www.intelab.ufsc.br) – UFSC (Recouvreux, 2008; Recouvreux *et al.*, 2011), sendo que o processo de produção dessa macroestrutura tridimensional (*cocoons*) está segurado através do pedido de patente PI0803173-8 (Porto *et al.*, 2008). Recentemente foram executadas modificações estruturais destas plataformas, como a formação de canais internos similares à rede vascular. Esta nova plataforma foi denominada como macroestruturas de CB meta-vascularizadas.

Buscando comprovar que as macroestruturas de CB meta-vascularizadas podem ser utilizadas como uma estrutura ideal para o desenvolvimento da engenharia de tecidos vascular, esforços vêm sendo realizado no IntelLab através do estabelecimento de uma relação entre as propriedades estruturais e biológicas desse material. A macroestrutura de CB meta-vascularizada pode representar bem a anatomia de tecidos e órgãos vascularizados. Os vasos sanguíneos em geral são constituídos por uma membrana interna (túnica íntima), formada por uma camada de endotélio que está aderida à lâmina basal (Chan and Inoue, 1994; Wood *et al.*, 2010; Zani and Edelman, 2010), a lâmina basal limita a interface de células endoteliais e células musculares lisas (túnica média). A endotelização dos canais internos à macroestrutura da CB é uma das questões mais desafiadoras, já que as células endoteliais são sensores naturais do ambiente vascular *in vivo* (Helmke, 2005). Disfunções endoteliais, caracterizadas por danos das funções bioquímicas, precedem a doença vascular, servindo como iniciador e propagador do dano vascular, o que é considerado um marcador de várias doenças (Hess *et al.*, 2009).

O microambiente, neste caso a lâmina basal, é uma estrutura que regula o comportamento das células endoteliais. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de estruturas que imitem fisicamente este microambiente, permitindo respostas celulares “naturais” quanto à sua aderência, proliferação e migração celular. Isso permitiria a formação de um endotélio artificial (Hirschi *et al.*, 2008). Quando a estrutura é preenchida com células endoteliais, células progenitoras podem promover o revestimento natural do espaço físico através da secreção de componentes da lâmina basal pelas próprias células (Libby *et al.*, 2002). A utilização das macroestruturas de CB meta-vascularizadas para o desenvolvimento ou regeneração de tecidos e/ou órgãos lesados é uma alternativa atrativa devido à possibilidade de se obter um novo material biosintético vaso-estruturado. A combinação de propriedades intrínsecas de um leito vascular (lâmina basal e matriz extracelular) geram grande potencial para aplicações biotecnológicas e médicas.

1.2. Objetivos

Objetivo Geral

Esta tese teve como objetivo central demonstrar a viabilidade de endotelização de vasos sanguíneos artificiais (meta-vasos)

biossintetizados em macroestruturas de celulose bacteriana, visando futuramente constituir tecidos vascularizados e órgãos artificiais.

Em particular, este estudo pretendeu abordar às seguintes questões:

- 1) Existe diferença de estrutura física (i.e., topografia) quando se compara ambas as superfícies de membranas de celulose bacteriana?
- 2) É viável o cultivo de células endoteliais (HUVECs) em superfícies de meta-vasos de celulose bacteriana?
- 3) Como é afetada a morfologia celular em condições de cultivo em meta-vasos?
- 4) Até que ponto se pode avaliar a migração vertical (cultivo 3D) em diferentes superfícies e estruturas 3D?
- 5) Que técnicas podem ser desenvolvidas para avaliar a adesão celular em função da natureza das características de superfície da celulose bacteriana?
- 6) Como as características da superfície influenciam a dinâmica da viabilidade, proliferação e morte de células endoteliais?
- 7) É possível endotelizar os meta-vasos de macroestruturas de celulose bacteriana?

CAPÍTULO 2

Fundamentação Teórica

Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o desenvolvimento de tecidos e/ou órgãos vascularizados para o futuro da engenharia tecidual.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Engenharia de Tecidos ou Engenharia Tecidual

Em 2010 foi publicado um relatório de estudos prospectivos sobre materiais, realizado em 2008 e 2009, onde foi concluído que os setores prioritários em Pesquisa Desenvolvimento e Inovação (PD&I) de materiais avançados para a saúde da população brasileira dependerá do desenvolvimento de setores como a engenharia tecidual e terapias celulares (Medeiros and Filho, 2010). De 3.982 patentes registradas no INPI (instituto nacional da propriedade industrial) e apontadas neste estudo, a grande maioria tem como foco o desenvolvimento de polímeros para outras aplicações que não envolvem engenharia tecidual. Assim, é fundamental consolidar a pesquisa de excelência em engenharia de tecidos no Brasil para que a indústria de produtos voltados para a saúde atenda à demanda crescente por procedimentos de alta complexidade. As tendências mundiais, em longo prazo (2020-2050), apontam para grandes investimentos em medicina diagnóstica e tecidual regenerativa (Medeiros and Filho, 2010).

A engenharia de tecidos, também conhecida como engenharia tecidual, tem como objetivo desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual (Palsson and Bhatia, 2004). Dessa forma a engenharia de tecidos depende do desenvolvimento de biomateriais que mimetizem microambientes adequados para a cultura de células. Estes podem também servir para o desenvolvimento de um novo tecido que pode ser implantado no paciente, substituindo em parte, ou como um todo, um tecido ou órgão lesado. Os avanços recentes na área de biomateriais e suas aplicações em áreas biomédicas mostram o grande potencial de diversos polímeros no desenvolvimento de novas classes de materiais médicos (Langer, 2000b; Tsang and Bhatia, 2004; Discher *et al.*, 2005; Methe *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2009). Diversos materiais têm sido propostos para simular um microambiente tridimensional (3D) para o desenvolvimento da engenharia tecidual. Surpreendentemente, relativamente poucos trabalhos se utilizam de celulose bacteriana como biomaterial (Fontana *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1993; Klemm *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2005; Backdahl *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2006; Helenius *et al.*, 2006; Backdahl *et al.*, 2008; Rambo *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010; Zaborowska *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2011; Petersen and Gatenholm, 2011; Recouvreur *et al.*, 2011; Zahedmanesh *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2012).

A engenharia de tecidos é uma área relativamente nova e combina conhecimentos de engenharia e materiais para melhorar ou substituir funções biológicas. A engenharia de tecidos é descrita por Langer e Vacanti, dois pioneiros da área, como uma área interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que podem restaurar, manter ou melhorar a formação tecidual (Langer and Vacanti, 1993).

O conceito básico de *scaffold* inclui um suporte físico (estrutura 3D) composto de polímeros sintéticos ou materiais naturais (colágeno, elastina, fibrina, laminina, fibronectina, entre outros) que inicialmente serve como uma estrutura padrão que imita a matriz extracelular (MEC) nas quais as células se organizam e proliferam *in vitro* antes da implantação *in vivo*.

As pesquisas iniciais focaram no desenvolvimento de materiais inertes como, por exemplo, o Teflon[®] e o silicone, que provocaram inexpressivas respostas das funções biológicas e interações teciduais. Atualmente outros materiais estão sendo desenvolvidos para estimular reações das células que possam ser completamente controladas. O conceito chave no desenvolvimento de *scaffolds* é que estes devem conter informações químicas ou estruturais que permitam a comunicação célula-célula e o controle da formação tecidual dependendo do tipo de aplicação desejada.

2.2. Celulose Bacteriana - aplicações em engenharia de tecidos

Só recentemente a celulose sintetizada por bactérias vem despertando grande interesse como biomaterial para aplicações em engenharia de tecidos. Embora Brown tenha identificado a bactéria *Glucanacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) em 1886, como uma bactéria produtora de celulose (Brown, 1886), até hoje esta espécie é reconhecida como a única capaz de produzir celulose em escala comercial (Brown *et al.*, 1976; Klemm D, 2006). Esta bactéria foi reclassificada de *G. xylinum* ATCC 23769 para *G. hansenii* (Yamada *et al.*, 1997). A *G. hansenii* é uma bactéria Gram negativa, estritamente aeróbica que produz uma membrana de celulose na interface líquido-ar do meio de cultivo (Dudman, 1960; Watanabe *et al.*, 1998). A bactéria *G. hansenii* tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para a biossíntese de celulose. Os meios de cultivo bacterianos mais utilizados são constituídos basicamente de uma fonte de carboidrato (sacarose, glicose, frutose, lactose ou manitol entre outros), além da utilização do extrato de levedura como fonte de nitrogênio (Yamada *et*

al., 1997). Tradicionalmente a celulose bacteriana é produzida em culturas estáticas utilizando a bactéria *G. hansenii*, que produz uma membrana de celulose na superfície do meio de cultivo que pode ser desenvolvida até uma membrana de vários milímetros de espessura.

A celulose bacteriana (CB) produzida pelas bactérias do gênero *Gluconacetobacter* possuem propriedades peculiares tanto químicas quanto físicas. Quimicamente a celulose é um homopolissacarídeo linear, cuja unidade estrutural, a celobiose, é formada pela união de duas moléculas de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Grupos hidroxilas estabelecem interações tipo ponte de hidrogênio intra e intermoleculares que são responsáveis pela rigidez da cadeia, pela formação de nanofibras e estáveis e fazem com que a celulose seja insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (Kennedy *et al.*, 1982). Além da bactéria formar celulose com alto grau de pureza (livre de lignina e hemicelulose), a CB é altamente hidrofílica, sendo que aproximadamente 99% do seu volume é constituído de líquido (Klemm *et al.*, 2005; Backdahl *et al.*, 2006). A CB, no estado hidratado, possui alta resistência mecânica, apresentando elevado módulo de elasticidade quando comparada a materiais orgânicos como, por exemplo, o polipropileno e o tereftalato de polietileno. A CB é facilmente moldável, apresenta cristalinidade de 60 a 80%, não é alergênica e nem tóxica (Fontana *et al.*, 1990; Klemm *et al.*, 2005; Svensson *et al.*, 2005; Czaja *et al.*, 2006). A elevada pureza da CB e suas propriedades peculiares têm despertado grande interesse na indústria alimentícia (Omoto *et al.*, 2000), cosmética (Czaja *et al.*, 2006) e na medicina (Fontana *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1993; Klemm *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2005; Backdahl *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2006; Helenius *et al.*, 2006; Backdahl *et al.*, 2008; Rambo *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2010; Zaborowska *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2011; Petersen and Gatenholm, 2011; Recouvreux *et al.*, 2011; Zahedmanesh *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2012).

A CB vem sendo estudada especificadamente como uma estrutura para regeneração de tecidos cartilagosos (Svensson *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2010), revestimento de ferimentos (Fontana *et al.*, 1990), implantes dentários (Dos Anjos *et al.*, 1998), interação neuronal (Pertile *et al.*, 2012) e implantes vasculares (Helenius *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2010; Fink *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2011). Quanto à capacidade de degradação, a celulose não é degradada por células humanas, mas alguns animais produzem em seu intestino a enzima celulase, degradando assim a celulose (Helenius *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2009). Um estudo de degradação mostrou que as

nanofibras de CB não degradaram em até quatro meses de implantação em camundongos *in vivo* (Pertile *et al.*, 2011).

A integração do biomaterial com o tecido hospedeiro é essencial para o sucesso da engenharia tecidual. Williams (1999) definiu a biocompatibilidade de um material como a capacidade deste de realizar ou ativar respostas biológicas apropriadas, como por exemplo, gerar baixo processo inflamatório no tecido hospedeiro, dependendo da especificidade da aplicação (Williams, 1999). Helenius e colaboradores (2006) mostraram que a CB é um material que se integra totalmente ao tecido hospedeiro *in vivo* e não induz processos inflamatórios e nem rejeição ao longo do tempo (Helenius *et al.*, 2006). Outros pesquisadores têm mostrado que tubos de CB integraram-se completamente à carótida de porcos (Wippermann *et al.*, 2009). CB tem sido sugerida como um material potencialmente ideal para engenharia de tecidos cartilaginosos, vasos sanguíneos (BASYC[®]), epidérmicos, entre outros (Biofill[®], Gengiflex[®], XCell[®]) (Fontana *et al.*, 1990; Svensson *et al.*, 2005; Czaja *et al.*, 2006). Gengiflex[®] tem sido indicada para reconstrução de tecidos periodontais (Farah, 1990; Jonas and Farah, 1998), XCell[®], da companhia Xylos Corporation (Langhorne-PA), tem sido indicada para tratamento de feridas crônicas (Xylos Corporation, 2010) e até como lentes de contato para regeneração de córnea. Na medicina veterinária, Cellumed[®] tem sido desenvolvido para o tratamento de úlceras em equinos. Barud e colaboradores (2008) recentemente desenvolveram géis, cremes, pomadas e sprays baseados em CB para aplicação com agentes bactericidas através da incorporação de prata e fitoterápicos (Barud *et al.*, 2008). A biocompatibilidade *in vivo* da CB também vem sendo avaliada. Recentemente, alguns pesquisadores estudaram a utilização da CB em cirurgias de restituição da laringe (De Souza *et al.*, 2010). Esses estudos de biocompatibilidade da CB *in vivo* utilizam modelos animais e têm demonstrado uma excelente integração da CB com o tecido lesado sem a presença de processos inflamatórios agudos.

A membrana de CB formada na interface entre o meio de cultivo e o ar em condições estáticas apresenta duas superfícies com microestruturas distintas. A membrana de CB formada na interface com o ar possui uma superfície formada por um arranjo altamente denso de nanofibras de CB (lado denso) e a outra superfície possui um arranjo anisotrópico e poroso de nanofibras de CB (lado poroso) (Backdahl *et al.*, 2006). Visando maximizar a produção de CB, a produção sob condições dinâmicas (agitação) de cultura têm sido avaliada por alguns

grupos (Czaja *et al.*, 2004; Recouvreux *et al.*, 2011). Alguns pesquisadores buscam definir um meio quimicamente ideal para cultivos sob agitação e também a determinação de parâmetros ótimos (temperatura e velocidade) (Ge *et al.*, 2011; Recouvreux *et al.*, 2011). Um dos grandes problemas de sistemas para a produção de CB em culturas agitadas está relacionado a mutações espontâneas, sendo que algumas bactérias, quando transferidas para culturas agitadas, espontaneamente se transformam em linhagens não produtoras de celulose, resultando, assim, em baixo rendimento de celulose (Heo and Son, 2002).

Meios de cultivo quimicamente definidos para produção com altos rendimentos de celulose em agitador orbital utilizando a bactéria *G. hansenii* foram investigados e definidos no InteLab/UFSC. Este estudo resultou na produção de macroestruturas de CB com dimensão de cerca 13 cm em seu maior eixo e volumes maiores do que 150 cm³ (Recouvreux *et al.*, 2011). Estas macroestruturas de CB foram produzidas através da utilização de meio de cultura que possui como fonte de carbono o manitol, onde as bactérias foram cultivadas em condições agitadas (2,5-3,3 Hz) (Recouvreux *et al.*, 2011). As macroestruturas de CB apresentam uma camada externa de nanofibras de CB caracterizada por uma alta densidade de fibras, semelhantes às encontradas nas membranas de CB (superfície densa), que envolve uma estrutura altamente porosa (superfície porosa) (Recouvreux *et al.*, 2011). Estas características estruturais da CB vêm despertando o interesse do nosso grupo na utilização destas estruturas macroscópicas para regeneração de tecidos e órgãos. A principal proposta de utilização de um *scaffold* para a engenharia de tecidos é que sua estrutura seja idealmente projetada para suportar a aderência e a proliferação das células do tecido hospedeiro, mantendo para tanto estas células em condições estáveis de oxigenação e nutrição. Desta forma, a capacidade de produção de vasos sanguíneos no interior de biomateriais é essencial para a manutenção da sobrevivência tecidual. Os requisitos necessários para que um biomaterial suporte a vascularização e consequentemente, a regeneração tecidual dependem diretamente da sua microestrutura. Buscando-se avaliar a capacidade de vascularização da macroestrutura de CB, foi desenvolvida uma plataforma experimental baseada na construção de canais internos na macroestrutura de CB (meta-vasos) (Recouvreux, 2008). Esta nova macroestrutura meta-vascularizada de CB será avaliada quanto à sua capacidade de endotelização no presente trabalho.

2.3. Vasos sanguíneos

O sistema vascular é o primeiro órgão funcional a ser desenvolvido nos embriões de vertebrados e é crucial para o desenvolvimento tecidual, homeostase e regeneração. Os primeiros vasos sanguíneos são desenvolvidos a partir de células progenitoras as quais se diferenciam em células endoteliais que se organizam em pequenos anéis circulares. Este processo de formação de novos vasos sanguíneos é denominado vasculogênese (Folkman, 1995; Risau, 1995; 1997). A progressão de crescimento destes novos vasos formados, assim como o remodelamento destes ocorre através de um processo denominado de angiogênese (Carmeliet, 2000; 2003; Laschke, 2006). A vasculatura possui uma plasticidade intrínseca que se adapta dinamicamente a microambientes variados através de processos como ramificação, brotamento ou regressão. Durante a vida adulta, os vasos sanguíneos são quiescentes e estáveis, mas em alguns casos (doenças, regeneração e processos reprodutivos) ocorrem processos de remodelamento desta estável rede vascular.

A vasculatura é constituída de grande vasos (artérias/veias) que estão conectados a vasos menores os quais estão distribuídos no interior de tecidos (capilares).

As artérias ou arteríolas são os vasos que carregam o sangue que é bombeado pelo coração para todas as partes do corpo e facilitam a troca de nutrientes, oxigênio e produtos residuais entre o sangue e os tecidos. As artérias transportam o sangue sob alta pressão sanguínea quando comparada às veias, possuindo assim paredes vasculares mais espessas e elásticas. As veias ou vênulas são vasos que transportam o sangue dos tecidos de volta para o coração. Os capilares, vasos menores, são uma exceção da estrutura geral. A função dos capilares é suprir a oxigenação tecidual através da distribuição do oxigênio do sangue. Para permitir a difusão de oxigênio, a parede dos vasos capilares é composta por apenas uma monocamada de células endoteliais. Resumidamente, os vasos sanguíneos transportam o sangue de um tecido para outro no corpo humano, assegurando assim a homeostase metabólica pela liberação de oxigênio e nutrientes e através da remoção dos compostos residuais do meio celular.

Todos os tipos de vasos sanguíneos são circundados por uma monocamada de células endoteliais (endotélio) aderidas à lâmina basal. Desta forma, o endotélio é composto de uma monocamada de células epiteliais escamosas (células endoteliais) que se alinham dentro dos vasos sanguíneos de forma confluyente, atingindo uma área total de

aproximadamente 350 a 1.000 m² no corpo humano (Jaffe, 1987; Pries *et al.*, 2000). Estas células possuem morfologia achatada, formando uma barreira entre o tecido vascular e o sangue. O endotélio é uma camada dinâmica de células que, no estado de quiescência, exhibe propriedades anti-trombóticas. O endotélio assegura a estabilidade da vasculatura, estando diretamente ligado à vasoconstrição/vasodilatação, propriedades anticoagulantes/procoagulantes, adesão ou não das células do sangue às paredes dos vasos e a inibição ou não da proliferação celular. Assim, o endotélio regula o tônus vascular, mantém a hemostasia, controla a estrutura vascular e media processos imunológicos e inflamatórios (Hess *et al.*, 2009).

Estudos têm mostrado que nem todas as células endoteliais são semelhantes em relação a características morfológicas e, sendo assim, os vasos sanguíneos possuem uma diversidade de arquiteturas. Os vasos sanguíneos são órgão-específicos e apresentam variações fenotípicas dependendo de sua função (Aird, 2007b; a; Yano *et al.*, 2007). As células endoteliais são tipicamente achatadas, mas apresentam um fenótipo cuboidal em vênulas endoteliais (Miyasaka and Tanaka, 2004). Estas células são alongadas e fusiformes em arteríolas, apresentam formato irregular em capilares e são arredondadas em vênulas coletoras de produtos residuais (Miyasaka and Tanaka, 2004). A espessura das células endoteliais varia desde 0,1 µm em capilares e em veias, enquanto na aorta, podem chegar até 1 µm (Florey, 1966). Capilares são contínuos e não fenestrados na pele, no pulmão e no coração, mas são contínuos e fenestrados nas glândulas endócrinas e glomérulos, e ainda descontínuos e fenestrados no fígado. Esta heterogeneidade está relacionada a funções específicas de cada órgão ou tecido em particular (Aird, 2007b; a).

Os vasos sanguíneos são constituídos basicamente de três camadas denominadas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. A composição e a estrutura destas três camadas dependem da localização do vaso sanguíneo na rede vascular do corpo humano, variando também o tamanho e o tipo de vaso. Em vasos maduros, a túnica íntima é constituída por uma monocamada de células endoteliais que estão aderidas a um fino tecido conectivo denominado de lâmina basal. As células endoteliais da túnica íntima estão conectadas à lâmina basal através de finas junções que regulam o transporte de moléculas através da monocamada endotelial, assim como estabelecem junções de comunicação célula-célula (junções GAP) que transferem íons e metabólitos. As células endoteliais se comunicam com as células musculares lisas diretamente através de processos que se estendem da lâmina basal até a túnica média. A túnica média contém somente células

musculares lisas embebidas em uma matriz extracelular (MEC) composta de elastina, colágeno, fibronectina e proteoglicanas. As células musculares lisas possuem miofibrilas orientadas ao longo do eixo central da célula e recobrem o outro lado da lâmina basal. As células musculares lisas são responsáveis pela contração e relaxamento da parede dos vasos e esta camada é mais espessa em artérias do que em veias. Na aorta, a túnica média alcança aproximadamente 500 µm e nas veias aproximadamente 20-50 µm. A túnica adventícia é a última camada que compõe a parede de vasos sanguíneos e consiste de um tecido conectivo que contém colágeno tipo I, elastina, nervos, fibroblastos e “*vasa vasorum*”. “*Vasa vasorum*” é uma rede de arteríolas, capilares e vênulas que suprem de oxigênio as camadas mais externas da parede vascular (Holzapfel and Ogden, 2003).

As células endoteliais reagem a estímulos físicos e químicos do microambiente vascular e estão envolvidas na resposta imune, na coagulação, na produção de componentes da matriz extracelular e na regulação do tônus vascular (Hess *et al.*, 2009).

A primeira cultura de células endoteliais *in vitro* aconteceu em 1974 (Gimbrone *et al.*, 1974). Desde então estudos genéticos de culturas de células endoteliais humanas tem tentado identificar as principais moléculas reguladoras da rede vascular. Algumas das principais moléculas envolvidas no desenvolvimento vascular são: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Ferrara *et al.*, 2003), as angiopoietinas (sistema Tie) (Thomas and Augustin, 2009), componentes das junções do endotélio vascular (caderinas) (Dejana *et al.*, 2009) e os mediadores da interação célula-matriz (integrinas) (Silva *et al.*, 2008). O VEGF-A regula a angiogênese e é o principal regulador das funções endoteliais como, por exemplo, proliferação, migração, ramificação e permeabilidade vascular (Kroll and Waltenberger, 2000; Lamalice *et al.*, 2007), além de outros inúmeros fatores envolvidos no desenvolvimento vascular. A desorganização da vasculatura é um indicador de lesões ou doenças que são revertidas pela regeneração vascular em condições saudáveis. Na ausência de vascularização, os tecidos vivos acabam morrendo pela falta de oxigenação e de nutrientes distribuídos pelo sangue. Qualquer tecido (exceto a parte avascular da córnea e a cartilagem) necessita de uma rede vascular que deve estar distribuída de 100-200 µm (limite de difusão de oxigênio) de distância de cada célula que compõe este tecido, para que a oxigenação tecidual seja mantida (Awwad *et al.*, 1986; Griffith *et al.*, 2005).

Do ponto de vista da engenharia, as propriedades microestruturais e a heterogeneidade da lâmina basal, assim como o perfil molecular

amplamente variável do endotélio, desperta o interesse pelo desenvolvimento de uma rede vascular. Uma série de mecanismos celulares vem sendo descobertos recentemente. Estes mecanismos revelam que parcialmente o surgimento da rede vascular segue padrões específicos regulados pela auto-organização que é guiada pela microestrutura. É claro que muitos mecanismos permanecem não esclarecidos quanto ao entendimento da complexa rede vascular. O desenvolvimento vascular é um processo central para a engenharia de tecidos, sendo que a regulação de uma vasculatura engenheirada *in vitro* poderá contribuir para a regeneração tecidual *in vivo*. O principal motivo que relaciona a importância da vascularização para a engenharia de tecidos é que a vasculatura é um alvo terapêutico crucial para a sobrevivência tecidual e contribui para a formação de novos tecidos durante os processos de regeneração. O desenvolvimento e a investigação de questões fundamentais relacionadas à organogênese vascular poderão auxiliar no projeto de biomateriais que mantenham as condições de vascularização *in vivo*.

2.4. Engenharia de tecidos vascularizados

Existem dois enfoques principais pesquisados na engenharia de tecidos vasculares: o primeiro está relacionado ao desenvolvimento de métodos para vascularização de tecidos ou órgãos artificiais; o segundo foca no desenvolvimento de métodos para engenheirar a microestrutura de vasos sanguíneos, como veias ou artérias (Risau, 1997; Yancopoulos *et al.*, 2000). Um dos maiores obstáculos que limitam o rápido crescimento da engenharia de tecidos é a inabilidade de sustentar grandes massas celulares uma vez transferidas do ambiente *in vitro* para o ambiente *in vivo*. Em qualquer grande organismo vivo, o sistema vascular é essencial para fornecer oxigênio e nutrientes, permitindo a sinalização autócrina e removendo resíduos (Alberts *et al.*, 1994). Isto explica porque os atuais produtos de engenharia de tecidos têm apresentado um sucesso maior com tecidos menos espessos, como substituintes de vesículas, ou tecidos que necessitam de baixa oxigenação como os cartilaginosos. Enquanto numerosos estudos vêm apresentando o desenvolvimento de métodos para vascularizar tecidos espessos (Griffith *et al.*, 2005), o sucesso da integração depende da rápida difusão de oxigênio e do fornecimento de nutrientes para o transplante. Então, o estabelecimento e a manutenção do sistema vascular são necessários para o crescimento contínuo de quase todos os tecidos normais. Uma rede vascular desenvolvida em um *scaffold in*

vitro é alcançada quando pode funcionar plenamente como uma rede vascular natural *in vivo*.

Os critérios essenciais para o desenvolvimento de um arcabouço vascularizado estão relacionados à biocompatibilidade do material com uma superfície química que favoreça e permita: 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 diferentes presentes na vascularização (células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos) e outros tipos celulares (órgão específicas); excelente estrutura porosa com uma ampla área superficial que permite às células migrarem e interagirem entre si; resistência mecânica para suportar a organização celular; e a capacidade para se conformar em várias formas (Luong and Gerecht, 2009). Materiais biocompatíveis que têm mostrado um ou mais desses critérios satisfatórios podem ser classificados como biomateriais (Ifkovits and Burdick, 2007). Alguns exemplos de biomateriais utilizados em dispositivos biomédicos e que vêm sendo estudados como arcabouços em tecidos bioengenheirados são: ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), polietileno glicol (PEG), Matrigel (colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos e entactina) (Yoon *et al.*, 2005; Albig *et al.*, 2007), ácido hialurônico (Prestwich *et al.*, 1998), colágeno (Luong and Gerecht, 2009), fibrina (Zisch, Lutolf, Ehrbar *et al.*, 2003; Zisch, Lutolf and Hubbell, 2003), elastina alginato (ácido β -D-manurônico e ácido α -L-glucurônico) e dextrana.

Diversos estudos têm mostrado que as células cultivadas em superfícies 2D comportam-se diferentemente daquelas cultivadas em ambientes 3D (Ingber, 2002; Griffith and Swartz, 2006; Methe *et al.*, 2007; Lu, L. *et al.*, 2008; Methe *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009). No desenvolvimento embrionário ou em qualquer estrutura tecidual, células migram, proliferam e existem em um microambiente 3D contendo um arranjo diversificado de sinais bioquímicos e biofísicos. Então, o desenvolvimento de arcabouços 3D compatíveis com células vasculares e tecido-específicas é essencial para alcançar o objetivo da bioengenharia tecidual. Desta forma uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um biomaterial consiste em entender o papel das propriedades físico-químicas e de superfície na adesão de proteínas celulares ao biomaterial, uma vez que a interação biomaterial-proteína definirá a biocompatibilidade do material.

Para melhorar o sucesso clínico dos arcabouços vasculares, estratégias que apresentem o biomaterial o mais “biomimético” possível em termos de superfície física estão sendo explorados. Uma importante

abordagem seria imitar as características biofísicas nativas as quais têm impacto direto nas funções e na homeostase das células endoteliais. Alterações no microambiente biofísico das células endoteliais, os quais incluem os fundamentos de lâmina basal, têm implicado no estado homeostático do tecido vascular levando o desenvolvimento de várias patologias vasculares (Bayless and Davis, 2004; Jacot *et al.*, 2006; Candiello *et al.*, 2007; Hayashi and Naiki, 2009). A combinação de sinais físicos promovidos pelo arranjo de proteínas da lâmina basal é capaz de suportar as células endoteliais, assim como as células musculares lisas, que são os principais elementos do microambiente das células do endotélio vascular (Chan and Inoue, 1994). Dessa forma o desafio da engenharia de tecidos vascular é desenvolver um material que substitua a lâmina basal assumindo suas propriedades tanto físicas quanto químicas.

Neste caso, o desafio deste estudo é comprovar que a macroestrutura de CB com canais internos é capaz de substituir a lâmina basal e sustentar a diversidade celular que compõe o tecido vascular. Topograficamente a lâmina basal endotelial é composta de arranjos característicos de escala nano (1-100 nm) e submicron (100-1000 nm) como uma malha (Liliensiek *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010). Substitutos vasculares para regeneração tecidual têm sido desenvolvidos, mas algumas características biofísicas relevantes, incluindo a microestrutura e a elasticidade vascular dos vasos nativos, não têm sido completamente incorporadas dentro do projeto de novas microestruturas 3D e sua ausência talvez seja um fator contribuinte para o fracasso de pesquisas em substitutos vasculares (L'heureux *et al.*, 2006). A lâmina basal é topograficamente constituída de poros, fibras e saliências arranjadas em uma estrutura única (Abrams *et al.*, 2000; Abrams *et al.*, 2003; Liliensiek *et al.*, 2009). Além disso, a espessura da lâmina basal de diferentes tecidos vasculares pode variar significativamente. Esta observação sugere que as variações na espessura têm um impacto em outras características físicas (Ebenstein and Pruitt, 2004; Oie *et al.*, 2009). O efeito da elasticidade no comportamento endotelial tem sido observado em angiogênese vascular assim como na migração, adesão, proliferação e diferenciação de células endoteliais (Ausprunk and Folkman, 1977; Deroanne *et al.*, 2001; Ingber, 2002; Engler *et al.*, 2004). Wood e colaboradores comprovaram que as características biofísicas de um biomaterial afetam as células endoteliais ao nível molecular; mais precisamente 4.000 genes em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foram identificados com alterações na expressão (alta ou baixa regulação)

quando cultivadas em superfícies 3D do que quando cultivadas em superfícies planas, 2D. Esses pesquisadores demonstram a necessidade de consideração das evidências biofísicas, tais como microestrutura e elasticidade, nos estudos futuros sobre substitutos vasculares, visto que existem outras pesquisas que comprovam que a estrutura possui um impacto crítico no comportamento das células do endotélio vascular (Methe *et al.*, 2008; Zani and Edelman, 2010).

Um dos maiores desafios da engenharia de tecidos é estabelecer uma excelente fonte de células para aplicações nas pesquisas. Células autólogas têm sido evitadas, pois após a biopsia somente uma pequena quantidade de células podem ser obtidas em um tempo considerável. Prolongados períodos de cultura *in vitro* podem afetar o fenótipo das células. Assim, o tempo de cultura necessário para obtenção de uma quantidade satisfatória de células e o estímulo celular talvez sejam parâmetros mais importantes do que a fonte (Campbell and Campbell, 2007). Células endoteliais e células tronco humanas e de outras espécies tem sido investigadas como fonte potencial de células para estudos com biomateriais. Células endoteliais de veia umbilical humana (L'heureux, 1998), células de veia safena humana (Fink *et al.*, 2010; Fink *et al.*, 2011), células de aorta humana (Weinberg and Bell, 1986), células de aorta bovina (Niklason *et al.*, 1999), células de artéria pulmonar bovina (Jones, 1979), células endoteliais microvasculares (Tiwari *et al.*, 2003) e células tronco mesenquimais (Cho *et al.*, 2005) são comumente utilizadas na engenharia de tecidos atualmente. Enquanto vários estudos com HUVECs têm demonstrado a capacidade dessas células para formar estruturas capilares, sua rápida senescência *in vitro* limita sua utilização em terapias celulares. Para resolver este problema, esforços têm sido feitos com linhagens de células imortalizadas pela manipulação genética resultando em células que não perdem o padrão de comportamento endotelial (O'hare *et al.*, 2001). Extensivos esforços estão focados na investigação de limitações proliferativas, funcionalidade, e potencial regenerativo de células (Eggermann *et al.*, 2003; Droetto *et al.*, 2004; Nagano *et al.*, 2007). Muitos pesquisadores focam na investigação de qual o melhor tipo celular a ser utilizado na engenharia de tecidos vasculares, mas a indefinição permanece. Diversas observações indicam que biomateriais inoculados com células endoteliais (Gafni *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008) ou células endoteliais em combinação com outros tipos celulares como as células musculares lisas (Yim *et al.*, 2005) promovem o reparo do tecido vascular depois da implantação de arcabouços artificiais.

Recentes estudos têm demonstrado que as forças contrácteis geradas pelo citoesqueleto das células endoteliais em conjunção com matrizes rígidas e com sinalizadores bioquímicos regulam a vasculogênese (Kniazeva and Putnam, 2009). Desta forma, sinais biofísicos e bioquímicos remodelam o citoesqueleto das células endoteliais para formar fibras de actina (Satcher *et al.*, 1997; Ohashi *et al.*, 2002; Muthurangu *et al.*, 2005; Del Alamo *et al.*, 2008; Lu, L. *et al.*, 2008). Acredita-se que a combinação entre rigidez do biomaterial e organização do citoesqueleto celular seja o responsável pela manutenção da função celular. Assim, observa-se que as propriedades do citoesqueleto são essenciais para integridade dos vasos sanguíneos, sendo que um colapso no citoesqueleto pode levar ao colapso de um vaso sanguíneo (Bayless and Davis, 2004).

Até hoje, um biomaterial ótimo para ser usado como arcabouço vascular ou órgão vascularizado ainda não foi encontrado. As principais causas desse insucesso (esforços prévios) é multifacetada e incluiu recentemente a análise da microestrutura biomimética e a elasticidade do biomaterial, assim como a incorporação de fatores de crescimento específicos do endotélio, componentes da MEC e da lâmina basal (Ferreira *et al.*, 2007). Outro problema que permanece é que as células no centro dos arcabouços 3D ainda experimentam condições limitadas de oxigênio fornecido pelos principais vasos sanguíneos do tecido hospedeiro que permanecem viáveis ao fornecimento de sangue por um tempo limitado, (Lokmic *et al.*, 2007). O uso de matrizes sintéticas com atributos biofísicos que imitam o estado normal (homeomiméticos) e doente (patomiméticas) dos vasos poderia contribuir para o entendimento da biologia do endotélio vascular saudável e doente, que ainda hoje nos deixa com muitas incertezas.

Jaboulay e Briau fizeram o primeiro transplante arterial em 1896, mas a anastomose foi imperfeita resultando em trombose. Desde então, técnicas sofisticadas *bypass* são rotineiramente realizadas. Em 1952, Voorhees desenvolveu a primeira prótese vascular arterial denominada Vinyon N (nylon) (Voorhees, 1952) e poucos anos mais tarde, Debakey desenvolveu o Dracon[®] (Nose, 2008). Hoje em dia, o Dracon[®] e PTFE são ainda amplamente utilizados como substitutos arteriais. Weinberg e Bell foram os primeiros pesquisadores a desenvolver por completo (três camadas) o tecido vascular. Estes pesquisadores utilizaram uma cocultura de células endoteliais de aorta bovina, células musculares lisas e fibroblastos em uma matriz de colágeno animal, mas o tecido vascular formado era completamente instável (Weinberg and Bell, 1986). L'Heureuz também desenvolveu vasos sanguíneos *in vitro* através do

projeto de uma matriz estrutural que imitava o formato dos vasos sanguíneos (formato tubular) *in vivo*. Neste caso foi utilizada uma co-cultura de células endoteliais humanas, células musculares lisas e fibroblastos que recobriram a superfície do material e se auto-organizaram, resultando em um vaso resistente ao fluxo e à tensão (L'heureux, 1998). Diversos grupos de pesquisa tem investigado o desenvolvimento de vasos sanguíneos através do uso de estratégias de engenharia de tecidos. Niklason e colaboradores desenvolveram um biomaterial constituído de ácido poliglicólico (PGA) para o desenvolvimento de tecido vascular através de técnicas de co-cultura de células bovinas. Neste caso o vaso sanguíneo construído apresentou alta resistência à ruptura (maior que a das veias) e respondeu a contrações induzidas por medicamentos (Niklason *et al.*, 1999).

A engenharia de tecidos tem desenvolvido bioreatores de perfusão que asseguram a oxigenação e a distribuição de nutrientes de forma homogênea durante a cultura de células *in vitro* (Scherberich *et al.*, 2007). Entretanto o desenvolvimento de estratégias adicionais são necessárias para promover a vascularização e assegurar a sobrevivência de células no projeto de um espesso e complexo tecido engenheirado (Rouwkema *et al.*, 2008; Lovett *et al.*, 2009). Diversos estudos têm mostrado que a incorporação e liberação controlada de fatores angiogênicos para a construção de tecidos engenheirados pode aumentar a penetração de vasos sanguíneos após a implantação do biomaterial (Richardson *et al.*, 2001; Perets *et al.*, 2003). Os fatores angiogênicos frequentemente utilizados são o VEGF, FGF, PDGF, EGF entre outros (Richardson *et al.*, 2001; Perets *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2008), sendo que diversas estratégias para suprir estes agentes têm sido desenvolvidas a partir da adição de proteínas recombinantes, transferência gênica e super expressão de fatores angiogênicos (Lee *et al.*, 2000; Post *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2009). Como resultado das estratégias de liberação de fatores angiogênicos geralmente são formados vasos imaturos e instáveis (Jain *et al.*, 2005). Encontrar quais os componentes e qual a concentração correta de cada um para a indução de uma vascularização permanece por ser descoberta.

Nesta tese o comportamento das células endoteliais foi avaliado em função das características topográficas da película celulose bacteriana. Características de biocompatibilidade, como por exemplo: adesão, viabilidade, proliferação, migração e morte celular foram obtidas preliminarmente objetivando um estudo prévio do comportamento endotelial na celulose bacteriana. Finalmente um *scaffold* 3D de celulose bacteriana possuindo canais internos similares às paredes de um vaso

sanguíneo foram utilizados nos ensaios de endotelização e estes resultados serão apresentados nos próximos capítulos.

CAPÍTULO 3

Efeito da microestrutura da celulose bacteriana na adesão de células endoteliais

Neste capítulo a adesão de células endoteliais foi avaliada em função das características microestruturais das nanofibras de celulose bacteriana. O desenvolvimento e adaptação de técnicas de secagem da celulose bacteriana contendo células endoteliais serão apresentados como uma alternativa para avaliação das características morfológicas celulares em hidrogéis de celulose bacteriana por microscopia eletrônica de varredura.

3. Efeito da microestrutura da celulose bacteriana na adesão de células endoteliais em função

3.1. Introdução

Há aproximadamente 60 anos atrás, os pesquisadores Weiss e Graber (1952) estudaram a reação das células quando cultivadas em diferentes microestruturas e denominaram esta resposta biológica ao ambiente físico de “orientação de contato” (Weiss and Garber, 1952). Assim, o fenômeno “orientação de contato” começou a ser investigado por outros pesquisadores que estudaram especialmente a reação de algumas linhagens celulares cultivadas em diferentes superfícies lisas e ou rugosas (Clark *et al.*, 1987; 1990; 1991; Wojciak-Stothard, Curtis *et al.*, 1995; Wojciak-Stothard, Madeja *et al.*, 1995). Diferentes linhagens celulares têm sido estudadas quanto ao comportamento celular em função das diferenças topográficas de alguns *scaffolds* (Wojciak-Stothard, Curtis *et al.*, 1995; Dalby, Riehle *et al.*, 2002; Dalby, Yarwood *et al.*, 2002; Dalby *et al.*, 2003). Dentro deste contexto as interações entre célula e matriz extracelular são aspectos que precisam ser entendidos e considerados no desenvolvimento de um biomaterial. A engenharia de tecidos é a maior área de pesquisa voltada ao desenvolvimento de materiais biomédicos e está focada no desenvolvimento de *scaffolds* com características específicas capazes de auxiliar o entendimento de respostas celulares em um contexto tridimensional (Langer, 2000a; Cukierman *et al.*, 2001). Células endoteliais são linhagens comumente utilizadas para avaliação da biocompatibilidade de materiais para o desenvolvimento de próteses vasculares (Sottiurai *et al.*, 1983). As células endoteliais agem como transdutores primários de forças hemodinâmicas do lúmen vascular, mantendo as funções fisiológicas ou então iniciando processos patológicos na parede dos vasos sanguíneos, sendo os principais sensores da rede vascular (Helmke, 2005). Wille e colaboradores (2004) semearam células endoteliais de aorta humana em membranas de silicone e submeteram o sistema a variações de compressão e estiramento, o que afetou a morfologia das células que se orientaram em função da direção da deformação (Wille *et al.*, 2004). Em resposta a estímulos mecânicos, as células endoteliais sofrem significantes alterações na organização do citoesqueleto e, conseqüentemente, na morfologia (Ngu *et al.*, 2010).

A interação de células endoteliais e biomateriais envolve uma das áreas mais importantes da engenharia de tecidos que atualmente não está

completamente elucidada (Rivron, 2010). Algumas das características biológicas mais importantes a serem exploradas estão relacionadas ao entendimento do comportamento das células endoteliais em relação às variações existentes na superfície de biopolímeros e a avaliação da estabilidade das células endoteliais cultivadas por períodos prolongados sobre a superfície dos *scaffolds*, (Gimbrone, 1987; Liliensiek *et al.*, 2006; Norman *et al.*, 2008; Liliensiek *et al.*, 2010; Tsang *et al.*, 2011). A interação de células em biomateriais é uma situação que envolve interações célula-célula e célula-biomaterial. Superfícies rugosas e porosas são rotineiramente usadas em aplicações clínicas que envolvem o desenvolvimento de próteses ortopédicas, dentárias e cardiovasculares, entre outras (Clark *et al.*, 1974; Haddad *et al.*, 1987; Chehroudi *et al.*, 1990; Singhvi *et al.*, 1994). Algumas pesquisas apontam que o material com uma superfície porosa promove uma melhor integração entre o tecido e o implante (Haddad *et al.*, 1987). Sinais topográficos definidos não somente permitem o estudo das interações célula-biomaterial, mas podem também controlar a orientação e morfologia celular, podendo auxiliar na descoberta de outros sinais envolvidos no controle de respostas celulares específicas, por exemplo, na viabilidade, proliferação, migração e morte celular.

A celulose bacteriana (CB) é um hidrogel que tem despertado interesse de muitos pesquisadores que buscam o desenvolvimento de produtos voltados para aplicações biomédicas (Fontana *et al.*, 1990; Backdahl *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2006; Backdahl *et al.*, 2008; Rambo *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2010; Fink *et al.*, 2010; Zaborowska *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; De Souza *et al.*, 2011; Fink *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2011; Petersen and Gatenholm, 2011; Recouvreux *et al.*, 2011; Zahedmanesh *et al.*, 2011; Pertile *et al.*, 2012). Em função de suas propriedades, a CB é um material promissor para ser utilizado como *scaffold* na cicatrização de ferimentos (Czaja *et al.*, 2006), na liberação de fármacos (Wan and Millon, 2005) e na substituição ou regeneração de tecidos e órgãos (Svensson *et al.*, 2005; Putra A, 2008).

Os hidrogéis de celulose bacteriana produzidos em condições de cultura estática pela *G. hansenii* formam membranas na interface gás-líquido (ar-meio de cultura) caracterizadas por superfícies distintas em cada fase. Na fase gasosa (ar) a superfície (superior) apresenta maior densidade de nanofibras entrelaçadas com aparência pelicular lisa (SP-BCM) (também denominada na literatura de superfície densa); na interface com o líquido, a superfície (inferior) é topograficamente mais irregular, com densidade menor de fibras e aparência tecidual esponjosa (ST-BCM) (também denominada na literatura de superfície porosa). Em

função da relevância que as características de superfície de um biomaterial apresentam no desenvolvimento de um produto biomédico é extremamente importante entender como as distintas microestruturas da CB podem influenciar respostas celulares. Assim, neste estudo, o objetivo foi desenvolver e adaptar métodos experimentais que possibilitassem à caracterização da adesão e da morfologia de células endoteliais cultivadas em ambas as superfícies da membrana de CB.

Existem diversos protocolos disponíveis na literatura que visam a preparação de amostras biológicas hidratadas para observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o objetivo principal de serem estruturalmente e morfologicamente caracterizadas (Braet *et al.*, 1997; Echlin, 2009). Pesquisas têm sido realizadas para otimização dos métodos utilizados para a caracterização da microestrutura de biomateriais em função da morfologia celular. O maior desafio neste caso está relacionado ao fato de que o modo de preparo das amostras é diretamente dependente do tipo de biomaterial. Assim, não existem protocolos padrões previamente definidos. Os métodos atualmente mais utilizados para a preparação de amostras biológicas para a MEV incluem a liofilização (Echlin, 2009), ponto crítico de CO₂ (Foliguet *et al.*, 1989; Forge *et al.*, 1992; Bray *et al.*, 1993; Braet *et al.*, 1997; Brody *et al.*, 2006; Echlin, 2009), e por fim a utilização de solventes orgânicos, como acetona e hexametildisilazane (HMDS) (Heegaard *et al.*, 1986; Braet *et al.*, 1997; Echlin, 2009). Sendo assim existe a necessidade de aprimoramento das técnicas experimentais que permitam uma caracterização realista de cada fenômeno, mesmo que muitos desafios permanecem desconhecidos no que diz respeito à interação célula-biomaterial.

Neste capítulo serão apresentados os resultados relacionados à aplicação de diferentes técnicas de desidratação da película de celulose bacteriana objetivando a melhor caracterização da adesão das células endoteliais sobre as diferentes microestruturas da película. As diferentes técnicas desenvolvidas neste capítulo objetivam a conservação da microestrutura particular da película de celulose bacteriana, assim como a conservação da morfologia celular endotelial quando cultivada em um microambiente específico.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1 Meio e condições de cultura bacteriana

O meio de cultura utilizado para cultivo da bactéria *G. hansenii* contém 25 g de manitol, 5 g de extrato de levedura e 3 g de peptona diluídos em 1 L de água destilada. Após o preparo do meio de cultura, o pH da solução foi ajustado para 6,6 e então autoclavado por 20 min a 121 °C. A manipulação do meio de cultura e do inóculo foi realizada em câmara de fluxo laminar para manutenção da esterilidade.

3.2.2 Produção de celulose bacteriana

A bactéria *G. hansenii* ATCC 23769 foi utilizada para produção de CB. O inóculo foi preparado em frascos cônicos tipo Erlenmeyer (125 mL) que foram mantidos à temperatura ambiente por no mínimo 20 dias para que pudessem ser utilizados na preparação da membrana de CB. As membranas de CB foram produzidas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Switzerland) sendo que em cada poço foram adicionados 450 µL de meio de cultura e 50 µL de inóculo (Figura 1).



Figura 1 – Inóculo produzido em frascos cônicos de 125 mL; meio de cultura bacteriana composto de manitol, extrato de levedura e peptona, após autoclavagem; e placa de cultura de 24 poços onde foram preparadas as membranas de celulose bacteriana.

As placas de cultura de 24 poços foram mantidas em cultura estática a temperatura ambiente por três dias. Após o terceiro dia as películas de CB cresceram na interface líquido/ar de cada poço de cultura e foram então removidas para início do processo de purificação.

3.2.3. Purificação das membranas de celulose bacteriana

Após três dias de cultura bacteriana houve a formação de membranas de CB na interface líquido/ar de cada poço de cultura (ver Figura 2). Estas membranas foram removidas dos poços de cultura e transferidas para um frasco (Becker) que continha uma solução de NaOH 0,1M. As membranas foram mantidas em NaOH por 24 h a 50 °C para remoção de bactérias e/ou resíduos que poderiam estar retidos nas redes de nanofibras da celulose bacteriana. Logo após as membranas foram lavadas com água destilada três vezes, sendo que na última troca de água o pH foi ajustado para 7 e as membranas de celulose bacteriana foram autoclavadas por 20 min a 121 °C e mantidas refrigeradas até utilização.

3.2.4. Caracterização da celulose bacteriana

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

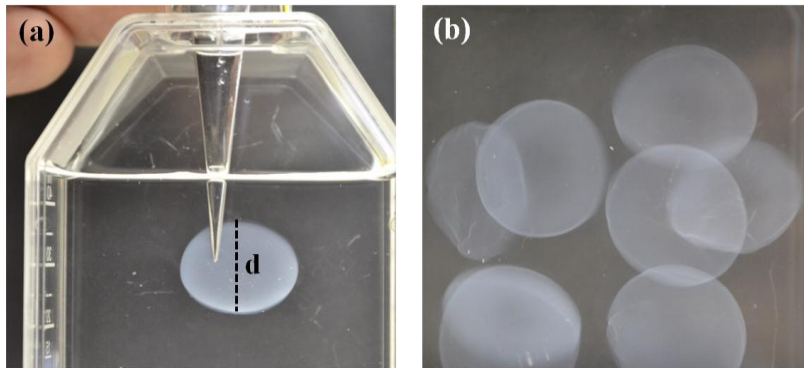


Figura 2 – Membranas de celulose bacteriana produzidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio base manitol após purificação. (a) detalhes da membrana de celulose bacteriana utilizada nos ensaios experimentais que possuem diâmetro (d) de aproximadamente 1,54 cm. (b) mostra membranas CB autoclavadas e armazenadas sob refrigeração para posterior utilização.

3.2.5. Cultura de células endoteliais

Uma linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foi gentilmente doada pela Prof^ª Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau do laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais - FARMACO-UFSC.

As HUVECs foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco[®], Invitrogen) suplementado com $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma- Aldrich), $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose (Sigma- Aldrich) e 100 mL de solução tampão HEPES 1M (Gibco[®]-Invitrogen). O pH da solução foi ajustado entre 7,2 e 7,3 e o meio foi transferido para a câmara de fluxo onde foram adicionados 100 mL de penicilina/streptomicina 100 U/100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gibco[®]-Invitrogen) e 100 mL de L-glutamina 200 mM (Gibco[®]-Invitrogen). O meio de cultura foi filtrado em suporte de filtração a vácuo utilizando uma membrana GS em éster de celulose com $0,22 \mu\text{m}$ de poro e 47 mm de diâmetro (Sterifil[®], Millipore). Após filtração o meio de cultura foi mantido por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho maria, este procedimento é feito para observar se ocorre a formação de precipitado na solução pois este fator indica presença de contaminação. Na ausência de sinais de contaminação, o meio de cultivo foi suplementado com 8% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]-Invitrogen). O meio de cultura completo foi utilizado dentro de 15 dias após a adição

do SFB. Durante todo o período experimental os meios de cultivo (com ou sem SFB) foram armazenados em geladeira.

As HUVECs foram repicadas quando atingida confluência de 85 a 95% de preenchimento das placas de cultura de tecidos (PCT). O repique iniciou com a remoção do meio de cultura seguido de três lavagens com solução PBS (Phosphate Buffered Saline) para remoção das proteínas do SFB da superfície das células. Logo após, foi adicionado 1 mL de solução de tripsina EDTA (Gibco®, Invitrogen). A PCT foi transferida para a estufa incubadora Ultrasafe HF 212UV durante 2 minutos para ativação da tripsina e descolamento das células aderidas na PCT. Na câmara de fluxo a tripsina e as células foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e centrifugadas por 2 minutos a 24°C e 1.200 rcf. A solução sobrenadante, a tripsina, foi removida e o precipitado, as células, foram homogeneizadas em meio de cultura e redistribuídas em novas PCT conforme o planejamento dos experimentos. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias de cultivo.

3.2.6. Ensaio de adesão das células endoteliais

Películas de CB previamente esterilizadas foram distribuídas em poços da placa de cultura (24 poços) em condições estéreis de cultura expondo ambas as superfícies a cultura celular; 500 µL de meio de cultura RPMI-1640 (incompleto ou sem SFB) foram adicionados sobre as membranas que permaneceram na incubadora (37 °C e 5% de CO₂) por 24 horas. Para que as membranas de CB permanecessem no fundo dos poços da placa de cultura, cilindros de vidro estéreis (com o mesmo diâmetro dos poços) foram utilizados para segurá-las e permaneceram na placa até o final de cada experimento. Após 24 horas o meio de cultura foi removido e foram semeadas 10⁵ células (HUVEC)/membrana de CB. As células foram mantidas em cultivo por sete dias e o meio foi renovado a cada dois dias de cultivo.

3.2.7. Caracterização de adesão celular por microscopia eletrônica de varredura

Para caracterização da adesão de células em biomateriais através da MEV as amostras precisam estar secas. Embora a liofilização seja uma importante técnica empregada para caracterização de biomateriais, não foram alcançados bons resultados na utilização desta técnica na desidratação das membranas de CB contendo células endoteliais, pois as amostras endureceram em função da presença do

agente fixador e as células se desprenderam da película de CB. Desta forma algumas técnicas de secagem foram adaptadas objetivando a valorização da microestrutura da CB e conservação e observação em paralelo da morfologia e integridade das células aderidas. O desenvolvimento ou adaptação de uma técnica experimental de secagem está diretamente relacionado ao tipo e as propriedades do biomaterial utilizado na pesquisa. Neste estudo foram utilizadas três técnicas de secagem para caracterização da adesão das HUVECs na membrana de CB.

3.2.7.1. Secagem com etanol

As amostras contendo membranas de CB cultivadas por sete dias com HUVECs, foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% (2 h, 4°C). Após fixação as amostras foram lavadas três vezes com PBS e pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio (OsO_4) em PBS. Após três lavagens com PBS as amostras foram desidratadas com uma série de soluções de etanol (20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% duas vezes) de quinze minutos cada. As amostras foram secas a temperatura ambiente por 24 horas.

3.2.7.2. Secagem com HMDS

Para secagem com hexametildisilazano [$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-NH-Si}(\text{CH}_3)_3$] (HMDS) o protocolo utilizado foi adaptado de um protocolo estabelecido na literatura (Braet *et al.*, 1997). Após sete dias de cultura as amostras foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% (2 h, 4°C). Após fixação as amostras foram lavadas três vezes com PBS e pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (OsO_4) em PBS. Após três lavagens com PBS as amostras foram desidratadas com séries de soluções de etanol (20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100% duas vezes), somente após a desidratação com etanol a 100% foi realizada a adição de soluções de hexametildisilazane (HMDS) 20%, 50%, 70% e 100% duas vezes de 30 minutos cada lavagem. As amostras foram removidas da solução HMDS 100% e distribuídas sobre papel filtro para evaporação do solvente. As amostras foram guardadas em dessecador de vidro para evitar a reabsorção de água.

3.2.7.3. Secagem por ponto crítico de CO₂

Após sete dias de cultura as amostras foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5%. Após fixação as amostras foram lavadas três vezes com PBS e pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄). Após três lavagens com PBS as amostras foram desidratadas com séries de soluções de etanol (20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%), de quinze minutos cada lavagem, em seguida as amostras foram distribuídas em redes de secagem da câmara de Balzer. As amostras foram submetidas a no mínimo três substituições de álcool por CO₂ líquido. O procedimento utilizado para secagem das amostras por ponto crítico de CO₂ foi adaptado de procedimento pré-estabelecido na literatura (Bray *et al.*, 1993).

3.2.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Todas as amostras secas através de etanol, HMDS ou ponto crítico de CO₂ foram distribuídas sobre fitas de carbono que estavam aderidas sobre os *stubs* e então recobertas com camada dupla de ouro. Após recobrimento as amostras foram analisadas por MEV no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM/EMC-UFSC) através da utilização do equipamento Philips XL30 ou no CEOSP (São Miguel do Oeste – SC) utilizando-se o equipamento JEOL 5910 e ou no Laboratório Central de Microscopia (LCME) utilizando-se o equipamento JEOL JSM – 6390LV.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização da membrana de celulose bacteriana

Membranas de CB foram sintetizadas com sucesso quando a bactéria *G. hansenii* foi cultivada em meio de cultura à base de manitol em condições estáticas de cultura, como mostrado na Figura 3 (a).

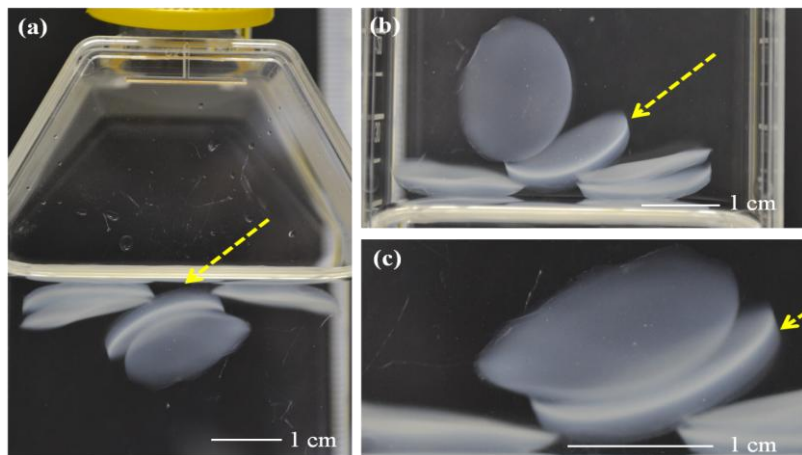


Figura 3 – Membranas de celulose bacteriana obtidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio de cultura manitol. (a) Membranas de celulose bacteriana após purificação com NaOH 0,1M. As membranas foram sintetizadas em placas de cultura de 24 poços e possuem 1,54 cm de diâmetro. As setas indicadas em (a), (b) e (c) destacam a estrutura 3D apresentada pelas membranas. (b) e (c) mostram ampliação de membrana de celulose bacteriana onde é possível observar diferenças de densidade das nanofibras de celulose bacteriana na parte superior da membrana (parte mais esbranquiçada), denominada superfície pelicular lisa (SP-BCM) e à parte inferior que é denominada superfície tecidual esponjosa (ST-BCM).

As membranas de CB foram sintetizadas em placas de cultura de 24 poços, desta forma apresentam diâmetro igual ao diâmetro interno dos poços de cultura. Os pesquisadores Borzani e Desouza (1995) comprovaram que em condições estáticas de cultura a CB forma uma membrana na interface líquido/ar. Esta membrana cresce em espessura para dentro do meio líquido sendo que em sua extensão a membrana ocupa toda a superfície do meio de cultura, resultando em uma membrana que geralmente apresenta o formato do frasco de cultivo (Borzani and Desouza, 1995). No presente trabalho todas as membranas de CB foram obtidas após três dias de cultivo bacteriano. Como destacado pela seta na Figura 3 (b) e (c), as membranas de CB apresentam a superfície superior mais esbranquiçada do que a superfície inferior. Bäckdahl e colaboradores (2006) mostraram que a membrana de CB produzida estaticamente pela bactéria *G. hansenii* possui duas superfícies distintas, uma superfície apresenta alta densidade de nanofibras de CB que se organizam umas próximas as outras de forma

emaranhada (superfície com alta densidade de nanofibras de CB ou superfície pelicular lisa) e a superfície oposta é caracterizada por uma rede de nanofibras de CB que se organizam de forma espaçada (superfície com baixa densidade de nanofibras de CB ou superfície tecidual esponjosa) (Backdahl *et al.*, 2006). Neste estudo as membranas de CB produzidas pela bactéria *G. hansenii* foram liofilizadas para caracterização de sua microestrutura por MEV. A Figura 4 (a) mostra a microestrutura da membrana de CB obtida através do corte transversal da amostra. A membrana de CB possui uma película superior estruturalmente diferente da matriz porosa que compõe quase toda a sua extensão interna, similar às características previamente observadas na literatura (Backdahl *et al.*, 2006).

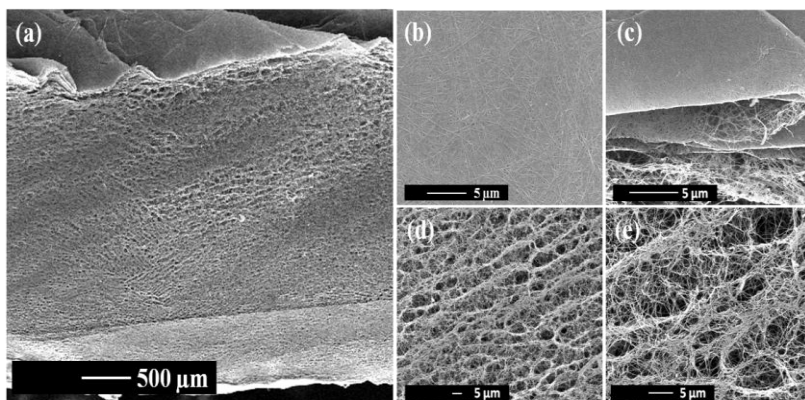


Figura 4 – Membranas de celulose bacteriana obtidas após três dias de cultivo estático da bactéria *G. hansenii* em meio de cultura manitol. (a) A membrana de celulose bacteriana é formada por uma película superior lisa (SP-BCM) e seguida de uma região tecidual esponjosa que se estende até a superfície oposta (inferior) (ST-BCM). (b) e (c) mostram detalhes da SP-BCM enquanto (d) e (e) mostram detalhes da ST-BCM.

A Figura 4 (b) e (c) mostra detalhes da superfície com alta densidade de nanofibras de celulose bacteriana também denominada como superfície pelicular lisa (SP-BCM). Esta superfície compreende a superfície voltada com a interface ar quando em cultivo bacteriano. A Figura 4 (d) e (e) mostra detalhes da superfície tecidual esponjosa (ST-BCM). A superfície tecidual esponjosa compreende a superfície voltada para a interface líquida ou submersa no meio de cultivo quando em cultivo bacteriano. Como observado na Figura 4, a membrana de CB produzida neste trabalho apresenta duas superfícies opostas e distintas.

A microestrutura ou topografia da superfície de um biomaterial pode influenciar significativamente o comportamento de células animais quando se analisa o desenvolvimento de um novo produto potencial para aplicações em engenharia de tecidos (Dalby, Riehle *et al.*, 2002; Dalby *et al.*, 2003; Dalby *et al.*, 2004). Características físicas topográficas de superfície foram avaliadas, como por exemplo, com células ósseas que foram cultivadas em diferentes superfícies de poliestireno e significativas alterações foram observadas. (Chesmel *et al.*, 1995). A microestrutura ou topografia de superfícies de biomateriais tem se mostrado um fator limitante para o comportamento celular interferindo fortemente na morfologia, na adesão e na mobilidade das células (Dalby *et al.*, 2004; Dalby, 2005). Os efeitos da microestrutura superficial da celulose bacteriana sobre o comportamento e funcionalidade de células endoteliais foram avaliados neste trabalho, sendo que neste capítulo será enfatizada a adesão celular em função da microestrutura.

3.3.2. Adesão de células endoteliais na celulose bacteriana

Com o objetivo de investigar a influência da superfície pelicular lisa (SP-BCM) e da superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) das membranas CB na adesão e morfologia de células endoteliais, HUVECs foram semeadas sobre ambas as superfícies da membrana. A MEV é uma valiosa ferramenta para a investigação de superfícies complexas de biomateriais microscópicos com amplitude 3D. A etapa crítica na utilização desta ferramenta compreende a preparação de amostras teciduais ou não teciduais nas quais a dissecação deve ser realizada sem qualquer distorção estrutural (Slizova *et al.*, 2003). A utilização da MEV para caracterização da morfologia das células cultivadas sobre um novo biomaterial vem sendo amplamente explorada atualmente (Lee and Chow, 2011). Ao desidratar as membranas de CB observou-se que a perda de líquido que ocorre quando a membrana é seca à temperatura ambiente ocasiona a perda da microestrutura, impossibilitando a avaliação da relação entre adesão/microestrutura seja avaliada. Isto se deve ao fato de que as membranas de CB são compostas de 98 a 99 % de água e apenas 1 a 2% de nanofibras. Quanto desidratadas e reidratadas às películas de CB reabsorvem ~70% do líquido. Desta forma, houve a necessidade do aprimoramento de técnicas de secagem que permitissem que o processo de desidratação das membranas CB mantivesse a microestrutura mais intacta possível, ou seja, que a perda da microestrutura fosse tão pequena que não causasse o colapso das

células possibilitando a caracterização de adesão celular dependente da microestrutura.

Neste estudo foram avaliadas e adaptadas três técnicas de secagem. Previamente todas as amostras foram fixadas com glutaraldeído e pós-fixadas com tetróxido de ósmio. Glutaraldeído é um fixador que reage com os grupos amino dos aminoácidos que constituem as proteínas das células, sendo muito utilizado, assim como o formaldeído, nas etapas de fixação de amostras biológicas (Lee and Chow, 2011). O tetróxido de ósmio é um agente utilizado na MEV para identificação e comprovação da presença de células pela capacidade deste agente de se ligar aos fosfolipídios da membrana plasmática facilitando assim a comprovação da integridade celular por EDS-MEV. Ambos, glutaraldeído e tetróxido de ósmio, foram manipulados com muito cuidado por serem produtos extremamente tóxicos.

As três técnicas empregadas para secagem das amostras foram: secagem por evaporação de etanol; secagem com a utilização do solvente orgânico HMDS e, por fim, secagem por ponto crítico de CO₂. A secagem à temperatura ambiente por evaporação de etanol é uma técnica de desidratação empregada para a maioria dos biomateriais, para caracterização da adesão celular, por se tratar de uma técnica rápida e barata. Etanol e acetona são fixadores coagulantes que fixam as amostras pela mudança rápida no estado de hidratação dos componentes celulares que são coagulados. O grande problema da utilização do etanol na secagem de amostras biológicas é que este solvente possui alto valor de pressão de vapor (43 mm Hg) quando comparado a outros agentes de secagem; desta forma, o etanol evapora rapidamente ocasionando deformação da amostra. O HMDS, outro agente de secagem, possui valor de pressão de vapor de 15 mm Hg, com evaporação três vezes mais lenta que a do etanol. A técnica de secagem por HMDS é geralmente utilizada em comparação com a técnica do ponto crítico de CO₂ (Slizova *et al.*, 2003). A Figura 5 mostra membranas de CB secas por evaporação de etanol, HMDS e ponto crítico de CO₂, respectivamente, após sete dias de cultivo com células endoteliais humanas (HUVECs). A Figura 5 (a) e (d) mostra características das superfícies tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB contendo HUVECs secas com etanol, sendo que nesta mesma ordem (b) e (e) mostram o resultado de membranas secas por HMDS e finalmente (c) e (f) mostram o resultado da secagem por ponto crítico de CO₂, respectivamente. Como observado na Figura 5 (a) e (d) a simples evaporação do etanol resultante das etapas de desidratação ocasionou o colapso das nanofibras de CB, e diferenças entre a estrutura

tecidual esponjosa *versus* pelicular lisa não puderam ser avaliadas. Neste caso ocorreu também a sobreposição ou empacotamento de células em função da perda da microestrutura 3D característica da membrana de CB.

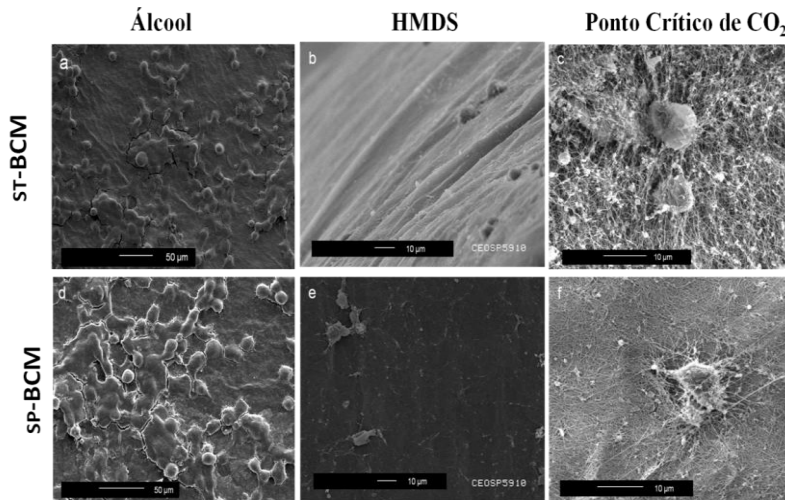


Figura 5 – Membrana de celulose bacteriana secas por três diferentes métodos de secagem após sete dias de cultura com HUVECs. (a) e (d) mostram a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e a superfície pelicular lisa (SP-BCM), respectivamente, da membrana de celulose bacteriana secas por evaporação de álcool; (b) e (e) mostram as superfícies de celulose bacteriana secas por HMDS, respectivamente, enquanto (c) e (f) mostram superfícies secas por ponto crítico de CO_2 .

Na secagem por HMDS, como mostra a Figura 5 (b) e (e), o colapso das membranas de CB foi menor do que quando utilizou-se o etanol, mas a utilização do HMDS ocasionou a remoção de células aderidas em ambas as superfícies da membrana de CB. O mecanismo de ação do HMDS ainda é desconhecido, mas as propriedades do material tais como tensão superficial e possíveis ligações cruzadas, são importantes fatores que devem ser levados em conta na utilização do HMDS (Slizova *et al.*, 2003). Além disso, alguns estudos comprovam que o HMDS pode romper as interações protéicas de amostras biológicas ao mesmo tempo em que reduz a tensão superficial e fornece resistência durante a secagem das amostras (Nation, 1983). Sabe-se que as proteínas têm uma importante relação na manutenção da morfologia e consequentemente, da adesão celular; então, neste estudo o HMDS não apresentou resultado satisfatório. Métodos clássicos de secagem como o

ponto crítico de CO₂ e a liofilização são desfavoráveis em alguns casos, em função do custo de operação e do tempo gasto no procedimento. Desta forma, em alguns casos de sucesso o solvente HMDS tem sido aplicado no processamento de inúmeras amostras para MEV. Estas amostras compreendem desde materiais botânicos (Thomasson and Thomasson, 2011), mucosas (Foliguet *et al.*, 1989; Kolb *et al.*, 1997), órgãos sensoriais (Heegaard *et al.*, 1986; Forge *et al.*, 1992), glândula tireóide (Weryha *et al.*, 1990) e vasos sanguíneos de pequeno calibre.

A Figura 5 (c) e (f) mostra a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB, respectivamente, seca em câmara de Balzer pelo método do ponto crítico de CO₂. O método de secagem por ponto crítico de CO₂ foi o único método testado que conservou tanto a microestrutura quanto a aderência das células endoteliais na membrana de CB. Na Figura 5 (c) e (f), é possível observar que as células aderidas na superfície tecidual esponjosa apresentam morfologia arredondada, enquanto as células aderidas na superfície pelicular lisa apresentam-se mais alongadas. Diferenças da microestrutura também puderam ser visualizadas quando comparadas ambas as superfícies da membrana de CB. O sucesso deste método de secagem só foi alcançado após sucessivas adaptações de métodos previamente descritos na literatura (Slizova *et al.*, 2003; Thomasson and Thomasson, 2011). Secagens utilizando ponto crítico de CO₂ têm sido utilizadas para caracterização de amostras biológicas, mas o longo período de processamento das amostras e o custo elevado dos materiais necessários tem despertado interesse pelo uso do HMDS (Jung *et al.*, 2010). Em alguns casos o ponto crítico de CO₂ e o HMDS não têm apresentado diferenças na qualidade de secagem das amostras para MEV (Braet *et al.*, 1997; Ubero-Pascal *et al.*, 2005), o que não aconteceu no caso das membranas de CB.

Na preparação de amostras para MEV, diferentes procedimentos de secagem para células e biomateriais podem ser selecionados baseados na disponibilidade de equipamentos e no tipo de material, mas relatos da literatura devem ser levados em consideração melhorando e aprimorando o desenvolvimento de novos métodos de secagem, cada qual apropriado para cada caso em particular. Existem diversos tipos de materiais e variações estruturais que podem significativamente ser afetados pela técnica empregada na preparação das amostras para MEV. No caso da CB, as adaptações realizadas no procedimento de secagem por ponto crítico de CO₂ foram satisfatórias, e caracterizaram de forma acurada as células e a microestrutura. A Figura 6 mostra detalhes das HUVECs aderidas nas superfícies da membrana

de CB. A Figura 6 (a), (b) e (c) mostra detalhes da morfologia e adesão das HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de CB, enquanto, a Figura 6 (d), (e) e (f) mostram detalhes das células na superfície pelicular lisa (SP-BCM). Nota-se que o método de secagem aplicado preservou características de microestrutura da CB assim como de morfologia dessas células.

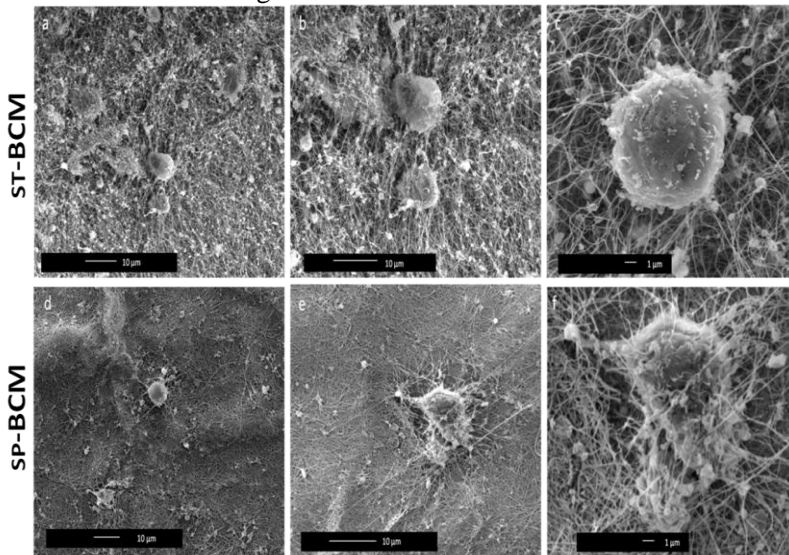


Figura 6 – Adesão e morfologia de células endoteliais (HUVECs) cultivadas na membrana de celulose bacteriana e secas através da técnica do ponto crítico de CO_2 . (a), (b) e (c) mostram detalhes de células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da celulose bacteriana. (d), (e) e (f) mostram detalhes de células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre a superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana. As células foram cultivadas por sete dias.

Em todas as imagens apresentadas na Figura 6 nota-se a presença de cristais precipitados. Estes precipitados poderiam ter sido evitados através da mudança de solução tampão utilizada na lavagem das amostras, porém acredita-se que eles não tenham interferido na adesão e morfologia celular. Soluções tampão foram utilizadas nas etapas de fixação, pós-fixação e secagem de amostras biológicas para proporcionar a manutenção de pH neutro e manter as células na sua forma normal. PBS é uma solução tampão fosfato salina não tóxica, comumente utilizada na cultura de células e foi utilizada na preparação das amostras apresentadas na Figura 5 e na Figura 6. A solução tampão

cacodilato de sódio é outra opção para o preparo de amostra para a MEV e apresenta a vantagem de assegurar a precipitação de cálcio e minimizar o crescimento de microrganismos contaminantes na armazenagem do material. Entretanto, o tampão cacodilato, além de caro, é tóxico e contém arsênio. A precipitação durante o processo de fixação é afetada pela concentração de íons e o tipo de solução tampão utilizada, (sugere-se, para futuros trabalhos testes com a solução tampão de cacodilato) no preparo das amostras de CB.

O impacto na obtenção de imagens de células aderidas em um biomaterial 3D poderá trazer enormes contribuições para o entendimento das complexas interações célula-biomaterial (Lee and Chow, 2011). A utilização do tetróxido de ósmio para caracterização de amostra por MEV torna-se útil na comprovação da presença de células ou outras espécies biológicas quando se utiliza a análise quantitativa por EDS. Observando a Figura 7, pode-se concluir que no preparo da secagem das amostras pelo método do ponto crítico de CO₂ a utilização do tetróxido de ósmio na etapa de pós-fixação foi efetivamente incorporada pelas HUVECs aderidas à membrana de CB.

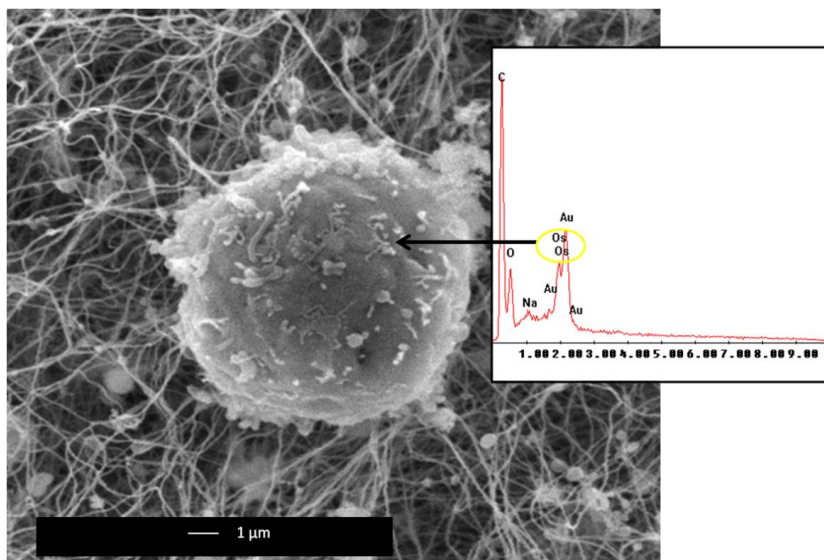


Figura 7 – HUVEC aderida à superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de celulose bacteriana. Análise quantitativa por EDS-MEV para comprovação da incorporação de ósmio nos lipídios da membrana plasmática.

Como citado anteriormente o sucesso na utilização da técnica do ponto crítico de CO_2 se deve a adaptações experimentais, através principalmente da garantia de que a substituição do etanol por CO_2 supercrítico tenha realmente ocorrido. No caso da membrana de CB a garantia de que a substituição progressiva do etanol por CO_2 líquido na câmara de Balzer só foi alcançada após três etapas de substituição, sendo que a primeira troca durou aproximadamente 72 h e estas informações experimentais são geralmente negligenciadas na literatura. Quando apenas uma etapa de substituição de solvente foi realizada, a amostra apresentou trincas e rachaduras, como mostra a Figura 8. A Figura 8 (a) e (b) mostra detalhes da microestrutura da superfície da membrana de CB.

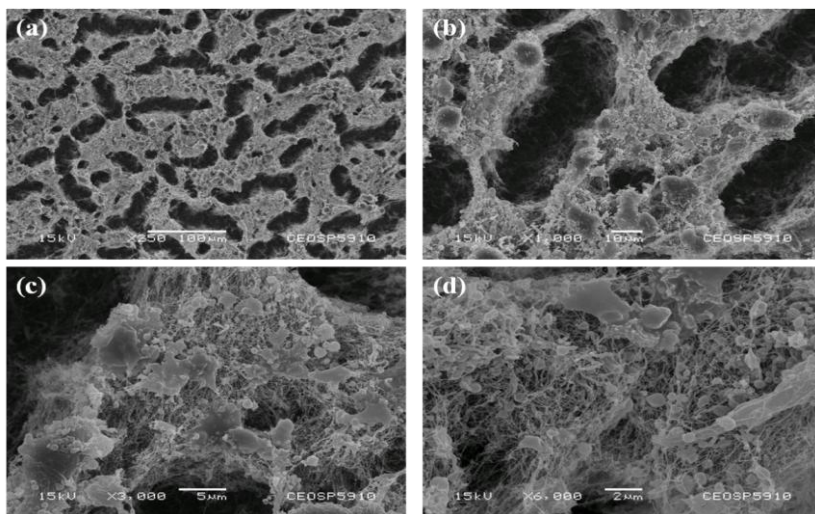


Figura 8 – Membranas de celulose bacteriana cultivadas com células endoteliais (HUVECs) por sete dias e secas através da técnica do ponto crítico de CO_2 com a realização de apenas uma troca de solventes (etanol/ CO_2 líquido) na câmara de Balzer. (a) e (b) mostram ampliações da microestrutura da membrana de celulose bacteriana, onde rachaduras podem ser visualizadas, resultantes da falha na substituição de solventes do método. (c) e (d) mostram ampliações das células aderidas à membrana de celulose bacteriana que também tiveram sua morfologia afetada em função da falha nas etapas de substituição dos solventes.

A falha na substituição progressiva de etanol por CO_2 líquido acabou ocasionando rachaduras na amostra. A morfologia das células aderidas também foi afetada pelo procedimento experimental, como mostrado na Figura 8 (c) e (d).

Outras sugestões de métodos de secagem, discutidas na literatura também devem ser levadas em consideração, principalmente em relação à utilização da liofilização para a secagem de amostras biológicas. Relatos recentes da literatura apontam para o fato de que as etapas de fixação e desidratação das amostras são extremamente necessárias para secagens através do ponto crítico de CO₂ e HMDS, mas devem ser evitadas quando se utiliza a técnica de secagem por liofilização (Lee *et al.*, 2012). A liofilização opera usualmente à temperatura na ordem de -80 °C e a secagem se deve à sublimação do gelo através da mudança brusca de temperatura. Na presença de etanol ocorre ebulição seguida de fusão do etanol e assim as amostras não serão efetivamente liofilizadas (Lee *et al.*, 2012). Quando a liofilização foi testada para caracterização das membranas de CB com HUVECs as amostras foram previamente fixadas com glutaraldeído e resultaram na obtenção de amostras rígidas e deformadas (Obs: sugere-se que em futuros trabalhos a liofilização sem a fixação e desidratação das membranas de CB seja testada).

3.4. Considerações finais

A caracterização da morfologia e adesão de células endoteliais (HUVECs) em função da microestrutura da membrana de CB foi alcançada através da adaptação da técnica de secagem por ponto crítico de CO₂. As HUVECs são capazes de aderir na membrana de CB e apresentam-se morfologicamente alongadas quando cultivadas na superfície pelicular lisada (SP-BCM) da membrana; já, quando cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM), as HUVECs estão morfologicamente arredondadas. Como a morfologia da célula afeta a função celular, estudos voltados para a caracterização célula-biomaterial devem ser aprimorados através do desenvolvimento de novas metodologias ou adaptação das técnicas atualmente utilizadas. No caso da membrana de CB, a técnica do ponto crítico de CO₂ mostrou-se uma excelente opção, mas a substituição da solução tampão PBS por cacodilato de sódio deverá ser empregada em futuros estudos, buscando-se evitar a formação de precipitados na amostra. A utilização da liofilização como técnica alternativa no preparo das membranas de CB com células para MEV também deverá ser averiguada, conforme sugerido anteriormente.

CAPÍTULO 4

Influência da microestrutura da celulose bacteriana no comportamento de células endoteliais

Neste capítulo serão discutidos os resultados relacionados ao comportamento das células endoteliais de veia umbilical humana quando cultivadas sobre as superfícies, tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM), da membrana de celulose bacteriana. Adesão, densidade, viabilidade, proliferação e migração em função do tempo de cultura celular foram os parâmetros avaliados.

4. Influência da microestrutura da celulose bacteriana no comportamento de células endoteliais

4.1. Introdução

Propriedades estruturais de biomateriais como, por exemplo, a porosidade ou microestrutura da superfície, podem alterar o comportamento celular e tecidual (Rehfeldt *et al.*, 2007), influenciando significativamente nos processo de proliferação celular (Ghosh *et al.*, 2007), auto-organização do citoesqueleto, morfogênese, mobilidade celular ou migração, expressão de genes e também nos mecanismos de morte celular (Huang and Ingber, 2000; Shyy and Chien, 2002; Ingber, 2003; Samarel, 2005). Estas respostas variam em função do tipo celular, da geometria e das características topográficas (Yim and Leong, 2005b). Assim, faz-se necessário o entendimento das interações entre células e biomateriais no desenvolvimento de novos materiais para cultura de células *in vitro* ou implantes *in vivo*. Microambientes 3D são desenvolvidos a partir de materiais poliméricos, cerâmicos, metálicos entre outros (Yim and Leong, 2005a). A celulose bacteriana, neste estudo, é particularmente o material de interesse. Desta forma, progredindo com o estudo do comportamento das células endoteliais na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB, neste capítulo outros relevantes parâmetros comportamentais serão avaliados, além da adesão celular que foi anteriormente discutida no capítulo 3.

Os primeiros relatos da literatura sobre células endoteliais semeadas em superfícies poliméricas datam de 1970 (Belden *et al.*, 1982; Schmidt *et al.*, 1985). Desde então, poucos protocolos para o desenvolvimento de linhagens de células endoteliais estáveis foram propostos (Laube *et al.*, 2000). As células endoteliais são responsáveis pela regulação de atividades biológicas relacionadas à vasculatura de tecidos e órgãos sendo as responsáveis pela ativação/agregação das plaquetas, a proliferação das células musculares lisas (Zhang *et al.*, 2006), o fluxo vascular (Luscher, Dohi *et al.*, 1991; Luscher, Richard *et al.*, 1991) e a manutenção da matriz extracelular. O endotélio recebe sinalização do lúmen vascular (sangue) e da lâmina basal. As células endoteliais exibem significantes alterações morfológicas e de orientação em resposta a estímulos mecânicos da lâmina basal (Ngu *et al.*, 2010). A lâmina basal é uma forma especializada da matriz extracelular (MEC) composta de colágeno tipo IV, laminina, perlecan, entactina, fibronectina e outros componentes (Rongish *et al.*, 1996; Hayden *et al.*,

2005). A microestrutura da lâmina basal juntamente com sinais bioquímicos regulam as funções celulares de migração, adesão, morfogênese, diferenciação e apoptose no desenvolvimento da vascularização (Zagris, 2001).

No entanto, a identificação de parâmetros cruciais tais como, contato célula-célula e célula-biomaterial vinculados a alterações de superfície de biomateriais devem ser compreendidos, pois podem controlar a orientação e morfologia das células, auxiliando na descoberta de outros sinais envolvidos no controle de específicas respostas celulares. Assim, a microestrutura poderá se tornar um regulador vital que modula a função celular (Tsang *et al.*, 2011). Alterações fenotípicas das células endoteliais podem resultar na perda da regulação da proliferação, adesão, migração, gene expressão e diferenciação celular (Madri and Williams, 1983; Ingber and Folkman, 1989).

Em resposta a forças mecânicas as células endoteliais exibem significantes alterações também na organização do citoesqueleto e consequentemente na morfologia. Em particular quando a célula endotelial espria as fibras de actina se rompem e se reorganizam permitindo a alongação da célula que se orienta no sentido da deformação. Esta característica mostra que as resposta ao microambiente são altamente dependentes dos filamentos de actina (Wang *et al.*, 2000). Nas células endoteliais o mecanismo chave que envolve adesão focal e sua influência nos filamentos de actina ainda não estão completamente compreendidos. A mobilidade ou migração de células fibroblásticas, por exemplo, diminui com o aumento da adesão focal (Ilic *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001) e existem relatos na literatura que ressaltam que o aumento na adesão focal também diminui o espriamento e a migração em outras linhagens de células (Hagel *et al.*, 2002), além das endoteliais. A morfologia das células endoteliais parece ser crucial na determinação entre a vida e a morte celular e também entre a proliferação e a quiescência.

Apoptose e necrose são duas formas de morte celular que têm sido distinguidas através de critérios morfológicos. Entretanto, estes diferentes tipos de morte celular talvez estejam envolvidos em diversos mecanismos de sinalização e execução em comum. Recentes evidências sugerem que idênticos receptores podem estar envolvidos na morte celular por apoptose e necrose simultaneamente (Jurisic and Bumbasirevic, 2008). A descrição inicial de apoptose (Kerr *et al.*, 1972) considerava que a eliminação das células apoptóticas se dava pela degradação heterolítica seguida de fagocitose pelas células fagocitárias. A exposição da fosfatidilserina ativa as células fagocitárias que

reconhecem o sinal (Krysko *et al.*, 2006; Erwig and Henson, 2008) e se ligam através de moléculas (Lauber *et al.*, 2003; Elliott *et al.*, 2009), na ausência deste reconhecimento de sinal entre as células fagocitárias e as células apoptóticas o processo se transforma em uma necrose autolítica também conhecida como necrose secundária (Wyllie *et al.*, 1980). Em estudos com células linfoblásticas animais, cultivadas *in vitro*, apoptose tem progredido para a necrose secundária. A partir disso, vem surgindo outra modalidade de culturas *in vitro* que envolve a presença de células fagocitárias, e que até o momento parecem não afetar a progressão da proliferação de células animais primárias (Bresgen *et al.*, 2008) e/ou imortalizadas (Wu *et al.*, 2001; Berghe *et al.*, 2010) e auxiliando na progressão da apoptose *in vitro*. Na necrose secundária as organelas citoplasmáticas incham, rompendo a membrana plasmática e desintegrando a célula que libera os componentes intracelulares (Kim *et al.*, 2003; Silva, 2008; Vinken *et al.*, 2009; Berghe *et al.*, 2010). Então, métodos corretos de identificação da necrose secundária são importantes e tem sido descritos na literatura (Silva, 2008; 2010), mas muito precisa ser descoberto sobre isto. Resumindo, a necrose secundária acontece na ausência de células fagocitárias do programa apoptótico, ocorrendo assim a desintegração eletrolítica da célula (Wyllie *et al.*, 1980). Apesar do grande número de estudos voltados para a caracterização dos mecanismos de morte celular, a necrose secundária é muito desprezada. Futuras pesquisas baseadas no entendimento da necrose secundária certamente revelarão se este modelo está envolvido em patogenias ou não, esclarecendo e possibilitando o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas (Silva, 2011).

É conhecido que alterações na superfície do biomaterial alteram o comportamento das células endoteliais (Hayden *et al.*, 2005; Candiello *et al.*, 2007), mas somente recentemente características topográficas de próteses vasculares têm sido avaliadas (Tsai *et al.*, 2007; Lu, J. *et al.*, 2008; Tajima *et al.*, 2008). Mesmo assim, o entendimento de como o biomaterial altera o comportamento das células ainda necessita ser melhor investigado. Embora muitos esforços tenham sido feitos na engenharia de tecidos, muitas limitações precisam ser superadas (Johnsen *et al.*, 2005; Atala *et al.*, 2006; Nevins, 2006), principalmente em relação ao projeto de tecidos espessos e complexos. O atraso no desenvolvimento de técnicas para caracterização desses tecidos complexos e espessos está relacionado à falta de métodos experimentais disponíveis para a avaliação, por exemplo, da distribuição e migração de células em um biomaterial (Thevenot *et al.*, 2008). Atualmente existe a necessidade do desenvolvimento de técnicas que permitam a

visualização e a avaliação do comportamento celular dentro de biomateriais e não somente na superfície como convencionalmente acontece. Algumas tentativas recentes têm citado o uso de tomografia micro-computadorizada de ressonância magnética (Thurner *et al.*, 2005; Heymer *et al.*, 2008), mas nenhum método rápido e economicamente viável foi desenvolvido. A capacidade de controlar o microambiente das células dentro de uma estrutura tridimensional talvez seja uma ferramenta poderosa no controle do crescimento tecidual *in vitro* (Norman *et al.*, 2008). Um estudo recente constatou que a elasticidade da MEC ou de um biomaterial influencia na diferenciação das células tronco mesenquimais, induzindo a sua diferenciação para células neuronal, osteoblástica ou mioblástica (Banerjee *et al.*, 2009). A possibilidade de controlar células através da investigação de fundamentos “físicos - biológicos”, no entanto, sem a incorporação de indutores químicos, poderá ser extremamente útil em estudos voltados ao desenvolvimento da engenharia de tecidos.

O objetivo deste capítulo foi investigar o comportamento das células endoteliais quando cultivadas sobre as distintas superfícies da película de celulose bacteriana. A viabilidade, proliferação, migração e morte celular das HUVECs foram analisados qualitativamente e quantitativamente quando cultivadas em ambas as superfícies que compõem a película de celulose bacteriana.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Produção, condições de cultura e purificação de celulose bacteriana

A produção das membranas de CB, o meio de cultura, as condições de cultura bacteriana, a purificação e a caracterização seguiram os mesmos procedimentos descrito nas seções 3.2.1- 4, respectivamente.

4.2.2. Cultura de células

A cultura e manutenção das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram realizadas conforme descrito nas seções, 3.2.5 e 3.2.6, respectivamente.

4.2.3. Contato direto para avaliação de adesão, densidade e morfologia celular

A caracterização do comportamento celular através de contato direto célula-CB, adesão celular nos momentos iniciais do contato célula-CB e densidade celular inoculada em função da microestrutura das superfícies da membrana de CB foram avaliadas por microscopia confocal. As HUVECs foram semeadas com variações de densidade celular (10^5 células/membrana e 10^6 células/membrana), tempo (0,5; 10 e 24 h) e microestrutura de superfície da CB (ST-BCM e SP-BCM). Para avaliação por microscopia confocal as células foram fixadas com formaldeído 3,7% em PBS e permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 em PBS. Para visualizar os filamentos de F-actina as células foram coradas com o corante Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (Molecular Probes Inc., Eugen, OR, USA). O núcleo das células foi corado com DAPI (sal dihidroclorídrico, 4',6-diamidino-2-fenilindol), (Molecular Probes Inc., Eugen, OR, EUA). As amostras foram montadas em lâminas com a utilização do meio de montagem Prolong[®] Gold (Molecular Probes Inc.), utilizado para manutenção da fluorescência das amostras. As amostras foram analisadas no microscópio confocal, Leica DMI6000 B (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Alemanha).

4.2.4. Viabilidade e proliferação celular

A viabilidade e a proliferação foram determinadas pela atividade mitocondrial das células através da utilização do ensaio colorimétrico do MTS[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]. HUVECs foram semeadas em ambas as superfícies da membrana de CB na densidade de 10^5 células/membrana, densidade pré-determinada após ensaio de microscopia confocal, descrito anteriormente. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas em função do tempo de cultura em tempos iguais a 0, 2, 3, 7, 10 e 20 dias de cultura. Na realização do ensaio do MTS, o meio de cultura foi removido, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e transferidas para uma nova placa de cultura. Então, 300 μ L de meio de cultura e 60 μ L do reagente MTS foram adicionados em cada poço da placa de cultura com as amostras. As placas de cultura foram incubadas por 1 h em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Logo após, a solução (meio de cultura/MTS) foi homogeneizada, e 100 μ L da solução de cada amostra foi transferido para uma nova placa de cultura de 96

poços, e a leitura da absorbância da solução a 490 nm foi analisada em leitor de microplacas. O grupo controle negativo foi realizado com o cultivo de HUVECs na placa de cultura. O grupo controle positivo foi realizado com películas de CB sem a inoculação de células para avaliar a retenção do MTS na película.

Paralelamente ao ensaio de MTS foi realizada também a análise qualitativa do ensaio Live/Dead[®]. O kit Live/Dead[®] Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) é utilizado somente com células de mamíferos e mede a atividade intracelular das esterases (calceína) e a integridade da membrana plasmática (homodímero de etídio). Uma solução calceína: homodímero de etídio (4:1) em PBS foi preparada e 100 µL desta solução foram adicionados sobre cada amostra. Logo após, a placa de cultura foi incubada por 45 minutos em incubadora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação as amostras foram montadas em lâminas e visualizadas no microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41 do Laboratório FluorBEG-UFSC.

4.2.5. Migração vertical

A migração vertical ou penetração das HUVECs na membrana de CB foi avaliada semeando-se 10⁵ células/membrana em ambas as superfícies da membrana de CB. Após sete dias de cultura das HUVECs na membrana de CB, as amostras foram cortadas transversalmente (para avaliar o interior da membrana) e avaliadas por MEV e microscopia de fluorescência. A técnica do ponto crítico de CO₂ foi utilizada para caracterização da migração vertical por MEV. O protocolo experimental utilizado foi o mesmo descrito na seção 3.2.7.3. Para a microscopia de fluorescência as amostras foram coradas com o kit Live/Dead[®] conforme protocolo descrito na seção anterior (4.2.4).

4.2.6. Morte Celular

HUVECs foram semeadas em ambas as superfícies da CB na densidade de 10⁵ células/membrana e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 3, 7 e 20 dias. Após cada tempo experimental o meio de cultura (sobrenadante) foi coletado e as amostras foram rapidamente tripsinizadas para remoção das células aderentes na membrana de CB. As frações coletadas de cada amostra foram combinadas e centrifugadas. O Kit Annexin-V-FITC (Immunostep SL, Espanha) foi utilizado para detecção dos processos de

morte celular relacionados ao cultivo das células endoteliais nas membranas de CB em função do tempo de cultura. As soluções referentes a cada amostra foram transferidas para tubos de citometria e 15 minutos antes da leitura, 2,5 μL de solução anexina foram adicionados em cada amostra. Após 10 minutos, 0,5 μL de iodeto de propídio também foi adicionado. O comportamento das células em função do tempo de cultura na membrana de CB foi analisado utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCanto II apparatus (Becton Dickinson) no laboratório LAMEB-BEG-UFSC. Foram coletados dados de 3.000 eventos para cada amostra. Os resultados experimentais foram processados utilizando-se o software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Ashland, OR) e as porcentagens de células necróticas e apoptóticas foram calculadas comparando-se as triplicatas de cada amostra. Camptotecina foi utilizada como controle positivo para células apoptóticas, e o congelamento a -20°C por 2 horas foi realizado para obtenção do controle positivo de necrose celular.

4.2.7. Análise Estatística da viabilidade e proliferação celular

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software Statistics 8.0 (StatSoft Software, Tulsa, OK). Os resultados experimentais foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados através da análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste de Tukey considerando-se estatisticamente diferentes para $p < 0.05$.

4.3. Resultados e Discussão

Membranas de CB foram sintetizadas e padronizadas em todos os experimentos, inclusive para os ensaios realizados no Capítulo 3 e 4. Neste Capítulo, a viabilidade, proliferação, migração e adesão das células endoteliais (HUVECs) foram avaliadas em função das variações de microestrutura da membrana de CB. Diferenças de microestrutura de biomateriais podem influenciar o comportamento celular (Chesmel *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Curtis and Wilkinson, 1997; Cukierman *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2004; Edelman and Keefer, 2005; Norman *et al.*, 2008) e no caso da CB, esses mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos. A superfície de contato entre célula-biomaterial, assim como a resposta celular no primeiro instante do contato célula-biomaterial podem determinar se uma célula irá tornar-se quiescente, proliferar ou morrer (Mcgrath, 2007).

Contato direto para avaliação de adesão, densidade e morfologia celular

HUVECs foram cultivadas em densidades variáveis (10^5 células/membrana e 10^6 células/membrana) em ambas as superfícies da membrana de CB para se estimar se a interação aconteceria em função do contato célula-célula ou célula-biomaterial. Microscopia confocal, combinada com a utilização de corantes fluorescentes para marcação de núcleo e F-actina (citoesqueleto) foram utilizados. A Figura 9 mostra imagens obtidas por microscopia confocal da membrana de CB com HUVECs cultivadas na densidade de 10^5 células/membrana. Pode-se observar que nos primeiros 30 minutos de cultura, HUVECs já estavam aderidas e apresentavam morfologia circular em ambas as superfícies da membrana de CB (Figura 9 (a), (b), (c) e (d)).

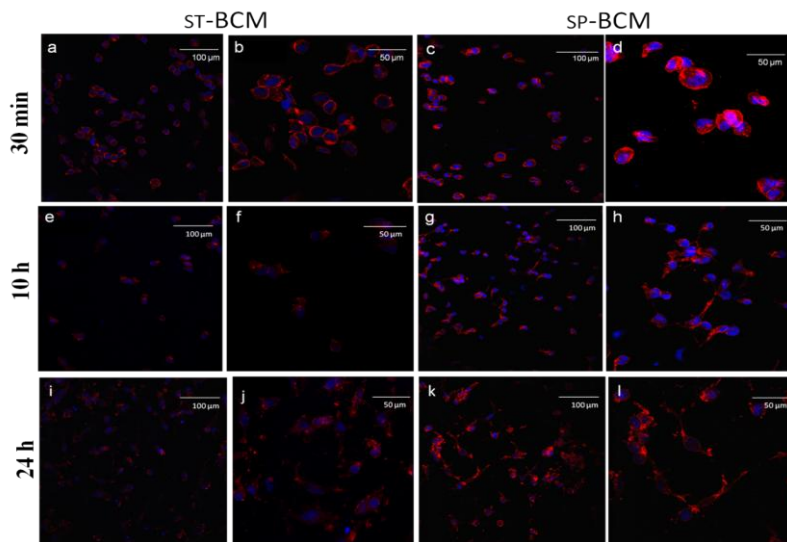


Figura 9 – Influência das distintas microestruturas de superfície da celulose bacteriana na morfologia das células endoteliais (HUVECs) semeadas na densidade de 10^5 células/membrana. (a), (b), (e), (f), (i), (j) mostram HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana; (c), (d), (g), (h), (k) e (l) mostram HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM). Os filamentos de F-actina do citoesqueleto foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).

A proliferação e o espraiamento das HUVECs foram visualizados após 10 h de cultivo das células na superfície pelicular lisada (SP-BCM) da membrana de CB, enquanto na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) as células permaneceram esféricas (Figura 9 (e), (f), (g) e (h)). Após 24 h de cultura as HUVECs apresentaram morfologia espraiada em ambas as superfícies da membrana de CB (Figura 9 (i), (j), (k) e (l)).

A Figura 10 mostra imagens obtidas por microscopia confocal de HUVECs cultivadas em uma densidade (10^6 células/membrana) maior do que apresentada anteriormente (Figura 9) e a evolução do espraiamento celular também foi observada. A Figura 10 (a), (b), (c) e (d) mostra detalhes das HUVECs cultivadas sobre as superfícies tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB após 30 minutos de cultura.

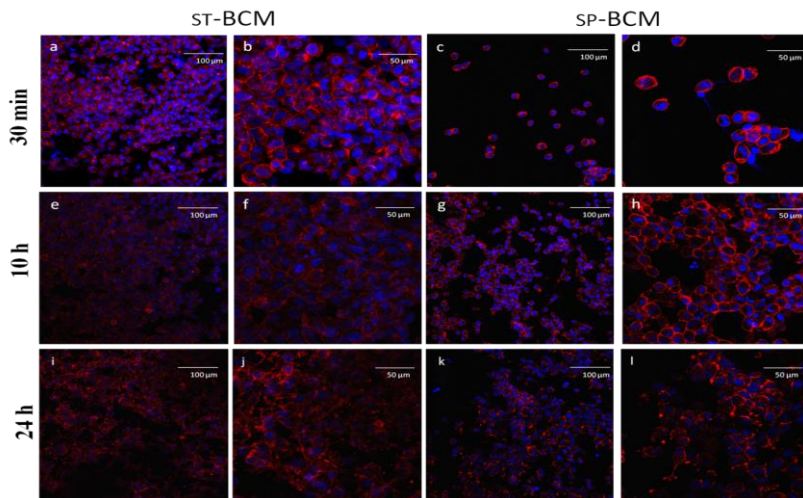


Figura 10 – Influência das distintas microestruturas de superfície da celulose bacteriana na morfologia das células endoteliais (HUVECs) semeadas na densidade de 10^6 células/membrana. (a), (b), (e), (f), (i), (j) mostram HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana; (c), (d), (g), (h), (k) e (l) mostram HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana. Os filamentos de F-actina do citoesqueleto foram coradas com Alexa Fluor 546 conjugado com faloidina (vermelho) e o núcleo foi corado com DAPI (azul).

Neste caso pode-se observar que as HUVECs aderiram em maior número na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do que na superfície pelicular lisa (SP-BCM) e em ambos os casos as HUVECs

apresentam-se com morfologia esférica. Ao contrário do que acontece quando uma densidade menor de HUVECs é semeada, as HUVECs espalharam mais rapidamente na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do que na superfície pelicular lisa da membrana de CB, mas somente após 24 horas de cultura, enquanto em densidade menor isto aconteceu após 10 horas de cultura e sobre a superfície pelicular lisa (SP-BCM) (Figura 10 (i), (j), (k) e (l)).

Após 10 horas de cultura as HUVECs permaneceram com morfologia esférica em ambas as superfícies da membrana de CB (Figura 10 (e), (f), (g) e (h)). Estas imagens indicam que quando altas densidades de células são semeadas, extensivos contatos intercelulares HUVEC-HUVEC acabam por encobrir a dependência da adesão celular à superfície do biomaterial, como pode ser observado neste caso para a CB. Em outro estudo, quando HUVECs foram cultivadas em superfícies de PLLA, foi observado que em altas densidades celulares semeadas sobre o biomaterial aumentam a aderência celular durante os primeiros momentos de contato célula-biomaterial, mas a interferência da microestrutura da superfície foi encoberta (Xia *et al.*, 2011). Desta forma, para se compreender o comportamento das HUVECs em função das características de superfície da membrana de CB altas densidades de celulares não devem ser utilizadas. A interação célula-biomaterial só pode ser avaliada em densidades menores do que 10^6 células/membrana. Somente desta forma o contato intensivo célula-célula poderá ser evitado, como também foi observado no caso do PLLA por Xia e colaboradores (2011).

Viabilidade de Proliferação

O ensaio colorimétrico do MTS e o kit de fluorescência Live/Dead[®] foram utilizados para avaliação quantitativa e qualitativa da viabilidade celular em função do tempo de cultura, respectivamente. A Figura 11 mostra os resultados obtidos através destes métodos experimentais, comparados em função do tempo de cultura com o objetivo de caracterizar a influência da microestrutura da membrana de CB no comportamento das HUVECs. Para o caso do ensaio com MTS, a atividade mitocondrial foi avaliada no tempo inicial ($t=0$) e após 2, 3, 7, 10 e 20 dias de cultura conforme mostra o gráfico da Figura 11 (a). O ensaio do MTS quantifica, através da medida de concentração, o formazan solúvel resultante de uma reação de redução do sal de tetrazólio (MTS) pelas mitocôndrias das células viáveis. A quantificação do produto formazan é realizada espectrofotometricamente (absorbância

a 490 nm) e é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura.

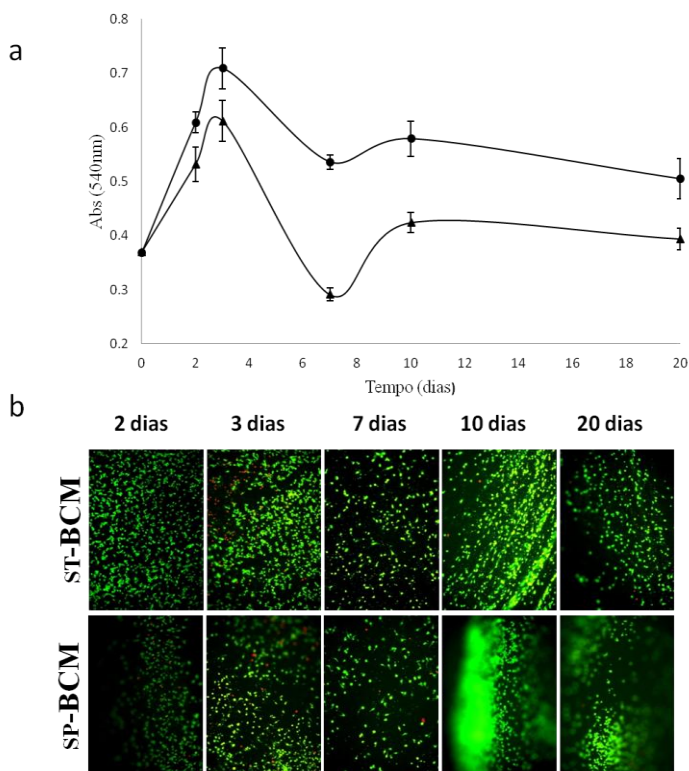


Figura 11 – Análise quantitativa e qualitativa da viabilidade de células endoteliais humanas (HUVECs) cultivadas sobre as superfícies tecidual esponjosa (●) (ST-BCM) e pelicular lisa (▲) (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana em função do tempo de cultura através da utilização das técnicas de (a) MTS e (b) Live/Dead[®], respectivamente.

A Figura 11 (a) apresenta o gráfico de absorvância em função do tempo de cultivo das HUVECs cultivadas em ambas as superfícies de CB. HUVECs cultivadas nas superfícies tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB apresentaram o mesmo perfil de comportamento celular, mas em todos os períodos experimentais a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) manteve maior quantidade de células viáveis. O perfil comportamental foi caracterizado por uma fase inicial de proliferação celular que durou aproximadamente

três dias de cultura. No período que compreende o terceiro e o sétimo dia de cultura houve uma fase de declínio do número de células, indicando assim, uma fase de indução de morte celular. Após o sétimo dia, as células voltaram a proliferar novamente até o décimo dia, onde parecem iniciar uma fase de quiescência celular que se estendeu até o vigésimo dia de cultura. Ambas a superfícies da CB mantiveram as HUVECs viáveis, mas a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) exibiu altos níveis de viabilidade celular quando comparada com a superfície pelicular lisa (SP-BCM) em todos os pontos experimentais. Diferenças significativas ($p < 0,005$) foram observadas entre a quantidade de células endoteliais viáveis presentes nas superfícies de CB no sétimo dia de cultura.

É interessante notar que quando células musculares lisas foram cultivadas em ambas as superfícies de CB, não foram observadas diferenças significativas em função do tempo de cultura (Backdahl *et al.*, 2006), mas é importante ressaltar que cada linhagem celular reage de diferentes formas ao microambiente. Estudos sugerem que alterações no microambiente influenciam substancialmente o comportamento das células endoteliais (Hayden *et al.*, 2005; Candiello *et al.*, 2007) e apenas recentemente propriedades topográficas foram incorporadas como um componente essencial para a engenharia de tecidos vasculares (Tsai *et al.*, 2007; Lu, J. *et al.*, 2008; Tajima *et al.*, 2008; Ummartyotin *et al.*, 2012).

Comparando-se o método quantitativo do MTS com o método qualitativo do Live/Dead[®] é possível observar que após três dias de cultura o número de células mortas (coradas em vermelho) presente nas amostras aumenta de forma significativa quando comparado a todos os outros tempos experimentais. O Live/Dead[®] é um método que tem sido utilizado por vários laboratórios para ensaios qualitativos e quantitativos de morte celular. As células vivas são distinguidas das células mortas através da calceína AM, que fica retida dentro das células vivas produzindo uma coloração verde fluorescente intensa e uniforme enquanto o homodímero de etídio penetra nas células com membrana plasmática danificada. A Figura 11 (a) e (b) mostra as relações entre os resultados obtidos pelos dois métodos experimentais utilizados e que foram comparados através da determinação das seguintes fases: fase I (0 – 2 dias de cultura), fase II (2 – 3 dias de cultura), fase III (3 – 7 dias de cultura), fase IV (7 – 10 dias de cultura) e finalmente, a fase V (10 – 20 dias de cultura). Como observado na comparação entre os dois métodos experimentais utilizados anteriormente, observa-se que após três dias de

cultivo as HUVECs iniciam um processo de morte celular, reduzindo o número de células viáveis. É interessante observar que quando células musculares lisas foram cultivadas sobre a membrana de CB a viabilidade celular também reduziu após três dias de cultivo (Backdahl *et al.*, 2006). Desta forma, propõe-se como hipótese, que a morte celular possa estar ocorrendo como um processo natural de organização do espaço celular ou simplesmente por processos de renovação. Como a degradação da CB é lenta ou quase inexistente no organismo humano, acredita-se que a indução da morte celular não tenha sido influenciada pela composição química da CB, mas sim das características superficiais da membrana. A identificação de qual processo de morte celular domina o período III da cultura de HUVECs na membrana de CB foi então estabelecida.

Células endoteliais respondem biologicamente a estímulos provenientes do microambiente onde se encontram. Assim, após a caracterização de adesão, viabilidade e proliferação das células endoteliais cultivadas na membrana de CB, ainda permanecem algumas dúvidas relacionadas ao que pode estar ocasionando morte celular no estágio III (Figura 11 (a) e (b)). Sabe-se que o declínio no número de células viáveis ocorre devido à morte celular, mas qual é o processo de morte celular que domina esta fase de interação célula-CB? Os mecanismos de morte celular podem ser definidos como uma perda irreversível da integridade da membrana plasmática. São três os tipos de morte celular para células animais, baseados em critérios morfológicos são definidos na literatura (Berghe *et al.*, 2010): apoptose, morte autofágica e necrose.

A apoptose é definida como alterações na morfologia da célula, as quais incluem a condensação e fragmentação da cromatina do núcleo, ocasionando mudanças na disposição das organelas no citoplasma. Por consequência ocorre contração e perda da integridade da membrana plasmática com a formação de corpos apoptóticos que contem material nuclear e/ou citoplasmático (Berghe *et al.*, 2010). A apoptose é um processo fisiológico normal, não patológico, onde os corpos apoptóticos são removidos do meio extracelular pelas células fagocitárias como, por exemplo, os macrófagos (Golstein and Kroemer, 2007). A morte celular pode acontecer também através de um acúmulo massivo de uma membrana dupla ou vacúolos autofágicos no citoplasma. Este fenômeno é conhecido como autofagia que na maioria das vezes, é visto como um processo apoptótico (Golstein and Kroemer, 2007).

Finalmente, a morte celular pode ocorrer por necrose, que é rotineiramente definida como uma maneira “negativa” de morte celular,

e engloba características fisiológicas de apoptose e morte autofágica (Silva, 2011). A necrose é frequentemente associada perda injustificada de células em patologias humanas (Jurisic and Bumbasirevic, 2008) e está associada a processos inflamatórios locais (Silva, 2011); é facilmente confundida com a necrose secundária. Wyllie e colaboradores (1980) descreveram que a necrose secundária é o processo que ocorre quando as células fagocitárias não operam na remoção dos corpos apoptóticos, o que resulta em uma fase de necrose autolítica (Wyllie *et al.*, 1980). Uma característica de ensaios *in vitro* é a presença de corpos apoptóticos, assim como fragmentos celulares resultantes de processos de renovação celular, que geralmente permanecem em cultura, resultando em fenômenos como o da necrose secundária. Um fato preocupante neste caso, segundo Bombeli e colaboradores (1999), é que as células endoteliais pré-apoptóticas tornam-se pró-adesivas até que a apoptose realmente ocorra (apoptose tardia) (Bombeli *et al.*, 1999). Neste contexto, é importante citar que estudos anteriores com próteses vasculares de pequeno calibre, feitos com CB, comprovaram que este material não induz hiperplasia e nem trombogenicidade nas células endoteliais implantadas (Esguerra *et al.*, 2009).

Morte Celular

Citometria de fluxo foi o método utilizado no presente trabalho para determinar qual era o mecanismo de morte celular que predominava no período III da curva de comportamento das células endoteliais cultivadas sobre ambas as superfícies da membrana de CB. A citometria de fluxo foi realizada pelo método da anexina V-FITC e iodeto de propídio para analisar quantitativamente a percentagem de células viáveis, necróticas ou apoptóticas em função do tempo de cultura. Para detectar os eventos de morte celular foi utilizada a anexina V conjugada ao tiocianato de fluoresceína (FITC), que se liga preferencialmente à fosfatidilserina, que é translocada para fora da membrana plasmática no momento da apoptose, e o iodeto de propídio (IP), por sua vez, identifica danos na membrana plasmática de células necróticas. Esta técnica possibilita simultaneamente a discriminação de células viáveis (anexina V-FITC-, IP-), células apoptóticas (anexina V-FITC+, IP-), apoptose tardia e/ou necrose (anexina V-FITC+, IP+) e células necróticas (anexina V-FITC-, IP+).

A Figura 12 mostra os citogramas dos ensaios com anexina V-FITC em função do IP, obtido através de dados experimentais de HUVECs cultivadas nas superfícies tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB em função do tempo de cultura.

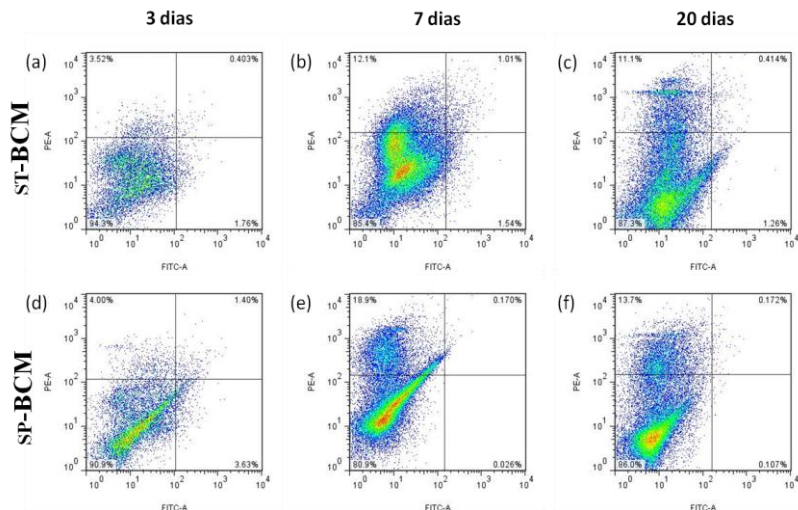


Figura 12 – Citogramas do comportamento das células endoteliais (HUVECs) cultivadas sobre a membrana de celulose bacteriana, obtidos por citometria de fluxo através da utilização de anexina V-FITC e iodeto de propídio. (a), (b) e (c) mostram os citogramas das HUVECs cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e (d), (e) e (f) mostram citogramas das HUVECs cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de celulose bacteriana após 3, 7 e 20 dias de cultura.

A análise quantitativa de morte celular foi realizada nas amostras após 3, 7 e 20 dias de cultura. A Figura 12 (a), (b) e (c) mostra os citogramas relacionados à cultura de HUVECs na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) enquanto a Figura 12 (d), (e) e (f) mostra os citogramas relacionados à cultura de HUVECs na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB. De acordo com os resultados de MTS e outras análises microscópicas previamente descritas, a viabilidade de células foi significativamente maior na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do que na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB. No caso da citometria de fluxo os resultados anteriores se confirmaram. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 12 como percentagem de viabilidade celular, sendo que as

percentagens médias \pm EPM foram calculados em função das triplicatas para cada amostra. Após três dias, de cultura a superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) apresentava $91,3 \pm 1,2\%$ de suas células viáveis, enquanto a superfície pelicular lisa (SP-BCM) nas mesmas condições continha $86,5 \pm 3,5\%$. Um declínio no número de células viáveis foi observado após sete dias de cultura quando HUVECs foram cultivadas em ambas as superfícies da CB, resultando em $8,8 \pm 1,5\%$ de células necróticas na superfície pelicular esponjosa (ST-BCM), enquanto na superfície tecidual lisa (SP-BCM) existia $18,0 \pm 0,2\%$ de células na mesma condição.

É importante observar que baixos índices de células apoptóticas foram encontrados nas amostras em todas as análises realizadas. Isto também aconteceu quando HUVECs foram cultivadas sobre uma solução de nanofibras de CB avaliadas em função do tempo de cultura por Jeong e colaboradores (2010) (Jeong *et al.*, 2010).

Após 20 dias de cultura, o número de HUVECs viáveis voltou a aumentar, alcançando $88,5 \pm 2,8\%$ na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e $84,2 \pm 1,6\%$ na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB. Neste trabalho, HUVECs foram cultivadas em PCT e analisadas como controle de viabilidade celular, sendo que neste caso também foi constatado processo de morte celular por necrose (dados não mostrados).

Analisando todos os resultados obtidos anteriormente é possível concluir que os mecanismos de morte celular talvez estejam envolvidos na modulação da viabilidade celular que ocorre durante o período experimental III, sendo que longos períodos de cultura também foram analisados (20 dias). Necrose secundária ocorre *in vitro* no final de todo o processo apoptótico, já que nessas condições as células fagocitárias estão ausentes (Wyllie *et al.*, 1980). Em função disso, necrose secundária pode ser detectada como necrose, experimentalmente, mas na verdade se trata de um processo apoptótico que atualmente é pouco considerado e estudado, principalmente em testes com biomateriais. Um estudo recente mostrou que a necrose secundária também ocorre *in vivo*, particularmente em animais multicelulares, sob algumas condições fisiológicas e patológicas onde células fagocitárias não estão disponíveis ou não respondem a determinado estímulo apoptótico (Silva, 2011). Em contraste, a abundância de publicações voltadas ao esclarecimento dos processos de morte celular e sua relação com as células fagocitárias, precisa ser melhor investigada em relação à necrose secundária, que continua sendo negligenciada. Através deste ensaio foi possível

constatar que a morte celular detectada talvez esteja relacionada à necrose secundária, já que células fagocitárias não foram incorporadas às condições de cultivo celular para remoção de corpos apoptóticos resultantes da renovação celular. A hipótese de que a necrose secundária talvez esteja influenciando e/ou encobrendo processos apoptóticos de HUVECs cultivadas na membrana de CB merece ser estudada mais profundamente através da utilização de outras técnicas experimentais que complementem as técnicas utilizadas anteriormente neste trabalho.

Migração celular

A maior quantidade de células presentes na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de CB durante todo o período experimental talvez esteja relacionada ao fato de que, nesta superfície, as células foram capazes de aderir sobre as nanofibras, estabelecendo pontos de adesão também no interior da membrana de CB. A migração vertical ou penetração das células para o interior da membrana de CB foi avaliada através das técnicas do ponto crítico de CO₂ e do Live/Dead[®], Figura 13.

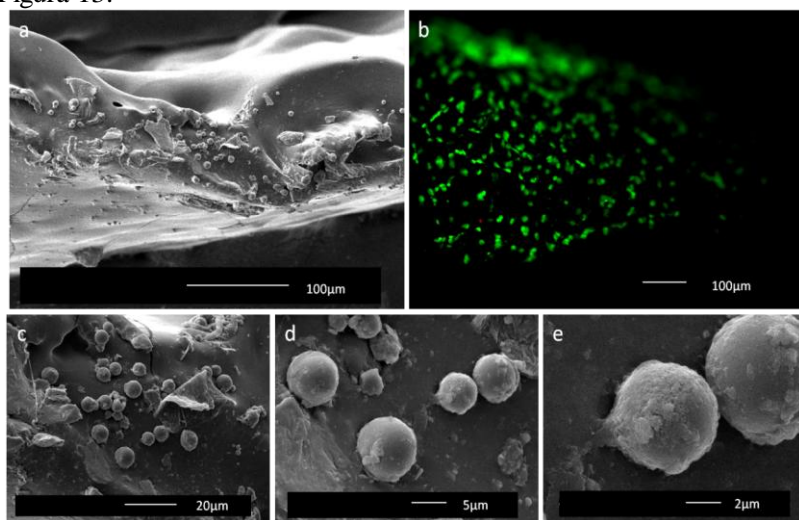


Figura 13 – Migração vertical de células endoteliais cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do hidrogel de celulose bacteriana após sete dias de cultura. (a) Corte transversal do hidrogel seco através da técnica do ponto crítico de CO₂. (c, d e) mostram ampliações das células endoteliais no interior do hidrogel de celulose bacteriana. (b) migração vertical das células endoteliais (verde) no interior do hidrogel de celulose através da técnica de Live/Dead[®].

A Figura 13 mostra os resultados obtidos através do corte transversal da membrana de CB, sendo que neste caso as HUVECs foram semeadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM). A Figura 13 (a) mostra um corte transversal da membrana de CB depois de seca, através da técnica do ponto crítico de CO₂ onde pode ser observado que as células endoteliais migram verticalmente em sete dias de cultivo. Migração vertical não aconteceu quando as células endoteliais foram semeadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB (dados não mostrados), pelo menos até o sétimo dia de cultura. A Figura 13 (c), (d) e (e) mostra detalhes do interior da membrana de CB onde existem células endoteliais aderidas. Estas apresentam-se com formato circular, morfologia característica de células endoteliais no primeiro estágio de adesão celular; ou ainda, podem estar associadas à conformação celular adotada em função dos pontos de adesão do microambiente poroso no interior da membrana. A Figura 13 (b) mostra que as HUVECs penetraram aproximadamente 600 µm para o interior da membrana de CB e permanecem viáveis em até sete dias de cultura. Quando as HUVECs foram cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) elas não foram capazes de penetrar/migrar na película de CB.

Este resultado foi obtido através de corte transversal da membrana de CB após as amostras serem tratadas com o kit Live/Dead[®]. Embasados no fato de que as HUVECs migram verticalmente para o interior da membrana de CB, talvez o maior número de células viáveis na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da CB esteja diretamente relacionado à porosidade, e conseqüentemente ao maior número de pontos de contato em função da maior área superficial.

4.4. Considerações Finais

Todos os ensaios mostrados e discutidos neste capítulo comprovam que as HUVECs respondem biologicamente ao espaço microambiente onde se encontram. Assim, sua morfologia, adesão, migração e proliferação podem ser moduladas em função da microestrutura da CB. Esta microestrutura será definida em função do tipo de aplicação a que o biomaterial se destina e ao comportamento celular necessário para o desenvolvimento de determinados produtos médicos ou plataformas de diagnóstico para a pesquisa clínica ou laboratorial.

A microestrutura das membranas de CB induz mudanças no comportamento das células endoteliais (HUVECs) em função do tempo de cultura. A superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de

CB foi capaz de manter maior número de células viáveis, ao longo do período experimental, do que a superfície pelicular lisa (SP-BCM), mas ambas as superfícies mantiveram a viabilidade das HUVECs. Na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) as HUVECs aderiram e migraram verticalmente para dentro da membrana de CB (~600 µm), e apresentaram morfologia circular, enquanto na superfície pelicular lisa (SP-BCM) as HUVECs estavam morfologicamente mais espalhadas e não migraram para o interior da membrana em até sete dias de cultura. Um declínio da viabilidade celular foi observado entre o terceiro e o sétimo dias de cultura em ambas as superfícies da CB, sendo mais acentuado na superfície pelicular lisa (SP-BCM). O mecanismo de morte celular detectado por citometria de fluxo nesta fase de cultura foi a necrose, mas acredita-se que neste caso a necrose secundária esteja encobrindo processos apoptóticos de renovação celular em função da ausência de células fagocitárias em culturas *in vitro*. Diferenças significativas ($p < 0,005$) de viabilidade celular foram observadas somente após sete dias de cultura. A densidade de células semeadas nas superfícies da membrana de CB influencia completamente a resposta biológica das células à microestrutura.

Assim, conclui-se que em ambas as superfícies da membrana de CB as HUVECs permaneceram aderentes, proliferativas e viáveis durante todo o período experimental, mas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) este tipo celular espalhou-se mais rapidamente. Um número maior de células viáveis foi observado na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM), mas isso talvez esteja relacionado à capacidade de migração das células para o interior da membrana quando cultivadas nesta superfície em função do aumento dos pontos de contato que pode estar relacionado a maior área superficial.

CAPÍTULO 5

Endotelização de macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas

O estudo das propriedades de microestrutura da celulose bacteriana (CB) e a sua influência no comportamento das células endoteliais teve como objetivo principal analisar a possibilidade de endotelização de uma macroestrutura de CB. Esta macroestrutura de CB foi previamente desenvolvida no InteLab e é caracterizada pela formação de um meta-vaso interno que poderia simular *in vitro* o mesmo microambiente que a lâmina basal exerce *in vivo*. Assim, neste capítulo serão apresentados resultados relacionados à endotelização da macroestrutura de CB meta-vascularizada.

5. Endotelização de macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas

5.1. Introdução

Embora tenham havido avanços significativos em engenharia de tecidos, muitas limitações precisam ainda ser superadas (Johnsen *et al.*, 2005; Atala *et al.*, 2006; Nevins, 2006), principalmente em relação ao projeto de tecidos espessos e complexos. O atraso no desenvolvimento de tecidos complexos e espessos está relacionado à falta de métodos experimentais disponíveis para a avaliação, por exemplo, da distribuição e migração de células em um biomaterial. As propriedades físicas dos biomateriais podem ter um profundo impacto na proliferação celular e no remodelamento de tecidos (Mooney and Mikos, 1999). Possivelmente, o mais notável substrato vascular desenvolvido até hoje foi consequência de um projeto de uma prótese vascular de pequeno calibre construído de PTFE e recoberto com fibrina, capaz de reter as células endoteliais em sua superfície. Esta prótese foi endotelizada *in vitro* com células endoteliais de veia safena humana e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), sendo que 65% destas próteses permaneceram endotelizadas em pacientes por 9 anos de avaliação (Meinhart *et al.*, 1997).

A capacidade de controlar o microambiente das células dentro de uma estrutura tridimensional talvez seja uma ferramenta poderosa no controle do crescimento tecidual *in vitro* (Norman *et al.*, 2008). Após a implantação de um biomaterial as respostas celulares que ocorrem na interface do material implantado e o microambiente que envolve as células são fatores importantes na determinação da biocompatibilidade de um implante.

Uma das mais importantes características das linhagens de células endoteliais provenientes de artérias, veias e/ou capilares é a formação de uma monocamada que envolve o lúmen dos vasos sanguíneos. Isto se dá através do controle de uma dinâmica tecidual que apresenta variações de sinais químicos e físicos constantes, que asseguram ou não a integridade ou organização do tecido, essencial para função a vascular normal. O endotélio é considerado como um tecido multifuncional ou “órgão” que interage ativamente com os componentes do sangue, assim como com outros tipos de células dentro da parede dos vasos (leucócitos, células musculares lisas, entre outras). O endotélio é metabolicamente ativo e responsável por importantes alterações fisiológicas e, portanto suscetível a danos teciduais (Gimbrone, 1987).

Desta forma não se pode desconsiderar o quanto é importante a interação do endotélio com as células do sangue e a lâmina basal (Marchant *et al.*, 1984). As interações das células endoteliais com plaquetas e leucócitos envolvem, além do contato célula-célula, a troca de mediadores químicos produzidos por ambas as células, e acabam influenciando o sistema vascular de maneira complexa. A penetração do endotélio a partir de uma artéria adjacente geralmente acontece por anastomose natural ao longo das células musculares lisas. No entanto, a penetração capilar pode ocorrer através dos poros de um biomaterial que apresente porosidade ideal para que estas células migrem e ramifiquem o endotélio (Ziats *et al.*, 1988).

Pesquisadores estão buscando soluções baseadas na adequação do microambiente físico para controlar respostas biológicas. Por exemplo, métodos têm sido desenvolvidos para a fabricação de partículas poliméricas com forma controlada (Rolland *et al.*, 2005), propriedades mecânicas específicas (Euliss *et al.*, 2006), superfícies com topografia controlada e compartimentalização (Rho *et al.*, 1993).

A microestrutura das plataformas de celulose bacteriana (CB) varia em função dos métodos de cultura bacteriana utilizados (Hestrin and Schramm, 1954; Dudman, 1959; 1960; Marx-Figini and Schulz, 1966; Marx-Figini, 1969). A CB pode ser então produzida em condições estáticas de cultura (como mostrado nos Capítulos 3 e 4) e em culturas agitadas (Capítulo 5). Em culturas agitadas ocorre um acúmulo acentuado de massa de CB (Hestrin and Schramm, 1954). As condições agitadas de produção da CB têm sido relatadas na literatura (Tonouchi *et al.*, 1997) e adaptadas para a obtenção de macroestruturas complexas. Recentemente foram desenvolvidos em nosso laboratório (Intelab-UFSC) macroestruturas de CB (Recouvreux *et al.*, 2011) contendo um canal interno similar à parede de vasos sanguíneos formados pela lâmina basal *in vivo*. O desenvolvimento desta nova macroestrutura despertou o interesse em estudos voltados à endotelização de tecidos e órgãos *in vitro*.

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos na endotelização dos canais internos a macroestruturas de CB.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Produção de macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas

A bactéria *G. hansenii* ATCC 23769, a mesma utilizada para produção das membranas de CB, foi utilizada para produção de macroestruturas de CB. O meio de cultura utilizado para cultivo bacteriano continha 25 g/L de manitol, 5 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de peptona. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,6 e posteriormente, o meio foi autoclavado (121 °C por 20 minutos). Os parâmetros utilizados para a produção das macroestruturas de CB e o protocolo experimental foram adaptados do método descrito por Recouvreux e colaboradores (Recouvreux *et al.*, 2011). Neste caso os inóculos foram preparados previamente em frascos cônicos de 125 mL e mantidos à temperatura ambiente. Para produção das macroestruturas de CB, frascos cônicos de 125 mL foram preparados com fio massiço de nylon (diâmetro: 1 mm) e, posteriormente, o conjunto foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Na câmara de fluxo, ao frasco autoclavado foram adicionados 54 mL de meio de cultura complementados com 6 mL de inóculo. O frasco foi montado em shaker rotatório (Nova Ética 430/RDBP, Brasil) operando na frequência de 2,5 Hz a 30 °C, por 10 dias de cultura bacteriana. Cada macroestrutura de CB cresceu envolvendo o fio de nylon e ao final de 10 dias de cultura apresentaram aproximadamente 3,5 cm de comprimento. As amostras obtidas foram denominadas de macroestruturas de CB meta-vascularizadas.

5.2.2. Purificação das macroestruturas de celulose bacteriana

As macroestruturas de CB foram tratadas com solução de NaOH 0,1M a 50 °C por 12 horas, sendo este procedimento repetido duas vezes. Após tratamento com solução de NaOH as macroestruturas foram lavadas com água destilada, o pH foi ajustado para 7,0, e as amostras foram autoclavadas (121 °C por 20 min).

5.2.3. Caracterização das macroestruturas de celulose bacteriana

A caracterização das macroestruturas de CB foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As macroestruturas de CB foram previamente congeladas e logo após, liofilizadas em liofilizador de bancada série LD (Terroni), no laboratório PROFI-EQA-UFSC. As

amostras secas foram armazenadas em dessecador para evitar a retenção de umidade. O preparo das amostras para a MEV foi realizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC). As macroestruturas liofilizadas foram cortadas cuidadosamente com lâminas de bisturi para observação da estrutura interna. As amostras foram fixadas sobre fitas de carbono, aderidas a suportes de alumínio (stubs) e posteriormente metalizadas com ouro.

5.2.4. Endotelização

A cultura e manutenção das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foram realizadas conforme descrito na seção 3.2.5.

As macroestruturas de CB hidratadas foram manipuladas assepticamente e posicionadas dentro de poços de placas de cultura (placa de 6 poços) contendo meio de cultura RPMI 1640 incompleto. As macroestruturas foram mantidas nesta condição por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Este procedimento inicial foi realizado para que houvesse a troca da água retida nas nanofibras da macroestrutura de CB pelo meio de cultura incompleto, evitando assim a diluição do meio de cultura completo (com SFB) no início da cultura. Após 24 horas o meio de cultura foi removido e foram semeadas 10⁶ células endoteliais dentro do vaso produzido na macroestrutura de CB. As amostras permaneceram por 1 hora na estufa de CO₂ a 37 °C e em seguida foi adicionado meio de cultura RPMI-1640 completo (8% de SFB) em quantidade suficiente para cobrir a amostra. O meio de cultura foi trocado a cada 48 h. As macroestruturas de CB permaneceram em cultura com as HUVECs por 30 dias para posterior avaliação da endotelização.

5.2.5. Inclusão em Histoiresina

Uma das técnicas utilizadas para análise histoquímica e morfológica da endotelização das macroestruturas de CB foi a inclusão em histoiresina. Após 30 dias, as macroestruturas de CB foram lavadas três vezes em solução PBS e logo após fixadas em solução de paraformaldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, *overnight* (Schmidt *et al.*, 2009, 2010). Após a fixação, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries sucessivas de etanol. Após a desidratação, as amostras foram infiltradas em histoiresina (Leica Histoiresin, Alemanha). As amostras inclusas foram identificadas e fatiadas em ultramicrótomo.

Secções com 5 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina (AT-O) e fotografada em microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, EUA).

5.2.6. Microscopia de fluorescência

Outra técnica utilizada na caracterização da endotelização das estruturas macroscópicas de CB foi a microscopia de fluorescência. Neste caso, as amostras, após 30 dias de cultura, foram lavadas três vezes com solução PBS e coradas com uma solução (4:1) calceína: homodímero de etídio, diluída em PBS (kit Live/Dead[®]). Após 45 minutos, as amostras foram removidas do corante Live/Dead[®] e dispostas em uma caixa de vidro adaptada para microscopia onde, com auxílio de tesoura cirúrgica e bisturi, a amostra foi seccionada transversalmente e o vaso da macroestrutura de CB foi exposto para visualização. As análises foram realizadas no Laboratório FluorBEG-UFSC com a utilização do microscópio de fluorescência Olympus modelo BX41.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Caracterização de macroestruturas de celulose bacteriana

Macroestruturas de CB foram obtidas após dez dias de cultura bacteriana agitada (2,5 Hz). A Figura 14 mostra o processo de obtenção das macroestruturas de CB. A Figura 14 (a) mostra o início da cultura bacteriana quando o frasco cônico foi adaptado ao *shaker* orbital contendo meio de cultura e a bactéria *G. hansenii*. A Figura 14 (b) mostra detalhes do hidrogel de CB crescendo em volta do fio de nylon (seta) submerso no meio de cultura após três dias de cultura bacteriana. A Figura 14 (d) e (e) mostra micrografias de MEV da formação da CB envolvendo o fio de nylon (setas) após cinco dias de cultura bacteriana. A Figura 14 (c) mostra a macroestrutura de CB obtida após dez dias de cultura bacteriana e previamente purificada e esterilizada. A Figura 14 (f) mostra detalhes do vaso interno formado dentro da macroestrutura de CB após cinco dias de cultivo seguida da remoção do fio de nylon.

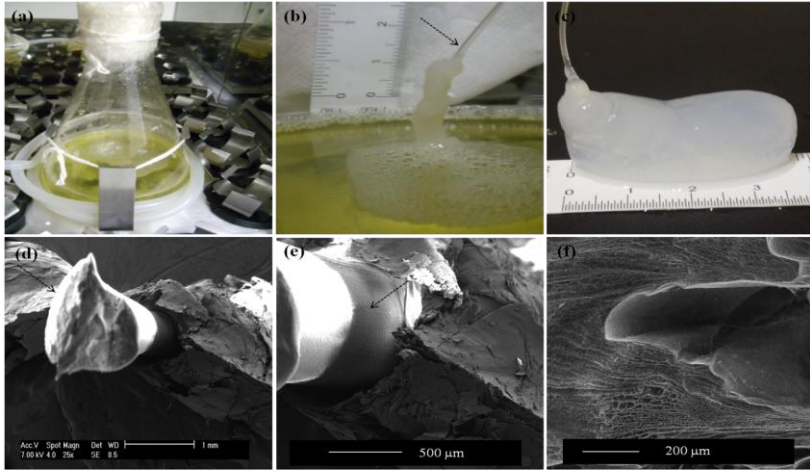


Figura 14 – Produção das macroestruturas de celulose bacteriana: (a) frascos cônicos contendo meio de cultura e a bactéria *G. hansenii* no início da cultura bacteriana, adaptados à plataforma shaker orbital, (b) celulose bacteriana se formando em volta do fio de nylon (seta) em cultura agitada após três dias de cultura bacteriana, (c) Macroestrutura de celulose bacteriana purificada e esterilizada após dez dias de cultura bacteriana (o fio de nylon se encontra no interior da macroestrutura), (d) e (e) mostram detalhes da celulose bacteriana se formando ao redor do fio de nylon (setas), após cinco dias de cultura bacteriana, (f) detalhe do vaso formado dentro da macroestrutura de celulose bacteriana após cinco dias de cultivo.

A caracterização da macroestrutura de CB foi realizada por MEV. A Figura 15 mostra micrografias da macroestrutura de CB após dez dias de cultivo bacteriano. A Figura 15 (a) e (d) relaciona as macroestruturas liofilizadas e hidratadas, respectivamente, evidenciando a entrada do canal interno formado pelo nylon. A Figura 15 (b) e (g) detalha a entrada do vaso interno da macroestrutura de CB evidenciando uma diferença de porosidade entre a superfície interna do vaso e a camada externa que o envolve. O interior do canal é caracterizado por uma superfície com alta densidade de nanofibras de CB, similar à estrutura presente na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB. A Figura 15 (e) mostra a estrutura que envolve o meta-vaso, composta de um arranjo poroso de nanofibras de CB, similar ao encontrado na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) da membrana de CB (Figura 15 (h) e (i)).

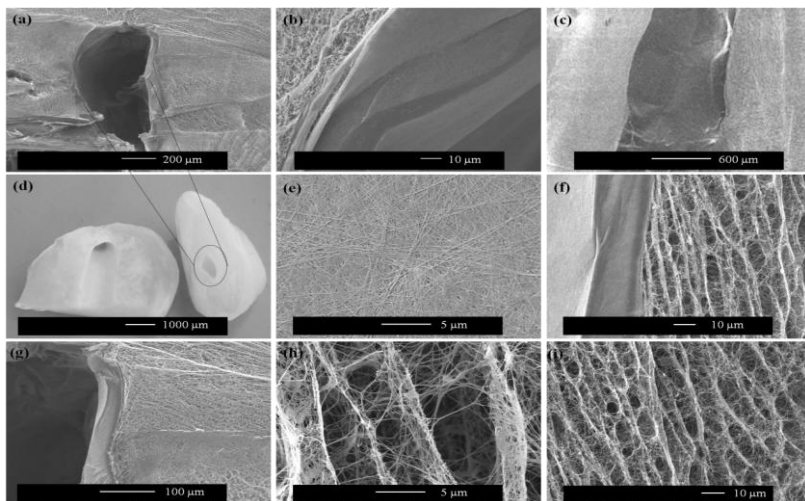


Figura 15 – Micrografias de cortes transversais e longitudinais da macroestrutura de celulose bacteriana meta-vascularizada: (a) detalhe do meta-vaso interno no interior da macroestrutura de celulose bacteriana liofilizada e seccionada transversalmente; (b) detalhe da entrada do canal mostrando o contraste de porosidade entre a região interior e exterior do vaso; (c) corte longitudinal da macroestrutura de celulose bacteriana; (d) Macroestruturas meta-vascularizadas de celulose bacteriana hidratadas; (e) detalhe da organização das nanofibras de celulose bacteriana no interior do canal, similar à estrutura pelicular lisa da membrana de celulose bacteriana; (f) interface entre o interior do vaso e o exterior obtido através de corte longitudinal da macroestrutura liofilizada; (g) detalhe da entrada no meta-vaso correspondente à amostra apresentada em (d); (h) e (i) detalhe da estrutura porosa que envolve o vaso interno da macroestrutura de celulose bacteriana.

A Figura 15 (c) mostra um corte longitudinal no centro do canal interno da macroestrutura de CB, e a Figura 15 (f) detalha a interface entre o canal interno e a rede porosa que o envolve. Sendo assim há evidências de que a macroestrutura de CB apresenta canais internos que simulam a parede de um vaso sanguíneo *in vivo*. Estas estruturas foram denominadas como macroestruturas de CB meta-vascularizados e poderiam ser utilizadas como uma plataforma complexa de teste para endotelização da celulose bacteriana. A compartimentalização ocasionada pela utilização do fio de nylon na cultura agitada da CB apresentou-se estruturalmente similar à estrutura do tecido vascular que permeia órgãos e tecidos. A comprovação de que a superfície interna do

vaso é envolvida por uma estrutura porosa em toda a sua extensão foi obtida por MEV-FEG, como mostra a Figura 16.

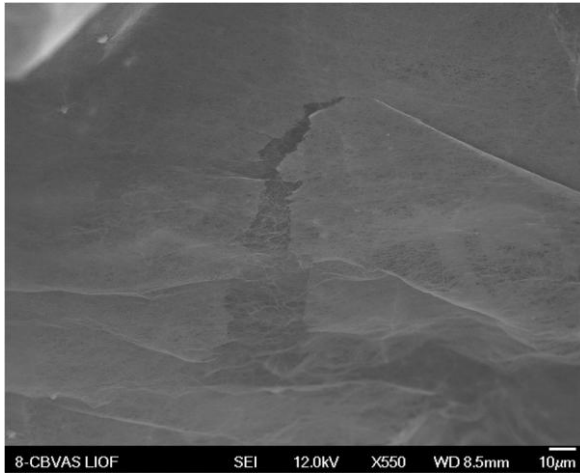


Figura 16 – Micrografia de MEV-FEG da ruptura da superfície do meta-vaso interno produzido na macroestrutura de celulose bacteriana. A imagem mostra que toda a estrutura pelicular lisa (SP-BCM) do vaso é envolta por uma rede porosa de nanofibras de celulose bacteriana.

Desta forma, a macroestrutura de CB despertou o interesse no desenvolvimento de uma plataforma de teste para vascularização de órgãos e/ou tecidos. A estrutura vascular se concretiza em função da camada pelicular lisa que envolve o vaso interno, similar à lâmina basal onde as células endoteliais aderem e formam uma monocamada estável em condições saudáveis. Pesquisadores têm demonstrado que as células endoteliais respondem ativamente à superfície de biomateriais; assim, a formação da monocamada endotelial é a parte crítica no desenvolvimento de vasos sanguíneos *in vitro* (Hess *et al.*, 2009).

5.3.2. Endotelização de meta-vasos em macroestruturas de celulose bacteriana

A endotelização das macroestruturas de CB foi avaliada após 30 dias de cultura das HUVECs semeadas no interior do vaso da macroestrutura de CB. Conforme apresentado no Capítulo 4, não foi constatada citotoxicidade do biomaterial (CB) nas células endoteliais (HUVECs) cultivadas na superfície pelicular lisa da membrana de CB,

que é extremamente similar, estruturalmente, à superfície do canal no corpo macroscópico da CB. Adesão e proliferação que ocorreram na membrana de CB aparentemente poderiam favorecer a formação de uma monocamada endotelial na superfície luminal do vaso. A Figura 17 mostra imagens das amostras obtidas através da técnica de inclusão por historesina, onde as amostras foram seccionadas transversalmente em fatias de 5 μm em micrótomo e coradas com azul de toluidina.

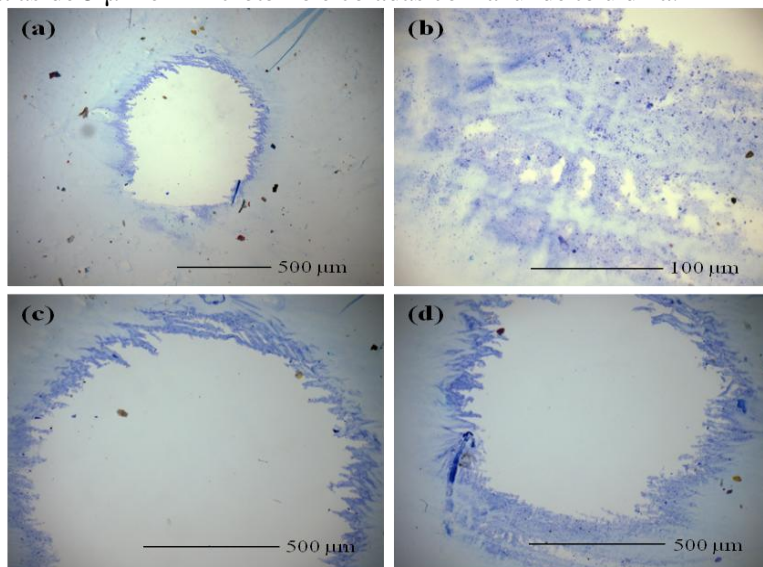


Figura 17 – Secções transversais da macroestrutura de celulose bacteriana cultivada por 30 dias com células endoteliais humanas (HUVECs) obtidas através da técnica de inclusão em historesina e coradas com azul de toluidina. (a), (c) e (d) detalhes do meta-vaso interno da macroestrutura de celulose bacteriana, sendo que as HUVECs recobriram toda a superfície interna do canal e (b) migração das HUVECs pelas paredes do meta-vaso.

O azul de toluidina é um corante utilizado para corar amostras seccionadas em espessuras entre 0,5 e 1 μm e reage com os ácidos nucléicos e proteínas, corando toda a estrutura celular (Kohl *et al.*, 1997). A Figura 17 (a), (c) e (d) mostra detalhes do canal interno da macroestrutura de CB meta-vascularizada, totalmente recoberta pelas células endoteliais humanas (HUVECs). A Figura 17 (b) mostra que em alguns pontos da superfície do canal as HUVECs migraram aproximadamente 300 μm para o interior da macroestrutura da CB. Detalhes morfológicos das HUVECs não puderam ser observados. Acredita-se que isto tenha ocorrido em função da espessura dos cortes

histológicos (5 μm), mais finos do que o tamanho da célula ($\sim 10 \mu\text{m}$); ou talvez a celulose bacteriana, por se tratar de um hidrogel, tenha interferido na obtenção de dados morfológicos mais acurados. A migração das HUVECs pela microestrutura fibrilar da parede do canal pode ser vista como uma ótima alternativa para a indução dirigida de angiogênese, mas isto precisa ser melhor investigado. Para confirmação da endotelização do vaso interno na macroestrutura de CB foi utilizada a técnica de microscopia de fluorescência através da coloração celular com o kit Live/Dead[®], onde as células viáveis são coradas em verde (calceína) e as células mortas em vermelho (homodímero de etídio). A Figura 18 mostra imagens de MEV e microscopia de fluorescência do vaso interno após 30 dias de cultivo com as células endoteliais (HUVECs).

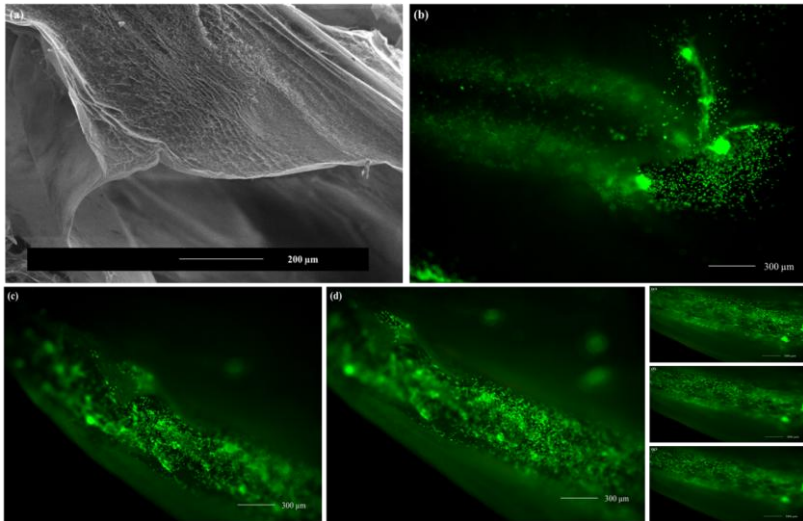


Figura 18 – Micrografia e imagens de MEV e microscopia de fluorescência da macroestrutura da celulose bacteriana. (a) mostra detalhe do canal interno à macroestrutura de celulose bacteriana após liofilização técnica que permitiu a remoção da estrutura porosa que envolvia este canal. (b) imagens da entrada do meta-vaso interno à macroestrutura de celulose bacteriana contendo células endoteliais revestindo a superfície interna, sendo que as células foram coradas com o kit Live/Dead[®]. As células viáveis estão coradas em verde (calceína) e as células mortas em vermelho (homodímero de etídio). (c), (d), (e), (f) e (g) mostram imagens de corte longitudinal do canal mostrado em (b) comprovando que as HUVECs endotelizam o canal interno à macroestrutura de celulose bacteriana em toda a sua extensão.

A Figura 18 (a) mostra detalhe do canal interno da macroestrutura de CB após liofilização, técnica que permitiu a remoção da estrutura porosa que envolvia este vaso. Esta imagem deve ser comparada à Figura 18 (b), onde em função do corante fluorescente somente a estrutura interna do meta-vaso que continha as HUVECs pode ser visualizada. Assim, a Figura 18 (b) confirma que as HUVECs revestiram a superfície do canal após 30 dias de cultura, concordando com os dados obtidos através da inclusão da amostra em historesina. Para confirmação da endotelização da superfície do vaso, este vaso foi cortado longitudinalmente com uma tesoura cirúrgica.

A Figura 18 (c), (d), (f), (g) e (h) mostra que as células endoteliais revestiram a parede do meta-vaso em toda a sua extensão. Sendo assim, conclui-se que as HUVECs endotelizaram a superfície do meta-vaso interno em macroestruturas de CB em toda a extensão, após 30 dias de cultivo. Por se tratar de uma macroestrutura com capacidade de retenção de líquido de aproximadamente 99%, é praticamente impossível seccionar a amostra sem utilização de técnicas como emblocagem ou inclusão. A técnica de emblocagem em parafina foi uma das técnicas testadas que falharam, pois nas etapas de processamento é utilizado o solvente xilol que dilui parcialmente a estrutura da celulose bacteriana. Assim, é difícil adaptar as amostras em um espaço compreendido entre uma lâmina e uma lamínula. Outros corantes fluorescentes e anticorpos foram testados, mas acabaram corando inespecificamente a celulose bacteriana. A coloração inespecífica aconteceu particularmente com a utilização do anticorpo monoclonal PECAM-1 (principal proteína de adesão das HUVECs), marcador de integrina $\alpha 5\beta 3$ e o kit EDU, que distingue células hemostáticas e células proliferativas.

5.4. Considerações finais

Macroestruturas de celulose bacteriana meta-vascularizadas foram produzidas em condições de cultura bacteriana agitada e apresentam em seu interior canais similares aos canais formados por vasos sanguíneos que permeiam órgãos e tecidos. Células endoteliais humanas (HUVECs) semeadas no interior destes canais endotelizaram a superfície do meta-vaso após 30 dias de cultura. A macroestrutura de celulose bacteriana mostrou ser uma plataforma promissora para o desenvolvimento de tecidos ou órgãos vascularizados, por permitir a

endotelização, que compreende uma das etapas mais críticas dos processos *in vitro*.

CAPÍTULO 6

Conclusões e sugestões

Neste capítulo serão apresentadas as conclusões finais da tese, assim como, algumas sugestões futuras para o andamento deste estudo.

6. Conclusões e sugestões

6.1. Conclusões

Os experimentos realizados nesta tese mostraram a aplicabilidade do conceito de endotelização de meta-vasos produzidos em macroestruturas de celulose bacteriana. A possibilidade de vascularização de estruturas *in vitro*, acrescidas da endotelização em macroestruturas de celulose bacteriana que mimetizam os canais de vasos sanguíneos *in vivo* é um passo importante na construção de substitutos de tecidos e órgãos. Para que o objetivo da endotelização fosse alcançado a avaliação do comportamento das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) foi testada em membranas de celulose bacteriana com superfícies de cultura distintas, superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM). Demonstrou-se que os processos de adesão, viabilidade, proliferação, migração e morte celular são influenciados pelas características de superfície da CB.

A adesão das células nas superfícies tecidual esponjosa (ST-BCM) e pelicular lisa (SP-BCM) da membrana de CB foi observada por MEV após adaptações de protocolos existentes na literatura e, somente através da técnica do ponto crítico de CO₂ a relação entre morfologia celular e as topografias da superfície (pelicular lisa ou tecidual esponjosa) pode ser observada. Verificou-se que as células endoteliais são morfologicamente arredondadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) e espalhadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da CB. É importante notar que a morfologia adquirida pelas células em função da topografia pode ser modulada pela densidade celular, ou seja, no caso das superfícies da CB a morfologia celular foi encoberta pelo intensivo contato célula-célula quando 10⁶ células foram semeadas sobre a superfície da membrana de CB.

A viabilidade e proliferação das células endoteliais também é modulada pelas diferenças estruturais da superfície da membrana de CB. Acentuada morte celular foi observada no intervalo de 3 a 7 dias de cultura quando células foram cultivadas na superfície pelicular lisa (SP-BCM) da membrana e menos expressivamente quando cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM). Ensaios de identificação de processos de morte celular foram realizados e foi então constatada a necrose como principal mecanismo de morte celular neste período experimental (3 a 7 dias). Sugere-se que estes processos apoptóticos não tenham sido efetivamente visualizados em função da ausência de células fagocitárias nesta cultura *in vitro*; assim, o processo de morte celular

pode ter sido dominado por necrose secundária em função da renovação celular que ocorre em períodos prolongados de cultura.

Foi também constatado que as células endoteliais permaneceram viáveis em maior número quando cultivadas na superfície tecidual esponjosa (ST-BCM) do material, mas isto talvez tenha sido influenciado pela capacidade das células endoteliais de penetrarem por entre as nanofibras de CB que compõem esta superfície em apenas sete dias de cultura. Analisando o comportamento das células endoteliais nos hidrogéis de celulose bacteriana observa-se que este material é próprio para aplicações médicas e de engenharia de tecidos, particularmente para regeneração tecidual.

A endotelização da macroestrutura de celulose bacteriana foi alcançada após 30 dias de cultivo das células endoteliais no interior dos canais internos à macroestrutura. A auto-organização das células endoteliais aderidas à parede dos canais internos a macroestrutura de CB foi um grande passo na endotelização de *scaffolds*.

O comportamento das células endoteliais (HUVECs) observado através do aprimoramento de técnicas para caracterização do cultivo endotelial *in situ* na celulose bacteriana é o primeiro passo na construção de tecidos e órgãos vascularizados.

6.2. Sugestões para trabalhos futuros

Recomenda-se a execução dos seguintes passos para a continuidade destes estudos:

- Avaliação da influência das características de superfície da CB na expressão de genes específicos das células endoteliais em função do tempo de cultura.
- Desenvolvimento de protocolos de co-cultura entre células endoteliais e musculares lisas, já que comprovadamente a interação entre estas duas linhagens celulares pode modular a manutenção do endotélio vascular.
- A utilização de fatores de crescimento importantes para a angiogênese, como, por exemplo, o VEGF e FGF, poderão ser utilizados para a indução da ramificação de vasos sanguíneos formados no interior do vaso da macroestrutura de CB.
- Ensaios utilizando fluxo contínuo de meio de cultura contendo células endoteliais, simulando assim, variações na pressão luminal. Estes resultados podem ser comparados com os resultados obtidos até o momento sem a utilização de fluxo.

- Desenvolvimento de um aparato experimental que simule o microambiente *in vivo* e que permita a cultura de células continuamente possibilitando a avaliação da integridade vascular em longos períodos de experimentação *in vitro*. Neste caso a quantificação de CO₂, O₂, pH e temperatura são apenas alguns dos parâmetros básicos que devem ser analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, G. A., S. L. GOODMAN, P. F. NEALEY, M. FRANCO and C. J. MURPHY. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res*, v.299, n.1, p.39-46. 2000.

ABRAMS, G. A., C. J. MURPHY, Z. Y. WANG, P. F. NEALEY and D. E. BJORLING. Ultrastructural basement membrane topography of the bladder epithelium. *Urol Res*, v.31, n.5, p.341-6. 2003.

AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, v.100, n.2, p.158-73. 2007a.

AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*, v.100, n.2, p.174-90. 2007b.

ALBERTS, B., D. BRAY, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS and P. WALTER. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Graland Publishing, v.1. 1994.

ALBIG, A. R., T. G. ROY, D. J. BECENTI and W. P. SCHIEMANN. Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression induced by growth on matrigel matrices: identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis. *Angiogenesis*, v.10, n.3, p.197-216. 2007.

ANDERSSON, J., H. STENHAMRE, H. BACKDAHL and P. GATENHOLM. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, v.94, n.4, p.1124-32. 2010.

ANDRADE, F. K., R. COSTA, L. DOMINGUES, R. SOARES and M. GAMA. Improving bacterial cellulose for blood vessel replacement: Functionalization with a chimeric protein containing a cellulose-binding module and an adhesion peptide. *Acta Biomater*, v.6, n.10, p.4034-41. 2010.

ANDRADE, F. K., J. P. SILVA, M. CARVALHO, E. M. CASTANHEIRA, R. SOARES and M. GAMA. Studies on the

hemocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, v.98, n.4, p.554-66. 2011.

ATALA, A., S. B. BAUER, S. SOKER, J. J. YOO and A. B. RETIK. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, v.367, n.9518, p.1241-6. 2006.

AUSPRUNK, D. H. and J. FOLKMAN. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, v.14, n.1, p.53-65. 1977.

AWWAD, H. K., M. EL NAGGAR, N. MOCKTAR and M. BARSOUM. Intercapillary distance measurement as an indicator of hypoxia in carcinoma of the cervix uteri. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v.12, n.8, p.1329-33. 1986.

BACKDAHL, H., M. ESGUERRA, D. DELBRO, B. RISBERG and P. GATENHOLM. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, v.2, n.6, p.320-30. 2008.

BACKDAHL, H., G. HELENIUS, A. BODIN, U. NANNMARK, B. R. JOHANSSON, B. RISBERG and P. GATENHOLM. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, v.27, n.9, p.2141-9. 2006.

BANERJEE, A., M. ARHA, S. CHOUDHARY, R. S. ASHTON, S. R. BHATIA, D. V. SCHAFFER and R. S. KANE. The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials*, v.30, n.27, p.4695-9. 2009.

BARUD, H., C. BARRIOS, T. REGIANI, R. MARQUES, M. VERELST, J. DEXPERTGHYS, Y. MESSADDEQ and S. RIBEIRO. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: C*, v.28, n.4, p.515-518. 2008.

BAYLESS, K. J. and G. E. DAVIS. Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube networks in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho. *J Biol Chem*, v.279, n.12, p.11686-95. 2004.

BELDEN, T. A., S. P. SCHMIDT, L. J. FALKOW and W. V. SHARP. Endothelial cell seeding of small-diameter vascular grafts. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, v.28, p.173-7. 1982.

BERGHE, T. V., N. VANLANGENAKKER, E. PARTHOENS, W. DECKERS, M. DEVOS, N. FESTJENS, C. J. GUERIN, U. T. BRUNK, W. DECLERCQ and P. VANDENABEELE. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*, v.17, n.6, p.922-30. 2010.

BOMBELI, T., B. R. SCHWARTZ and J. M. HARLAN. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood*, v.93, n.11, p.3831-8. 1999.

BORZANI, W. and S. J. DESOUZA. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid-media. *Biotechnol Lett.* , v.17, p.1271-1272. 1995.

BRAET, F., R. DE ZANGER and E. WISSE. Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J Microsc*, v.186, n.Pt 1, p.84-7. 1997.

BRAY, D. F., J. BAGU and P. KOEGLER. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech*, v.26, n.6, p.489-95. 1993.

BRESEN, N., I. OHLENSCHLAGER, N. WACHT, S. AFAZEL, G. LADURNER and P. M. ECKL. Ferritin and FasL (CD95L) mediate density dependent apoptosis in primary rat hepatocytes. *J Cell Physiol*, v.217, n.3, p.800-8. 2008.

BRODY, S., T. ANILKUMAR, S. LILIENSIEK, J. A. LAST, C. J. MURPHY and A. PANDIT. Characterizing nanoscale topography of the aortic heart valve basement membrane for tissue engineering heart valve scaffold design. *Tissue Eng*, v.12, n.2, p.413-21. 2006.

BROWN, A. An acetic ferment which forms cellulose. *J. Chem Soc*, v.49, p.432-439. 1886.

BROWN, R. M., JR., J. H. WILLISON and C. L. RICHARDSON. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.73, n.12, p.4565-9. 1976.

CAMPBELL, G. R. and J. H. CAMPBELL. Development of tissue engineered vascular grafts. *Curr Pharm Biotechnol*, v.8, n.1, p.43-50. 2007.

CANDIELLO, J., M. BALASUBRAMANI, E. M. SCHREIBER, G. J. COLE, U. MAYER, W. HALFTER and H. LIN. Biomechanical properties of native basement membranes. *FEBS J*, v.274, n.11, p.2897-908. 2007.

CAO, Y., M. R. DAVIDSON, A. J. O'CONNOR, G. W. STEVENS and J. J. COOPER-WHITE. Architecture control of three-dimensional polymeric scaffolds for soft tissue engineering. I. Establishment and validation of numerical models. *J Biomed Mater Res A*, v.71, n.1, p.81-9. 2004.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, v.6, n.4, p.389-395. 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, v.9, n.6, p.653-660. 2003.

CHAN, F. L. and S. INOUE. Lamina lucida of basement membrane: an artefact. *Microsc Res Tech*, v.28, n.1, p.48-59. 1994.

CHEHROUDI, B., T. R. GOULD and D. M. BRUNETTE. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *J Biomed Mater Res*, v.24, n.9, p.1203-19. 1990.

CHEN, C. S., M. MRKSICH, S. HUANG, G. M. WHITESIDES and D. E. INGBER. Geometric control of cell life and death. *Science*, v.276, n.5317, p.1425-8. 1997.

CHESMEL, K. D., C. C. CLARK, C. T. BRIGHTON and J. BLACK. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial

surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res*, v.29, n.9, p.1101-10. 1995.

CHO, S. W., S. H. LIM, I. K. KIM, Y. S. HONG, S. S. KIM, K. J. YOO, H. Y. PARK, Y. JANG, B. C. CHANG, C. Y. CHOI, K. C. HWANG and B. S. KIM. Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells. *Ann Surg*, v.241, n.3, p.506-15. 2005.

CLARK, P., P. CONNOLLY, A. S. CURTIS, J. A. DOW and C. D. WILKINSON. Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues. *Development*, v.99, n.3, p.439-48. 1987.

CLARK, P., P. CONNOLLY, A. S. CURTIS, J. A. DOW and C. D. WILKINSON. Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development*, v.108, n.4, p.635-44. 1990.

CLARK, P., P. CONNOLLY, A. S. CURTIS, J. A. DOW and C. D. WILKINSON. Cell guidance by ultrafine topography in vitro. *J Cell Sci*, v.99 (Pt 1), p.73-7. 1991.

CLARK, R. E., J. C. BOYD and J. F. MORAN. New principles governing the tissue reactivity of prosthetic materials. *J Surg Res*, v.16, n.5, p.510-22. 1974.

CUKIERMAN, E., R. PANKOV, D. R. STEVENS and K. M. YAMADA. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, v.294, n.5547, p.1708-12. 2001.

CUKIERMAN, E., R. PANKOV and K. M. YAMADA. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*, v.14, n.5, p.633-9. 2002.

CURTIS, A. and C. WILKINSON. Topographical control of cells. *Biomaterials*, v.18, n.24, p.1573-83. 1997.

CZAJA, W., A. KRYSZYNOWICZ, S. BIELECKI and R. M. BROWN, JR. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, v.27, n.2, p.145-51. 2006.

CZAJA, W., D. ROMANOVICZ and R. M. BROWN. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture *Cellulose*, v.11, p.403-411. 2004.

DALBY, M. J. Topographically induced direct cell mechanotransduction. *Medical Engineering & Physics*, v.27, n.9, p.730-742. 2005.

DALBY, M. J., M. O. RIEHLE, H. JOHNSTONE, S. AFFROSSMAN and A. S. CURTIS. In vitro reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials*, v.23, n.14, p.2945-54. 2002.

DALBY, M. J., M. O. RIEHLE, D. S. SUTHERLAND, H. AGHELI and A. S. G. CURTIS. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts - methods and perspectives. *European Journal of Cell Biology*, v.83, n.4, p.159-169. 2004.

DALBY, M. J., M. O. RIEHLE, S. J. YARWOOD, C. D. WILKINSON and A. S. CURTIS. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography. *Exp Cell Res*, v.284, n.2, p.274-82. 2003.

DALBY, M. J., S. J. YARWOOD, H. J. H. JOHNSTONE, S. AFFROSSMAN and M. O. RIEHLE. Fibroblast Signaling Events in Response to Nanotopography: A Gene Array Study. *Transactions on Nanobioscience*, v.1, n.1, p.12-17. 2002.

DE SOUZA, F. C., H. OLIVAL-COSTA, L. DA SILVA, P. A. PONTES and C. L. LANCELLOTTI. Bacterial Cellulose as Laryngeal Medialization Material: An Experimental Study. *J Voice*. 2010.

DE SOUZA, F. C., H. OLIVAL-COSTA, L. DA SILVA, P. A. PONTES and C. L. LANCELLOTTI. Bacterial cellulose as laryngeal medialization material: an experimental study. *J Voice*, v.25, n.6, p.765-9. 2011.

DEJANA, E., E. TOURNIER-LASSERVE and B. M. WEINSTEIN. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, v.16, n.2, p.209-21. 2009.

DEL ALAMO, J. C., G. N. NORWICH, Y. S. LI, J. C. LASHERAS and S. CHIEN. Anisotropic rheology and directional mechanotransduction in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.105, n.40, p.15411-6. 2008.

DEROANNE, C. F., C. M. LAPIERE and B. V. NUSGENS. In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res*, v.49, n.3, p.647-58. 2001.

DISCHER, D. E., P. JANMEY and Y. L. WANG. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, v.310, n.5751, p.1139-1143. 2005.

DOS ANJOS, B., A. B. NOVAES, JR., R. MEFFERT and E. P. BARBOZA. Clinical comparison of cellulose and expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of class II furcations in mandibular molars with 6-month re-entry. *J Periodontol*, v.69, n.4, p.454-9. 1998.

DROETTO, S., A. VIALE, L. PRIMO, N. JORDANEY, S. BRUNO, M. PAGANO, W. PIACIBELLO, F. BUSSOLINO and M. AGLIETTA. Vasculogenic potential of long term repopulating cord blood progenitors. *FASEB J*, v.18, n.11, p.1273-5. 2004.

DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter actigenum* in defined medium. *J Gen Microbiol*, v.21, p.327-37. 1959.

DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. *J Gen Microbiol*, v.22, p.25-39. 1960.

EBENSTEIN, D. M. and L. A. PRUITT. Nanoindentation of soft hydrated materials for application to vascular tissues. *J Biomed Mater Res A*, v.69, n.2, p.222-32. 2004.

ECHLIN, P. *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and x-ray microanalysis*. Boston: Springer. 2009.

EDELMAN, D. B. and E. W. KEEFER. A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Exp Neurol*, v.192, n.1, p.1-6. 2005.

EGGERMANN, J., S. KLICHE, G. JARMY, K. HOFFMANN, U. MAYR-BEYRLE, K. M. DEBATIN, J. WALTENBERGER and C. BELTINGER. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*, v.58, n.2, p.478-86. 2003.

ELLIOTT, M. R., F. B. CHEKENI, P. C. TRAMPONT, E. R. LAZAROWSKI, A. KADL, S. F. WALK, D. PARK, R. I. WOODSON, M. OSTANKOVICH, P. SHARMA, J. J. LYSIAK, T. K. HARDEN, N. LEITINGER and K. S. RAVICHANDRAN. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, v.461, n.7261, p.282-6. 2009.

ENGLER, A., L. BACAKOVA, C. NEWMAN, A. HATEGAN, M. GRIFFIN and D. DISCHER. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J*, v.86, n.1 Pt 1, p.617-28. 2004.

ERWIG, L. P. and P. M. HENSON. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, v.15, n.2, p.243-50. 2008.

ESGUERRA, M., H. FINK, M. W. LASCHKE, A. JEPSSON, D. DELBRO, P. GATENHOLM, M. D. MENGER and B. RISBERG. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*, v.93, n.1, p.140-9. 2009.

EULISS, L. E., J. A. DUPONT, S. GRATTON and J. DESIMONE. Imparting size, shape, and composition control of materials for nanomedicine. *Chem Soc Rev*, v.35, n.11, p.1095-104. 2006.

FAN, Y., Y. GONG, P. K. GHOSH, L. M. GRAHAM and P. L. FOX. Spatial coordination of actin polymerization and ILK-Akt2 activity during endothelial cell migration. *Dev Cell*, v.16, n.5, p.661-74. 2009.

FARAH, L. F. X. Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use. B. F. P. B. (Brasil). US 1990.

FERRARA, N., H. P. GERBER and J. LECOUTER. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, v.9, n.6, p.669-76. 2003.

FERREIRA, L. S., S. GERECHE, J. FULLER, H. F. SHIEH, G. VUNJAK-NOVAKOVIC and R. LANGER. Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, v.28, n.17, p.2706-17. 2007.

FINK, H., L. AHRENSTEDT, A. BODIN, H. BRUMER, P. GATENHOLM, A. KRETTEK and B. RISBERG. Bacterial cellulose modified with xyloglucan bearing the adhesion peptide RGD promotes endothelial cell adhesion and metabolism--a promising modification for vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med*, v.5, n.6, p.454-63. 2010.

FINK, H., J. HONG, K. DROTZ, B. RISBERG, J. SANCHEZ and A. SELLBORN. An in vitro study of blood compatibility of vascular grafts made of bacterial cellulose in comparison with conventionally-used graft materials. *J Biomed Mater Res A*. 2011.

FLOREY. The endothelial cell. *Br Med J*, v.2, n.5512, p.487-90. 1966.

FOLIGUET, B., F. VICARI, J. C. GUEDENET, J. D. DE KORWIN and L. MARCHAL. [Scanning electron microscopic study of *Campylobacter pylori* and associated gastroduodenal lesions]. *Gastroenterol Clin Biol*, v.13, n.1 Pt 1, p.65B-70B. 1989.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, v.1, n.1, p.27-31. 1995.

FONTANA, J. D., A. M. DE SOUZA, C. K. FONTANA, I. L. TORRIANI, J. C. MORESCHI, B. J. GALLOTTI, S. J. DE SOUZA, G. P. NARCISCO, J. A. BICHARA and L. F. FARAH. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, v.24-25, p.253-64. 1990.

FORGE, A., G. NEVILL, G. ZAJIC and A. WRIGHT. Scanning electron microscopy of the mammalian organ of Corti: assessment of preparative procedures. *Scanning Microsc*, v.6, n.2, p.521-34. 1992.

GAFNI, Y., Y. ZILBERMAN, Z. OPHIR, R. ABRAMOVITCH, M. JAFFE, Z. GAZIT, A. DOMB and D. GAZIT. Design of a filamentous polymeric scaffold for in vivo guided angiogenesis. *Tissue Eng*, v.12, n.11, p.3021-34. 2006.

GE, H. J., S. K. DU, D. H. LIN, J. N. ZHANG, J. L. XIANG and Z. X. LI. Gluconacetobacter hansenii subsp. nov., a high-yield bacterial cellulose producing strain induced by high hydrostatic pressure. *Appl Biochem Biotechnol*, v.165, n.7-8, p.1519-31. 2011.

GHOSH, K., Z. PAN, E. GUAN, S. GE, Y. LIU, T. NAKAMURA, X. D. REN, M. RAFAILOVICH and R. A. CLARK. Cell adaptation to a physiologically relevant ECM mimic with different viscoelastic properties. *Biomaterials*, v.28, n.4, p.671-9. 2007.

GIMBRONE, M. A., JR. Vascular endothelium: nature's blood-compatible container. *Ann N Y Acad Sci*, v.516, p.5-11. 1987.

GIMBRONE, M. A., JR., R. S. COTRAN and J. FOLKMAN. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol*, v.60, n.3, p.673-84. 1974.

GOLSTEIN, P. and G. KROEMER. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, v.32, n.1, p.37-43. 2007.

GRIFFITH, C. K., C. MILLER, R. C. SAINSON, J. W. CALVERT, N. L. JEON, C. C. HUGHES and S. C. GEORGE. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng*, v.11, n.1-2, p.257-66. 2005.

GRIFFITH, L. G. and M. A. SWARTZ. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.7, n.3, p.211-24. 2006.

HADDAD, R. J., JR., S. D. COOK and K. A. THOMAS. Biological fixation of porous-coated implants. *J Bone Joint Surg Am*, v.69, n.9, p.1459-66. 1987.

HAGEL, M., E. L. GEORGE, A. KIM, R. TAMIMI, S. L. OPITZ, C. E. TURNER, A. IMAMOTO and S. M. THOMAS. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol*, v.22, n.3, p.901-15. 2002.

HAYASHI, K. and T. NAIKI. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater*, v.2, n.1, p.3-19. 2009.

HAYDEN, M. R., J. R. SOWERS and S. C. TYAGI. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. *Cardiovasc Diabetol*, v.4, n.1, p.9. 2005.

HEEGAARD, S., O. A. JENSEN and J. U. PRAUSE. Hexamethyldisilazane in preparation of retinal tissue for scanning electron microscopy. *Ophthalmic Res*, v.18, n.4, p.203-8. 1986.

HELENIUS, G., H. BACKDAHL, A. BODIN, U. NANNMARK, P. GATENHOLM and B. RISBERG. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, v.76, n.2, p.431-8. 2006.

HELMKE, B. P. Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology (Bethesda)*, v.20, p.43-53. 2005.

HEO, M. S. and H. J. SON. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol Appl Biochem*, v.36, n.Pt 1, p.41-5. 2002.

HESS, S., H. METHE, J. O. KIM and E. R. EDELMAN. NF-kappaB activity in endothelial cells is modulated by cell substratum interactions and influences chemokine-mediated adhesion of natural killer cells. *Cell Transplant*, v.18, n.3, p.261-73. 2009.

HESTRIN, S. and M. SCHRAMM. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*, v.58, n.2, p.345-52. 1954.

HEYMER, A., D. HADDAD, M. WEBER, U. GBURECK, P. M. JAKOB, J. EULERT and U. NOTH. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials*, v.29, n.10, p.1473-83. 2008.

HIRSCHI, K. K., D. A. INGRAM and M. C. YODER. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.28, n.9, p.1584-95. 2008.

HOLZAPFEL, G. A. and R. W. OGDEN. *Biomechanics of soft tissue in cardiovascular systems*. Wien. 2003.

HUANG, S. and D. E. INGBER. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp Cell Res*, v.261, n.1, p.91-103. 2000.

HUNG, H. S., H. C. CHEN, C. H. TSAI and S. Z. LIN. Novel approach by nanobiomaterials in vascular tissue engineering. *Cell Transplant*. 2009.

IFKOVITS, J. L. and J. A. BURDICK. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng*, v.13, n.10, p.2369-85. 2007.

ILIC, D., Y. FURUTA, S. KANAZAWA, N. TAKEDA, K. SOBUE, N. NAKATSUJI, S. NOMURA, J. FUJIMOTO, M. OKADA and T. YAMAMOTO. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, v.377, n.6549, p.539-44. 1995.

INGBER, D. E. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res*, v.91, n.10, p.877-87. 2002.

INGBER, D. E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*, v.116, n.Pt 7, p.1157-73. 2003.

INGBER, D. E. and J. FOLKMAN. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, v.58, n.5, p.803-5. 1989.

JACOT, J. G., S. DIANIS, J. SCHNALL and J. Y. WONG. A simple microindentation technique for mapping the microscale compliance of soft hydrated materials and tissues. *J Biomed Mater Res A*, v.79, n.3, p.485-94. 2006.

JAFFE, E. A. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*, v.18, n.3, p.234-239. 1987.

JAIN, R. K., P. AU, J. TAM, D. G. DUDA and D. FUKUMURA. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol*, v.23, n.7, p.821-3. 2005.

JEONG, S. I., S. E. LEE, H. YANG, Y. JIN and C. PARK. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. *Mol Cell Toxicol*, v.6, p.373-380. 2010.

JOHNSEN, S., T. ERMUTH, E. TANCZOS, H. BANNASCH, R. E. HORCH, I. ZSCHOCKE, M. PESCHEN, E. SCHOPF, W. VANSCHIEDT and M. AUGUSTIN. Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa*, v.34, n.1, p.25-9. 2005.

JONAS, R. and L. F. FARAH. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, n.13, p.101-106. 1998.

JONES, P. A. Construction of an artificial blood vessel wall from cultured endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76, n.4, p.1882-6. 1979.

JUNG, S. W., H. M. JOO, J. S. PARK and J. H. LEE. Development of a rapid and effective method for preparing delicate dinoflagellates for scanning electron microscopy. *Journal of Applied Phycology*, v.22, n.3, p.313-317. 2010.

JURISIC, V. and V. BUMBASIREVIC. *In vitro* assays for cell death determination. *Arch Oncol*, v.16, n.3-4, p.49-54. 2008.

KENNEDY, J. F., P. A. KEEP and D. CATTY. The use of cellulose carbonate-based immunoadsorbents in the isolation of minor allotypic components of rabbit immunoglobulin populations. *J Immunol Methods*, v.50, n.1, p.57-75. 1982.

KERR, J. F., A. H. WYLLIE and A. R. CURRIE. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, v.26, n.4, p.239-57. 1972.

KIM, J. S., L. HE and J. J. LEMASTERS. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, v.304, n.3, p.463-70. 2003.

KLEMM, D., B. HEUBLEIN, H. P. FINK and A. BOHN. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Edit*, v.44, p.3358-3393. 2005.

KLEMM, D., D. SCHUMANN, U. UDHARDT and S. MARSCH. Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* v.26, p.1561-603. 2001.

KLEMM D, S. D., KRAMER F, HESSLER N, HORNING M, SCHMAUDER HP, ET AL. Nanocellulose as innovative polymers in research and application. *Adv Polym Sci.*, v.205, p.49-96. 2006.

KNIAZEVA, E. and A. J. PUTNAM. Endothelial cell traction and ECM density influence both capillary morphogenesis and maintenance in 3-D. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.297, n.1, p.C179-87. 2009.

KOHL, S. K., S. E. LEWIS, J. TUNNICLIFFE, R. L. LOTT, L. T. SPENCER, F. L. CARSON, R. J. SOUERS, R. H. KNAPP, S. MOVAHEDI-LANKARANI, T. S. HAAS and R. W. BROWN. The College of American Pathologists and National Society for Histotechnology workload study. *Arch Pathol Lab Med*, v.135, n.6, p.728-36. 1997.

KOLB, B. A., S. NAJMABADI and R. J. PAULSON. Ultrastructural characteristics of the luteal phase endometrium in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*, v.67, n.4, p.625-30. 1997.

KROLL, J. and J. WALTENBERGER. [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol*, v.89, n.3, p.206-18. 2000.

KRYSKO, D. V., K. D'HERDE and P. VANDENABEELE. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. *Apoptosis*, v.11, n.10, p.1709-26. 2006.

L'HEUREUX, N. A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J*, v.12, n.1, p.47-56. 1998.

L'HEUREUX, N., N. DUSSERRE, G. KONIG, B. VICTOR, P. KEIRE, T. N. WIGHT, N. A. CHRONOS, A. E. KYLES, C. R. GREGORY, G. HOYT, R. C. ROBBINS and T. N. MCALLISTER. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*, v.12, n.3, p.361-5. 2006.

LAMALICE, L., F. LE BOEUF and J. HUOT. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, v.100, n.6, p.782-94. 2007.

LANGER, R. Tissue engineering. *Mol Ther*, v.1, n.1, p.12-5. 2000a.

LANGER, R. *Tissue Engineering. Molecular Therapy*, v.1. 2000b.

LANGER, R. and J. P. VACANTI. Tissue engineering. *Science*, v.260, n.5110, p.920-6. 1993.

LASCHKE, M. W. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng*, v.12, p.2093-2104. 2006.

LAUBE, H. R., J. DUWE, W. RUTSCH and W. KONERTZ. Clinical experience with autologous endothelial cell-seeded polytetrafluoroethylene coronary artery bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg*, v.120, n.1, p.134-41. 2000.

LAUBER, K., E. BOHN, S. M. KROBER, Y. J. XIAO, S. G. BLUMENTHAL, R. K. LINDEMANN, P. MARINI, C. WIEDIG, A. ZOBYWALSKI, S. BAKSH, Y. XU, I. B. AUTENRIETH, K. SCHULZE-OSTHOFF, C. BELKA, G. STUHLER and S. WESSELBORG. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, v.113, n.6, p.717-30. 2003.

LEE, B. H., H. J. KIM and H. S. YANG. Polymerization of aniline on bacterial cellulose and characterization of bacterial cellulose/polyaniline nanocomposite films. *Current Applied Physics*, v.12, n.1, p.75-80. 2012.

LEE, J. T. Y. and K. L. CHOW. SEM Sample Preparation for Cells on 3D Scaffolds by Freeze-Drying and HMDS. *Scanning*, v.33, p.1-14. 2011.

LEE, R. J., M. L. SPRINGER, W. E. BLANCO-BOSE, R. SHAW, P. C. URSELL and H. M. BLAU. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*, v.102, n.8, p.898-901. 2000.

LI, J., M. DING, Q. FU, H. TAN, X. XIE and Y. ZHONG. A novel strategy to graft RGD peptide on biomaterials surfaces for endothelization of small-diameter vascular grafts and tissue engineering blood vessel. *J Mater Sci Mater Med*, v.19, n.7, p.2595-603. 2008.

LIBBY, P., P. M. RIDKER and A. MASERI. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, v.105, n.9, p.1135-43. 2002.

LILIENSIEK, S. J., S. CAMPBELL, P. F. NEALEY and C. J. MURPHY. The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts. *J Biomed Mater Res A*, v.79, n.1, p.185-92. 2006.

LILIENSIEK, S. J., P. NEALEY and C. J. MURPHY. Characterization of endothelial basement membrane nanotopography in rhesus macaque as a guide for vessel tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, v.15, n.9, p.2643-51. 2009.

LILIENSIEK, S. J., J. A. WOOD, J. YONG, R. AUERBACH, P. F. NEALEY and C. J. MURPHY. Modulation of human vascular endothelial cell behaviors by nanotopographic cues. *Biomaterials*, v.31, n.20, p.5418-26. 2010.

LOKMIC, Z., F. STILLAERT, W. A. MORRISON, E. W. THOMPSON and G. M. MITCHELL. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J*, v.21, n.2, p.511-22. 2007.

LOVETT, M., K. LEE, A. EDWARDS and D. L. KAPLAN. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, v.15, n.3, p.353-70. 2009.

- LU, F., J. LI, J. GAO, R. OGAWA, C. OU, B. YANG and B. FU. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*, v.124, n.5, p.1437-46. 2009.
- LU, J., M. P. RAO, N. C. MACDONALD, D. KHANG and T. J. WEBSTER. Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features. *Acta Biomater*, v.4, n.1, p.192-201. 2008.
- LU, L., S. J. OSWALD, H. NGU and F. C. YIN. Mechanical properties of actin stress fibers in living cells. *Biophys J*, v.95, n.12, p.6060-71. 2008.
- LUONG, E. and S. GERECHT. Stem cells and scaffolds for vascularizing engineered tissue constructs. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v.114, p.129-72. 2009.
- LUSCHER, T. F., Y. DOHI, F. C. TANNER and C. BOULANGER. Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol*, v.86 Suppl 2, p.143-58. 1991.
- LUSCHER, T. F., V. RICHARD and F. C. TANNER. Endothelium-derived vasoactive factors and their role in the coronary circulation. *Trends Cardiovasc Med*, v.1, n.5, p.179-85. 1991.
- MADRI, J. A. and S. K. WILLIAMS. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol*, v.97, n.1, p.153-65. 1983.
- MARCHANT, R. E., K. M. MILLER and J. M. ANDERSON. In vivo biocompatibility studies. V. In vivo leukocyte interactions with Biomer. *J Biomed Mater Res*, v.18, n.9, p.1169-90. 1984.
- MARRA, K. G., A. J. DEFAL, J. A. CLAVIJO-ALVAREZ, S. F. BADYLAK, A. TAIEB, B. SCHIPPER, J. BENNETT and J. P. RUBIN. FGF-2 enhances vascularization for adipose tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*, v.121, n.4, p.1153-64. 2008.

MARX-FIGINI, M. Studies of the biosynthesis of cellulose in the algae *Valonia*. *Biochim Biophys Acta*, v.177, n.1, p.27-34. 1969.

MARX-FIGINI, M. and G. V. SCHULZ. On kinetics and mechanism of biosynthesis of cellulose in higher plants (according to experiments on cottonseed fibers). *Biochim Biophys Acta*, v.112, n.1, p.81-101. 1966.

MCGRATH, J. L. Cell spreading: the power to simplify. *Curr Biol*, v.17, n.10, p.R357-8. 2007.

MEDEIROS, E. F. and L. F. FILHO. Materiais Avançados no Brasil 2010-2022. T. E. I. C. Centro De Gestão E Estudos Estratégicos. Ciência. Brasília: Corporate Financial Center: 360 p. 2010.

MEINHART, J., M. DEUTSCH and P. ZILLA. Eight years of clinical endothelial cell transplantation. Closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts. *ASAIO J*, v.43, n.5, p.M515-21. 1997.

METHE, H., A. GROOTHUIS, M. H. SAYEGH and E. R. EDELMAN. Matrix adherence of endothelial cells attenuates immune reactivity: induction of hyporesponsiveness in allo- and xenogeneic models. *Faseb J*, v.21, n.7, p.1515-26. 2007.

METHE, H., S. HESS and E. R. EDELMAN. The effect of three-dimensional matrix-embedding of endothelial cells on the humoral and cellular immune response. *Semin Immunol*, v.20, n.2, p.117-22. 2008.

MIYASAKA, M. and T. TANAKA. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nat Rev Immunol*, v.4, n.5, p.360-70. 2004.

MOONEY, D. J. and A. G. MIKOS. Growing new organs. *Sci Am*, v.280, n.4, p.60-5. 1999.

MUTHURANGU, V., D. ATKINSON, M. SERMESANT, M. E. MIQUEL, S. HEGDE, R. JOHNSON, R. ANDRIANTSIMIYAVONA, A. M. TAYLOR, E. BAKER, R. TULLOH, D. HILL and R. S. RAZAVI. Measurement of total pulmonary arterial compliance using invasive pressure monitoring and MR flow quantification during MR-guided cardiac catheterization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.289, n.3, p.H1301-6. 2005.

NAGANO, M., T. YAMASHITA, H. HAMADA, K. OHNEDA, K. KIMURA, T. NAKAGAWA, M. SHIBUYA, H. YOSHIKAWA and O. OHNEDA. Identification of functional endothelial progenitor cells suitable for the treatment of ischemic tissue using human umbilical cord blood. *Blood*, v.110, n.1, p.151-60. 2007.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol*, v.58, n.6, p.347-51. 1983.

NEVINS, M. L. Aesthetic and regenerative oral plastic surgery: clinical applications in tissue engineering. *Dent Today*, v.25, n.10, p.142, 144-6; quiz 146-7. 2006.

NGU, H., Y. FENG, L. LU, S. J. OSWALD, G. D. LONGMORE and F. C. YIN. Effect of focal adhesion proteins on endothelial cell adhesion, motility and orientation response to cyclic strain. *Ann Biomed Eng*, v.38, n.1, p.208-22. 2010.

NIKLASON, L. E., J. GAO, W. M. ABBOTT, K. K. HIRSCHI, S. HOUSER, R. MARINI and R. LANGER. Functional arteries grown in vitro. *Science*, v.284, n.5413, p.489-93. 1999.

NORMAN, J. J., J. M. COLLINS, S. SHARMA, B. RUSSELL and T. A. DESAI. Microstructures in 3D biological gels affect cell proliferation. *Tissue Eng Part A*, v.14, n.3, p.379-90. 2008.

NOSE, Y. Dr. Michael E. DeBakey and his contributions in the field of artificial organs. *Artif Organs*, v.32, n.9, p.661-6. 2008.

O'HARE, M. J., J. BOND, C. CLARKE, Y. TAKEUCHI, A. J. ATHERTON, C. BERRY, J. MOODY, A. R. SILVER, D. C. DAVIES, A. E. ALSOP, A. M. NEVILLE and P. S. JAT. Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.2, p.646-51. 2001.

OHASHI, T., Y. ISHII, Y. ISHIKAWA, T. MATSUMOTO and M. SATO. Experimental and numerical analyses of local mechanical properties measured by atomic force microscopy for sheared endothelial cells. *Biomed Mater Eng*, v.12, n.3, p.319-27. 2002.

OIE, T., Y. MURAYAMA, T. FUKUDA, C. NAGAI, S. OMATA, K. KANDA, H. YAKU and Y. NAKAYAMA. Local elasticity imaging of vascular tissues using a tactile mapping system. *J Artif Organs*, v.12, n.1, p.40-6. 2009.

OMOTO, T., Y. UNO, I. ASAI and S. E. GEN. *Handbook of hydrocolloids: bacterial cellulose*. Cambridge: CRC Press. 2000.

PALSSON, B. O. and S. N. BHATIA. *Tissue Engineering*. New Jersey. 2004.

PERETS, A., Y. BARUCH, F. WEISBUCH, G. SHOSHANY, G. NEUFELD and S. COHEN. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*, v.65, n.4, p.489-97. 2003.

PERTILE, R., S. MOREIRA, F. ANDRADE, L. DOMINGUES and M. GAMA. Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnol Prog* 2012.

PERTILE, R. A., S. MOREIRA, R. M. COSTA, A. CORREIA, L. GUARDAO, F. GARTNER, M. VILANOVA and M. GAMA. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011.

PETERSEN, N. and P. GATENHOLM. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.91, n.5, p.1277-86. 2011.

PORTO, L. M., D. O. S. RECOUVREUX, C. R. RAMBO, C. A. CARMINATTI, C. M. COSTA and R. V. ANTONIO. Corpos tridimensionais de celulose bacteriana. Processo de produção e uso dos mesmos. I. N. D. P. Intelectual. Brasil 2008.

POST, M. J., R. LAHAM, F. W. SELLKE and M. SIMONS. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res*, v.49, n.3, p.522-31. 2001.

PRESTWICH, G. D., D. M. MARECAK, J. F. MARECEK, K. P. VERCRUYSSSE and M. R. ZIEBELL. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release*, v.53, n.1-3, p.93-103. 1998.

PRIES, A. R., T. W. SECOMB and P. GAEHTGENS. The endothelial surface layer. *Archiv European Journal of Physiology*, v.440, n.5, p.653-666. 2000.

PUTRA A, K. A., FURUKAWA H, GONG JP, OSADA Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer*, v.49, p.1885-91. 2008.

RAMBO, C. R., D. O. S. RECOUVREUX, C. A. CARMINATTI, A. K. PITLOVANCIV, R. V. ANTONIO and L. M. PORTO. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Mat Sci Eng C-Bio S*, v.28, p.549-54. 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos Programa de Pós-graduação em Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S., C. R. RAMBO, F. V. BERTI, C. A. CRAMINATTI, R. V. ANTÔNIO and L. M. PORTO. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, v.31, n.2, p.151-157. 2011.

REHFELDT, F., A. J. ENGLER, A. ECKHARDT, F. AHMED and D. E. DISCHER. Cell responses to the mechanochemical microenvironment--implications for regenerative medicine and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, v.59, n.13, p.1329-39. 2007.

RHO, J. Y., R. B. ASHMAN and C. H. TURNER. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *J Biomech*, v.26, n.2, p.111-9. 1993.

RICHARDSON, T. P., M. C. PETERS, A. B. ENNETT and D. J. MOONEY. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, v.19, n.11, p.1029-34. 2001.

RISAU, W. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Biol*, v.11, p.73-91. 1995.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, v.386, n.6626, p.671-4. 1997.

RIVRON, N. C. Engeneering vascular development for tissue regeneration. Institute and Faculty of Science and Technology University of Twente, Netherlands, 2010.

ROLLAND, J. P., B. W. MAYNOR, L. E. EULISS, A. E. EXNER, G. M. DENISON and J. M. DESIMONE. Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials. *J Am Chem Soc*, v.127, n.28, p.10096-100. 2005.

RONGISH, B. J., G. HINCHMAN, M. K. DOTY, H. S. BALDWIN and R. J. TOMANEK. Relationship of the extracellular matrix to coronary neovascularization during development. *J Mol Cell Cardiol*, v.28, n.10, p.2203-15. 1996.

ROUWKEMA, J., N. C. RIVRON and C. A. VAN BLITTERSWIJK. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*, v.26, n.8, p.434-41. 2008.

RUSSELL, J. B., R. E. MUCK and P. J. WEIMER. Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiol Ecol*, v.67, n.2, p.183-97. 2009.

SAMAREL, A. M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.289, n.6, p.H2291-301. 2005.

SATCHER, R., C. F. DEWEY, JR. and J. H. HARTWIG. Mechanical remodeling of the endothelial surface and actin cytoskeleton induced by fluid flow. *Microcirculation*, v.4, n.4, p.439-53. 1997.

SCHERBERICH, A., R. GALLI, C. JAQUIERY, J. FARHADI and I. MARTIN. Three-dimensional perfusion culture of human adipose tissue-derived endothelial and osteoblastic progenitors generates osteogenic constructs with intrinsic vascularization capacity. *Stem Cells*, v.25, n.7, p.1823-9. 2007.

SCHMIDT, S. P., T. J. HUNTER, M. HIRKO, T. A. BELDEN, M. M. EVANCHO, W. V. SHARP and D. L. DONOVAN. Small-diameter vascular prostheses: two designs of PTFE and endothelial cell-seeded and nonseeded Dacron. *J Vasc Surg*, v.2, n.2, p.292-7. 1985.

SHYY, J. Y. and S. CHIEN. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res*, v.91, n.9, p.769-75. 2002.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*, v.584, n.22, p.4491-9. 2008.

SILVA, M. T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J Leukoc Biol*, v.88, n.5, p.885-96. 2010.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett*, v.584, n.22, p.4491-9. 2011.

SILVA, R., G. D'AMICO, K. M. HODIVALA-DILKE and L. E. REYNOLDS. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.28, n.10, p.1703-13. 2008.

SINGHVI, R., G. STEPHANOPOULOS and D. I. WANG. Effects of substratum morphology on cell physiology. *Biotechnol Bioeng*, v.43, n.8, p.764-71. 1994.

SLIZOVA, D., O. KRS and B. POSPISILOVA. Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron microscopy. *Journal of Endovascular Therapy*, v.10, n.2, p.285-287. 2003.

SOTTIURAI, V. S., J. S. T. YAO, W. R. FLINN and R. C. BATSON. Intimal hyperplasia and neointima - an ultrastructural analysis of thrombosed grafts in humans. *Surgery*, v.93, n.6, p.809-817. 1983.

SVENSSON, A., E. NICKLASSON, T. HARRAH, B. PANILAITIS, D. L. KAPLAN, M. BRITTBERG and P. GATENHOLM. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

TAJIMA, S., J. S. CHU, S. LI and K. KOMVOPOULOS. Differential regulation of endothelial cell adhesion, spreading, and cytoskeleton on

low-density polyethylene by nanotopography and surface chemistry modification induced by argon plasma treatment. *J Biomed Mater Res A*, v.84, n.3, p.828-36. 2008.

THEVENOT, P., A. NAIR, J. DEY, J. YANG and L. TANG. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*, v.14, n.4, p.319-31. 2008.

THOMAS, M. and H. G. AUGUSTIN. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis*, v.12, n.2, p.125-37. 2009.

THOMASSON, S. A. and J. R. THOMASSON. A Comparison of CPD (Critical Point Drying) and HMDS (Hexamethyldisilazane) in the Preparation of *Corallorhiza* spp. Rhizomes and Associated Mycorrhizae for SEM (Scanning Electron Microscopy) *Transactions of Kansas Academy of Science*, v.114, n.1-2, p.129-134. 2011.

THURNER, P., R. MULLER, G. RAEBER, U. SENNHAUSER and J. A. HUBBELL. 3D morphology of cell cultures: a quantitative approach using micrometer synchrotron light tomography. *Microsc Res Tech*, v.66, n.6, p.289-98. 2005.

TIWARI, A., C. DISALVO, R. WALESBY, G. HAMILTON and A. M. SEIFALIAN. Mediastinal fat: a source of cells for tissue engineering of coronary artery bypass grafts. *Microvasc Res*, v.65, n.1, p.61-4. 2003.

TONOUCHI, N., N. TAHARA, Y. KOJIMA, T. NAKAI, F. SAKAI, T. HAYASHI, T. TSUCHIDA and F. YOSHINAGA. A beta-glucosidase gene downstream of the cellulose synthase operon in cellulose-producing *Acetobacter*. *Biosci Biotechnol Biochem*, v.61, n.10, p.1789-90. 1997.

TSAI, S. H., Y. W. LIU, W. C. TANG, Z. W. ZHOU, C. Y. HWANG, G. Y. HWANG, B. R. OU, C. P. HU, V. C. YANG and J. K. CHEN. Characterization of porcine arterial endothelial cells cultured on amniotic membrane, a potential matrix for vascular tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*, v.357, n.4, p.984-90. 2007.

TSANG, K. Y., M. C. CHEUNG, D. CHAN and K. S. CHEAH. The developmental roles of the extracellular matrix: beyond structure to regulation. *Cell Tissue Res*, v.339, n.1, p.93-110. 2011.

TSANG, V. L. and S. N. BHATIA. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev*, v.56, n.11, p.1635-47. 2004.

TSUDA, Y., T. SHIMIZU, M. YAMATO, A. KIKUCHI, T. SASAGAWA, S. SEKIYA, J. KOBAYASHI, G. CHEN and T. OKANO. Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique. *Biomaterials*, v.28, n.33, p.4939-46. 2007.

UBERO-PASCAL, N., J. M. FORTUNO and M. DE LOS ANGELES PUIG. New application of air-drying techniques for studying Ephemeroptera and Plecoptera eggs by scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech*, v.68, n.5, p.264-71. 2005.

UMMARTYOTIN, S., J. JUNTARO, M. SAIN and H. MANUSPIYA. Development of transparent bacterial cellulose nanocomposite film as substrate for flexible organic light emitting diode (OLED) display. *Industrial Crops and Products*, v.35, n.1, p.92-97. 2012.

VINKEN, M., E. DECROCK, E. DE VUYST, L. LEYBAERT, T. VANHAECKE and V. ROGIERS. Biochemical characterisation of an in vitro model of hepatocellular apoptotic cell death. *Altern Lab Anim*, v.37, n.2, p.209-18. 2009.

VOORHEES, A. B. The use of tubes constructed from vinyon N cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg*, v.3, n.135, p.332-336. 1952.

WAN, W. K. and L. E. MILLON. Poly(vinyl alcohol)- bacterial cellulose nanocomposites. U. Patent. United States of America. A1 2005.

WANG, H. B., M. DEMBO, S. K. HANKS and Y. WANG. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.98, n.20, p.11295-300. 2001.

WANG, J. H., P. GOLDSCHMIDT-CLERMONT and F. C. YIN. Contractility affects stress fiber remodeling and reorientation of endothelial cells subjected to cyclic mechanical stretching. *Ann Biomed Eng*, v.28, n.10, p.1165-71. 2000.

WATANABE, K., Y. ETO, S. TAKANO, S. NAKAMORI, H. SHIBAI and S. YAMANAKA. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate. *Cytotechnology*, v.13, n.2, p.107-14. 1993.

WATANABE, K., M. TABUCHI, Y. MORINAGA and F. YOSHINAGA. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, v.5, n.3, p.187-200. 1998.

WEINBERG, C. B. and E. BELL. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*, v.231, n.4736, p.397-400. 1986.

WEISS, P. and B. GARBER. Shape and Movement of Mesenchyme Cells as Functions of the Physical Structure of the Medium: Contributions to a Quantitative Morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.38, n.3, p.264-80. 1952.

WERYHA, G., L. MARCHAL, J. LECLERE, G. GRIGNON and P. HARTEMANN. Scanning electron microscopy (SEM) of the human thyroid gland: a technical improvement for follicular cell observation. *J Submicrosc Cytol Pathol*, v.22, n.3, p.459-64. 1990.

WILLE, J. J., C. M. AMBROSI and F. C. YIN. Comparison of the effects of cyclic stretching and compression on endothelial cell morphological responses. *J Biomech Eng*, v.126, n.5, p.545-51. 2004.

WILLIAMS, D. F. *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool. 1999.

WIPPERMANN, J., D. SCHUMANN, D. KLEMM, H. KOSMEHL, S. SALEHI-GELANI and T. WAHLERS. Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v.37, n.5, p.592-6. 2009.

WOJCIAK-STOTHARD, B., A. S. CURTIS, W. MONAGHAN, M. MCGRATH, I. SOMMER and C. D. WILKINSON. Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell Motil Cytoskeleton*, v.31, n.2, p.147-58. 1995.

WOJCIAK-STOTHARD, B., Z. MADEJA, W. KOROHODA, A. CURTIS and C. WILKINSON. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behaviour. *Cell Biol Int*, v.19, n.6, p.485-90. 1995.

WOOD, J. A., S. J. LILIENSIEK, P. RUSSEL and C. J. MURPHY. Biophysical Cueing and Vascular Endothelial Cell Behavior. *Materials*, v.3, p.1620-1639. 2010.

WU, X., C. MOLINARO, N. JOHNSON and C. A. CASIANO. Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum*, v.44, n.11, p.2642-52. 2001.

WYLLIE, A. H., J. F. KERR and A. R. CURRIE. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, v.68, p.251-306. 1980.

XIA, Y., M. PRAWIRASATYA, B. C. HENG, F. BOEY and S. S. VENKATRAMAN. Seeding density matters: extensive intercellular contact masks the surface dependence of endothelial cell-biomaterial interactions. *J Mater Sci Mater Med*, v.22, n.2, p.389-96. 2011.

XYLOS CORPORATION, C. Biomaterials for life. 2010: <<http://www.xyloscorp.com>> p. 2010.

YAMADA, Y., K. HOSHINO and T. ISHIKAWA. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci Biotechnol Biochem*, v.61, n.8, p.1244-51. 1997.

YANCOPOULOS, G. D., S. DAVIS, N. W. GALE, J. S. RUDGE, S. J. WIEGAND and J. HOLASH. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, v.407, n.6801, p.242-8. 2000.

YANO, K., D. GALE, S. MASSBERG, P. K. CHERUVU, R. MONAHAN-EARLEY, E. S. MORGAN, D. HAIG, U. H. VON ANDRIAN, A. M. DVORAK and W. C. AIRD. Phenotypic heterogeneity is an evolutionarily conserved feature of the endothelium. *Blood*, v.109, n.2, p.613-5. 2007.

YIM, E. K. and K. W. LEONG. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*, v.16, n.10, p.1193-217. 2005a.

YIM, E. K. and K. W. LEONG. Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response. *Nanomedicine*, v.1, n.1, p.10-21. 2005b.

YIM, E. K., R. M. REANO, S. W. PANG, A. F. YEE, C. S. CHEN and K. W. LEONG. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials*, v.26, n.26, p.5405-13. 2005.

YOON, C. H., J. HUR, K. W. PARK, J. H. KIM, C. S. LEE, I. Y. OH, T. Y. KIM, H. J. CHO, H. J. KANG, I. H. CHAE, H. K. YANG, B. H. OH, Y. B. PARK and H. S. KIM. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*, v.112, n.11, p.1618-27. 2005.

ZABOROWSKA, M., A. BODIN, H. BACKDAHL, J. POPP, A. GOLDSTEIN and P. GATENHOLM. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater*, v.6, n.7, p.2540-7. 2010.

ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron*, v.32, n.4, p.427-38. 2001.

ZAHEDMANESH, H., J. N. MACKLE, A. SELLBORN, K. DROTZ, A. BODIN, P. GATENHOLM and C. LALLY. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v.97, n.1, p.105-13. 2011.

ZANI, B. G. and E. R. EDELMAN. Cellular bridges: Routes for intercellular communication and cell migration. *Commun Integr Biol*, v.3, n.3, p.215-20. 2010.

ZHANG, L. N., D. W. WILSON, V. DA CUNHA, M. E. SULLIVAN, R. VERGONA, J. C. RUTLEDGE and Y. X. WANG. Endothelial NO synthase deficiency promotes smooth muscle progenitor cells in association with upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha in a

mouse model of carotid artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.26, n.4, p.765-72. 2006.

ZIATS, N. P., K. M. MILLER and J. M. ANDERSON. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials*, v.9, n.1, p.5-13. 1988.

ZISCH, A. H., M. P. LUTOLF, M. EHRBAR, G. P. RAEBER, S. C. RIZZI, N. DAVIES, H. SCHMOKEL, D. BEZUIDENHOUT, V. DJONOV, P. ZILLA and J. A. HUBBELL. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J*, v.17, n.15, p.2260-2. 2003.

ZISCH, A. H., M. P. LUTOLF and J. A. HUBBELL. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol*, v.12, n.6, p.295-310. 2003.