

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

Bruna Borstmann Jardim Leal

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMATERIAL A PARTIR DE COLÁGENO DE
PELE DE TILÁPIA PARA UTILIZAÇÃO COMO ENXERTO VASCULAR EM
DOENÇAS ARTERIAIS PERIFÉRICAS**

Porto Alegre

2022

Bruna Borstmann Jardim Leal

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOMATERIAL A PARTIR DE COLÁGENO DE
PELE DE TILÁPIA PARA UTILIZAÇÃO COMO ENXERTO VASCULAR EM
DOENÇAS ARTERIAIS PERIFÉRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Fisiologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Patricia Pranke
Coorientador(a): Dra. Daikelly Iglesias Braghirolli

Porto Alegre

2022

Agradecimentos

Aos meus pais, Graça e Paulo, pelo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho. Por toda dedicação que tornou possível a finalização deste ciclo. Pelo incentivo a passar por todos os obstáculos enfrentados durante este período. Por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu namorado, Evandro, pelos momentos especiais, incentivo e apoio diário. Pelo companheirismo em todos os momentos que dediquei para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Patricia Pranke, pela oportunidade de fazer parte do laboratório. Pelo o auxílio durante toda a realização deste trabalho, desde o apoio emocional até a rápida resolução de todos os desafios que enfrentamos. Por toda credibilidade desde que iniciei no laboratório, como iniciação científica. Por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação.

À minha co-orientadora, Daikelly, pela oportunidade de trabalharmos juntas em mais um desafio e pela confiança depositada em mim desde o início. Por todo auxílio nos grandes desafios que tive para finalizar este trabalho. Pela paciência e persistência durante a realização dos experimentos. Pelo companheirismo destes anos. Por toda dedicação para me auxiliar em todas as etapas do mestrado.

A todos os meus colegas do Laboratório de Hematologia e Células-Tronco, pela companhia no laboratório e por todo auxílio, presencial e virtual, na realização dos experimentos. Por todos os momentos em que compartilhamos ideias e incentivos a todos.

Ao Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL), pela colaboração através da análise das amostras.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará, pela doação do material essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da bolsa de Mestrado.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-Tronco, pelo apoio financeiro e pela
oportunidade de fazer parte desse grupo.

E a todos que me auxiliaram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO	5
Resumo	7
Abstract	9
Lista de abreviaturas e siglas	11
Lista de figuras	12
Lista de tabelas	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Doenças arteriais vasculares	17
2.1.1 Enxertos vasculares	18
2.2 Engenharia de tecidos vasculares	19
2.2.1 Produção de biomateriais	20
2.2.2 Poli(caprolactona)	23
2.2.3 Colágeno	24
2.3 Desenvolvimento celular nos biomateriais vasculares	25
3 HIPÓTESES	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Produção das soluções poliméricas e dos biomateriais	29
5.2 Caracterização físico-química dos biomateriais	29
5.2.1 Morfologia dos biomateriais e diâmetro de fibras	29
5.2.2 Propriedades mecânicas dos biomateriais	30
5.2.3 Ângulo de contato	30
5.2.4 Infravermelho	30
5.3 Caracterização biológica	30
5.3.1 Adesão celular	31
5.3.2 Viabilidade celular	31
5.3.3 Morfologia celular	31
5.4 Análise estatística	32
6 RESULTADOS	33
6.1 Caracterização físico-química dos biomateriais	33
6.1.1 Morfologia dos biomateriais	33

6.2.1 Propriedades mecânicas dos biomateriais	34
6.2.2 Ângulo de contato	36
6.2.3 Infravermelho	36
6.3 Caracterização biológica	37
6.3.1 Adesão celular	37
6.3.2 Viabilidade celular	38
6.3.3 Morfologia celular	39
7 DISCUSSÃO	41
8 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	55

Resumo

Os enxertos vasculares sintéticos disponíveis atualmente possuem alta taxa de falha em vasos sanguíneos de pequeno diâmetro (< 6 mm). Assim, novos enxertos vasculares devem ser desenvolvidos para serem utilizados no tratamento das doenças vasculares, assim como as doenças arteriais periféricas (DAPs). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um biomaterial de poli(caprolactona) (PCL) associado ao colágeno extraído de pele de tilápia para utilização como enxerto vascular em DAPs. Esse tipo de colágeno está sendo bastante utilizado na engenharia de tecidos para o desenvolvimento de biomateriais, sendo que o mesmo pode ser associado à PCL, cujo polímero possui alta resistência mecânica e elasticidade. A combinação destes polímeros permite o desenvolvimento de um biomaterial com boas propriedades biológicas e mecânicas adequadas para uso como enxerto vascular. Assim, para esse trabalho, quatro tipos de biomateriais foram desenvolvidos, utilizando a técnica de *electrospinning*: biomateriais de PCL, biomateriais de PCL associada ao colágeno nas proporções 50:50 (PCL/Col 50:50) e 25:75 (PCL/Col 25:75) e biomateriais de PCL funcionalizados com colágeno (PCL/Func). A análise de espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) demonstrou que os biomateriais produzidos a partir da combinação dos dois polímeros apresentaram grupos funcionais da PCL e do colágeno. Os biomateriais de PCL, PCL/Col 50:50 e PCL/Col 25:75 apresentaram fibras com diâmetro de $1.145 \pm 182,36 \mu\text{m}$, $1.366 \pm 268,26 \mu\text{m}$ e $1.263 \pm 188,21 \mu\text{m}$, respectivamente. Estes resultados são considerados adequados para aplicação na engenharia de tecidos vasculares, devido ao diâmetro ser semelhante ao das fibras da matriz extracelular (MEC) natural. A morfologia destas fibras desenvolvidas por *electrospinning* possui semelhança aos feixes da MEC. A medida do ângulo de contato da superfície dos biomateriais demonstrou que o biomaterial de PCL é hidrofóbico e que a adição de colágeno às fibras de PCL contribuiu para que os biomateriais tivessem características hidrofílicas. As propriedades mecânicas demonstraram que os biomateriais de PCL, PCL/Func e PCL/Col 50:50 apresentaram módulo de Young de 0,299 MPa, 0,159 MPa e 0,248 MPa, respectivamente, indicando resultados satisfatórios para aplicação vascular. A caracterização biológica dos biomateriais demonstrou que as células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) conseguiram se aderir e se proliferar sobre a superfície dos biomateriais.

Ainda, a morfologia das HUVECs dos biomateriais de PCL/Col 50:50 e PCL/Col 25:75 apresentaram citoesqueleto alongado e espalhado, indicando que tiveram boa interação com a superfície desses biomateriais. A partir destes resultados, é possível concluir que adicionar domínios naturais aos polímeros sintéticos, permite que os biomateriais obtenham mais hidrofiliabilidade, maior adesão e viabilidade celular, sendo candidatos promissores para utilização como enxertos vasculares na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos vasculares, células de veia umbilical humana, biomateriais vasculares, colágeno da tilápia e medicina regenerativa.

Abstract

Currently available synthetic vascular grafts have a high failure rate in small diameter blood vessels (< 6 mm). Thus, new vascular grafts must be developed to be used in the treatment of vascular diseases, such as peripheral arterial diseases (PADs). Thus, the aim of this work has been to develop a poly(caprolactone) (PCL) biomaterial associated with collagen extracted from tilapia skin for use as a vascular graft in PADs. This type of collagen is being widely used in tissue engineering for the development of biomaterials. It can be associated with PCL as it has high mechanical strength and elasticity. The combination of these polymers allows for the development of a biomaterial with good biological and mechanical properties suitable for use as a vascular graft. Thus, for this work, four types of biomaterials were developed, using the electrospinning technique: PCL biomaterials, PCL biomaterials associated with collagen in the proportions 50:50 (PCL/Col 50:50) and 25:75 (PCL/Col 25:75) and collagen-functionalized PCL biomaterials (PCL/Func). The fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis showed that the biomaterials produced from the combination of the two polymers presented functional groups of PCL and collagen. The PCL, PCL/Col 50:50 and PCL/Col 25:75 biomaterials presented fibers with diameters of $1.145 \pm 182.36\mu\text{m}$, $1.366 \pm 268.26 \mu\text{m}$ and $1.263 \pm 188.21\mu\text{m}$, respectively. These results are considered suitable for application in vascular tissue engineering as the diameter is similar to that of natural extracellular matrix (ECM) fibers. The morphology of these fibers developed by electrospinning are similar to ECM bundles. The measurement of the contact angle of the surface of the biomaterials showed that the PCL biomaterial is hydrophobic and that the addition of collagen to the PCL fibers contributed to the biomaterials having hydrophilic characteristics. The mechanical properties showed that the PCL, PCL/Func and PCL/Col 50:50 biomaterials presented Young's modulus of 0.299 MPa, 0.159 MPa and 0.248 MPa, respectively, indicating satisfactory results for vascular application. The biological characterization of the biomaterials showed that human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were able to adhere and proliferate on the surface of the biomaterials. Furthermore, the morphology of the HUVECs from PCL/Col 50:50 and PCL/Col 25:75 biomaterials showed an elongated and spread cytoskeleton, indicating that they had good interaction with the surface of these biomaterials. From these results, it is possible to conclude that adding natural domains to synthetic polymers allows

biomaterials to obtain more hydrophilicity, greater adhesion and cell viability, being, thereby, promising candidates for use as vascular grafts in tissue engineering.

Keywords: Vascular tissue engineering, human umbilical vein cells, vascular biomaterials and regenerative medicine.

Lista de abreviaturas e siglas

Col	Colágeno
DAPs	Doenças arteriais periféricas
DAPI	do inglês <i>4,6-diamidino-2-fenylindole dihydrochloride</i>
DMA	do inglês <i>Dynamic mechanical analysis</i>
EGM2	do inglês <i>Endothelium cell growth médium</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HCA	do inglês <i>Human coronary artery</i>
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol
HUVECs	do inglês <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffer solution</i>
PCL	Poli(caprolactona)
PLLA	do inglês <i>Poly-L-lactic acid</i>
PLCL	do inglês <i>Poly(L-lactide-co-caprolactone)</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
SV	do inglês <i>Saphenous vein</i>
VEGF	do inglês <i>Vascular endothelial growth fator</i>

Lista de figuras

Figura 1 - Representação da técnica de *electrospinning*.

Figura 2 - Artigos publicados na base de dados *Pubmed* até junho de 2020, utilizando os termos “*tissue engineering and vascular grafts*”.

Figura 3 - Polímeros utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds* vasculares.

Figura 4 - Representação da estrutura química da PCL.

Figura 5 - Estrutura química do colágeno.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura dos biomateriais de PCL (A), PCL/Func50:50 (B) e PCL/Col 25:75 (C).

Figura 7 – Distribuição do diâmetro dos biomateriais de PCL (A), PCL/Col 50:50 (B) e PCL/Col 25:75 (C).

Figura 8 - Representação das propriedades mecânicas dos biomateriais de PCL (A), PCL/Func (B) e PCL/Col 50:50 (C).

Figura 9 - Análise de FTIR dos biomateriais.

Figura 10 - Adesão celular das HUVECs sobre os diferentes biomateriais.

Figura 11 – Viabilidade celular dos biomateriais por MTT.

Figura 12 - Morfologia das HUVECs sobre os diferentes biomateriais.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Diâmetro das fibras desenvolvidas por *electrospinning*

Tabela 2 - Módulo de Young e tensão máxima dos biomateriais de PCL, PCL/Func e PCL/Col 50:50

Tabela 3 - Ângulo de contato dos diferentes biomateriais desenvolvidos

1. INTRODUÇÃO

As doenças arteriais periféricas (DAPs) são caracterizadas pela obstrução ou estreitamento de vasos sanguíneos não miocárdicos e acometem, principalmente, os membros inferiores (Tu *et al.*, 2015). As DAPs estão relacionadas à aterosclerose, desordens inflamatórias e não inflamatórias e representam um problema de saúde global de alta prevalência, estando associadas a altos níveis de morbidade e de mortalidade. Além desses fatores, elas aumentam o risco para infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (Eid; Kunal; Philip, 2021). Atualmente, as DAPs representam o grupo de doenças vasculares com maior prevalência nos Estados Unidos, onde afetam cerca de 8 milhões de pessoas por ano (Zhao *et al.*, 2022).

O tratamento das DAPs é realizado de acordo com a gravidade do quadro exibido pelo paciente. O tratamento pode ser conduzido através do uso de anticoagulantes e vasodilatadores, que impedem a formação de trombos e dilatam o vaso sanguíneo, respectivamente, permitindo a melhora do fluxo de sangue (Tu *et al.*, 2015). Já, em casos mais graves, quando há lesão do vaso sanguíneo, o tratamento envolve a substituição cirúrgica ou desvio do vaso, através da utilização de enxertos vasculares (Noble *et al.*, 2020).

Quando há necessidade da intervenção cirúrgica, os enxertos vasculares autólogos são considerados padrão ouro, devido à mínima rejeição imune. Os principais vasos utilizados, neste tipo de enxerto, são as veias safena e as artérias mamárias (Aslani *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2018). No entanto, os enxertos autólogos apresentam alta probabilidade de formação de trombos, aterosclerose, aneurisma ou hiperplasia neointimal (Tan; Bai; Yan, 2020). Ainda, a utilização desses enxertos vasculares é limitada pela disponibilidade insuficiente, em quantidade e qualidade de vaso sanguíneo para a auto-doação. Um outro problema relacionado ao uso dos enxertos vasculares autólogos é que a sua obtenção é realizada através de técnica invasiva, o que pode acarretar morbidade ao paciente (Weekes *et al.*, 2022).

Frente ao exposto, a utilização de enxertos vasculares sintéticos é uma escolha potencial. Os enxertos sintéticos comerciais tais como Dacron® e Politetrafluoretileno (PTFE) possuem resistência e flexibilidade adequadas à utilização vascular e têm apresentado um desempenho satisfatório em vasos de médio e grande calibre (Sohn *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2021). Contudo, quando são aplicados em vasos de pequeno diâmetro, ou seja, menores do que 6 mm, possuem

alta taxa de falha devido, principalmente, à formação de trombos em seu interior. Dessa forma, novos enxertos vasculares precisam ser desenvolvidos para a aplicação em vasos de pequeno diâmetro (Braghirolli *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2022).

A engenharia de tecidos é uma área da medicina regenerativa que visa o desenvolvimento de biomateriais para a regeneração de órgãos e tecidos danificados, associando a engenharia e a biologia para esse propósito (Wei *et al.*, 2022). Além dos biomateriais, essa ferramenta pode combinar células e moléculas bioativas para propiciar a regeneração tecidual (Cunnane *et al.*, 2018). Na engenharia de tecidos, a utilização de biomateriais tem como objetivo imitar a MEC natural (Choi *et al.*, 2021). Os biomateriais atuam como *scaffolds*, isto é, arcabouços que servem como suportes para o desenvolvimento das células. À medida que as células se proliferam e secretam MEC, os biomateriais se degradam, resultando na restauração do tecido natural. Assim, os biomateriais devem possuir diferentes propriedades, como biocompatibilidade, boa interface de adsorção para a adesão celular taxa de degradação controlada e propriedades mecânicas adequadas ao tecido que se deseja reparar (Qiu *et al.*, 2019).

Para o desenvolvimento desses biomateriais, polímeros naturais ou sintéticos têm sido bastante empregados. Os polímeros naturais, como o colágeno, possuem propriedades semelhantes às proteínas da MEC em termos de grupos funcionais. Essa característica propicia a adesão e o desenvolvimento celular (Mohammadalizadeh; Bahremandi-Toloue; Karbasi 2022). Contudo, esses polímeros possuem propriedades mecânicas muitas vezes insatisfatórias, maior instabilidade e difícil manuseio para produção dos *scaffolds* (Leal *et al.*, 2021). Os polímeros sintéticos, como a poli(caprolactona) (PCL), por sua vez, possuem boas propriedades físico-químicas como alta resistência mecânica, degradação controlada e alta estabilidade no processamento e armazenamento. Contudo, carecem de domínios naturais para a interação celular e, assim, apresentam propriedades biológicas limitadas (Braghirolli *et al.*, 2017; Steffens *et al.*, 2018).

Em trabalho prévio, o presente grupo de pesquisa observou que biomateriais produzidos com o poliéster PCL, pela técnica de *electrospinning*, apresentaram morfologia semelhante à da MEC natural, além de elasticidade compatível com a dos vasos sanguíneos humanos. Contudo, quando células progenitoras endoteliais (EPCs) foram cultivadas sobre os mesmos, eles apresentaram baixa adesão e viabilidade celular. Acredita-se que isso ocorra, principalmente, pela ausência de

domínios naturais, que poderiam ser reconhecidos e utilizados pelas células para a sua adaptação na estrutura (Braghirolli *et al.*, 2017). Visando o aumento da adesão e da viabilidade celular e a manutenção das propriedades físico-químicas, a combinação de polímeros naturais aos sintéticos se mostra uma alternativa importante.

A pele de tilápia está sendo bastante pesquisada para a engenharia de tecidos e já é utilizada para o desenvolvimento de biomateriais. Ela representa uma alternativa para a fabricação de novos materiais, que possam auxiliar na regeneração de tecidos, a partir de materiais biológicos e possui baixo custo (Costa *et al.*, 2019). Esse material possui propriedades morfológicas semelhantes à pele humana, apresentando uma epiderme revestida por epitélio pavimentoso estratificado, seguido de feixes de colágeno longos, organizados, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical, predominantemente do tipo I. Além disso, a pele de tilápia também possui boa resistência à tração (Junior *et al.*, 2020).

Assim, a fim de se obter um biomaterial vascular com propriedades físico-químicas e biológicas adequadas à regeneração vascular, neste trabalho, os polímeros PCL e colágeno foram utilizados na produção de *scaffolds* por *electrospinning*, com objetivo de combinar os polímeros em diferentes proporções para análise da melhor combinação. Para esse estudo, foram desenvolvidos quatro biomateriais, PCL, PCL combinado com colágeno em duas diferentes proporções e PCL funcionalizado com colágeno. Os *scaffolds* produzidos foram avaliados quanto as suas propriedades físico-químicas e biológicas. A hipótese é que os *scaffolds* produzidos a partir da combinação desses polímeros apresentem elasticidade e resistência, além de boas propriedades biológicas, como adesão e a viabilidade celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças arteriais vasculares

As doenças arteriais vasculares representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (Maina et al., 2018). Elas são classificadas em doença arterial coronária, doença da artéria carótida e doença vascular periférica (Maina et al., 2018). Atualmente, a incidência e a mortalidade por doenças arteriais periféricas (DAPs) e por outras doenças cardiovasculares estão aumentando, o que leva ao aumento da necessidade de transplantes vasculares (Jia et al., 2020; Jia et al., 2021). As DAPs podem ser desencadeadas pela aterosclerose, que é caracterizada pelo acúmulo de uma placa de gordura que causa estreitamento dos vasos sanguíneos, levando a sua obstrução e a indução de lesão isquêmica. Esses eventos caracterizam a necessidade de utilização de dispositivos vasculares para restaurar o vaso sanguíneo lesado ou a região próxima (Maina et al., 2018).

As doenças arteriais periféricas (DAPs) são caracterizadas pela obstrução ou estreitamento de vasos sanguíneos não miocárdios que comprometem o fluxo sanguíneo e acometem, principalmente, os membros inferiores (Carrabba et al., 2018; Wang et al., 2020). No mundo, as DAPs afetam mais de 200 milhões de pessoas (Wang et al., 2020). Nos Estados Unidos, cerca de 8,4 milhões de pessoas acima de 40 anos possuem DAP (Noble et al., 2020). Assim, as DAPs representam um problema de saúde global de alta prevalência, sendo que sua incidência varia de 3 a 10% em pessoas abaixo de 70 anos e de 15 a 20% em pessoas acima de 70 anos (Kayama et al., 2021). No entanto, 10 a 20% dos pacientes acometidos pela doença não apresentam sintomas, dificultando o diagnóstico de DAP (Liu et al., 2019). Quando os pacientes apresentam sintomas, estes costumam ser variados, desde claudicação (dor no membro) até isquemia crítica do membro afetado, que é uma consequência da progressão das DAPs e ocorre em 21% dos portadores da doença ao longo de cinco anos (Kim et al., 2021; Machin et al., 2022). Por esses motivos, atualmente, o diagnóstico das DAPs é realizado quando o índice de tornozelo-braquial é $\leq 0,9$, segundo diretriz da *American Heart Association/American College of Cardiology* de 2016 (Eid; Kunal; Goodney, 2021; Gerhard-Herman et al., 2017). Indivíduos diagnosticados com DAP possuem risco aumentado para doença coronariana, infarto do miocárdio e parada cardiorrespiratória (Lecouturier et al., 2019).

Quando as DAPs não são tratadas podem causar isquemia tecidual grave, úlceras e gangrena, as quais podem levar à amputação do membro afetado. Nestes casos, cerca de 25% dos portadores de DAPs precisam de revascularização ou de amputação (Noble *et al.*, 2020). O tratamento das DAPs é realizado de acordo com a gravidade do quadro clínico exibido pelo paciente. Ele pode ser feito incluindo farmacoterapia oral (antiplaquetários ou antitrombóticos), no entanto, esse tipo de tratamento não melhora funcionalmente os vasos sanguíneos e também não há recuperação do tecido lesado (Wang *et al.*, 2020). Em casos em que os medicamentos não são efetivos, os procedimentos endovasculares e de revascularização são alternativas minimamente invasivas, por serem percutâneos, e que diminuem o risco de mortalidade. Entre eles, se destacam a angioplastia e a utilização de *stents* (Abdollahi *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). As técnicas de revascularização possuem alta taxa de falha, podendo causar reestenose em 27% dos casos e oclusões em 19% dos casos, cerca de três anos após a intervenção (Noble *et al.*, 2020). Em casos mais graves, quando há lesão do vaso sanguíneo, uma das alternativas de tratamento é a utilização de enxertos vasculares (Braghirolli *et al.*, 2017).

2.1.1 Enxertos vasculares

Quando o tratamento para as DAPs envolve o uso de enxertos vasculares, os enxertos autólogos são a primeira opção para substituição dos vasos sanguíneos lesados ou danificados. São utilizadas as próprias veias ou artérias coletadas do paciente para serem utilizadas no mesmo, sendo mais recomendadas as veias safenas e as artérias mamárias (Jia *et al.*, 2020). Esse tipo de enxerto é utilizado clinicamente desde 1949 e é considerado o padrão ouro por se tratar de enxerto nativo e, conseqüentemente, diminuir o risco de rejeição imunológica (Aslani *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2021). A utilização de artérias e veias autólogas, no entanto, pode não ser uma alternativa. Muitas vezes o paciente não apresenta um vaso saudável para auto-doação ou já realizou esse procedimento anteriormente (Fernández-Colino *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2020). Fatores como idade do paciente, doenças vasculares como aterosclerose, condição geral de saúde e diabetes também interferem e limitam o uso dos enxertos vasculares (Copes *et al.*, 2019; Jia *et al.*, 2020).

Quando os enxertos autólogos não podem ser utilizados, os enxertos vasculares sintéticos representam uma escolha potencial (Tan *et al.*, 2020). Os dispositivos vasculares sintéticos disponíveis atualmente são compostos por politereftalato de etileno (Dacron) ou politetrafluoretileno expandido (ePTFE) (Jin *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2020; Sohn *et al.*, 2021). Esses enxertos vasculares sintéticos foram utilizados pela primeira vez na década de 1950, como uma alternativa frente a impossibilidade do uso de enxertos autólogos (Maina *et al.*, 2018). No entanto, são compostos por materiais não degradáveis e podem desencadear rejeição imunológica a longo prazo, sendo necessária a realização de uma cirurgia de substituição (Jia *et al.*, 2020). Esses enxertos vasculares são utilizados em vasos sanguíneos de médio calibre (6-10 mm) devido ao fluxo sanguíneo alto e baixa resistência. No entanto, eles não são adequados para os vasos sanguíneos de pequeno diâmetro (< 6mm) devido à incompatibilidade de complacência que pode causar trombose, hiperplasia intimal e endotelização incompleta, o que acarreta a falha do enxerto (Carrabba *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020). Quando são aplicados em vasos de pequeno diâmetro, possuem baixa taxa de permeabilidade relatada, sendo 40% após 6 meses e 25% após 3 anos, e adsorção de proteínas plasmáticas (Maina *et al.*, 2018; Sohn *et al.*, 2021).

Assim, é necessário o desenvolvimento de novos enxertos vasculares, que apresentem biocompatibilidade adequada, propriedades antitrombogênicas, que propiciem a endotelização (Aslani *et al.*, 2019), tenham resistência mecânica e falta de imunogenicidade para o sucesso na aplicação em vasos de pequeno diâmetro (Weekes *et al.*, 2022).

2.2 Engenharia de tecidos vasculares

A engenharia de tecidos é uma área da medicina regenerativa que associa a engenharia e a biologia, fornecendo alternativas para o desenvolvimento de tecidos ou órgãos artificiais com objetivo de substituir tecidos em modelos *in vitro* e *in vivo*, com baixa taxa de rejeição imunológica (Fernández-Colino 2019; Maina *et al.*, 2018). O primeiro estudo cunhando esse conceito foi publicado em 1991, visando uma terapia individual através da regeneração, remodelação e crescimento do tecido danificado (Vacandi *et al.*, 1991). Desde então, a engenharia de tecidos vem sendo utilizada para a regeneração de diferentes tecidos, através da combinação de células, moléculas bioativas e biomateriais (Maurmann; Sperling; Pranke, 2018).

A engenharia de tecidos vasculares tem como objetivo regenerar ou substituir tecidos vasoativos danificados através da utilização de materiais semelhantes às estruturas dos vasos sanguíneos (Choi *et al.*, 2020). Os enxertos vasculares desenvolvidos pela engenharia de tecidos são promissores no tratamento de doenças cardiovasculares, devido às suas características de biodegradabilidade e de regeneração do tecido (Joshi *et al.*, 2020). Eles podem ser desenvolvidos por duas estratégias: *in vitro* ou *in vivo*. A metodologia *in vitro* é caracterizada pela coleta de células, expansão celular, semeadura celular em estruturas tridimensionais *in vitro* e indução celular para o desenvolvimento de tecido vascular funcional, seguido de implantação no paciente. A metodologia *in vivo* é caracterizada pela implantação do *scaffold* vascular, que orienta e controla o recrutamento celular, sem cultura de células e tecidos *in vitro* (Li *et al.*, 2020). Para que o enxerto vascular desenvolvido pela engenharia de tecidos tenha sucesso, ele precisa ter algumas características essenciais, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, não causar resposta imunológica, ter poros com diâmetros adequados para que as células consigam adentrar a estrutura e assim colonizá-la (Maurmann; Sperling; Pranke, 2018). Além disso, devem ter permeabilidade a longo prazo, superfície antitrombótica para evitar a formação de trombos no interior do enxerto e capacidade de se remodelar como um tecido funcional (Braghirolli *et al.*, 2017; Leal *et al.*, 2021). Ainda, o biomaterial deve ter propriedades mecânicas adequadas como resistência e elasticidade, além de promover a endotelização através do favorecimento à proliferação de células endoteliais, e por fim, possuir propriedades semelhantes à MEC natural. Na engenharia de tecidos vasculares podem ser utilizadas técnicas eletrodinâmicas para o desenvolvimento de biomateriais para serem utilizados como enxertos vasculares (Joshi *et al.*, 2020).

2.2.1 Produção de biomateriais

Técnicas eletrodinâmicas, como *electrospinning*, são promissoras e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de biomateriais com as características necessárias para aplicação na engenharia de tecidos vasculares (Lan *et al.*, 2021). A técnica de *electrospinning* está representada na figura 1. As técnicas eletrodinâmicas auxiliam no desenvolvimento de *scaffolds* tridimensionais baseados em fibras construídas a partir de diferentes polímeros, e permitem o controle do diâmetro das fibras e da

porosidade, por exemplo. O equipamento dessas técnicas eletrodinâmicas é composto por uma seringa com uma agulha ligada à sua ponta, conectada a um eletrodo, por uma bomba hidrostática e por uma fonte elétrica (Jin *et al.*, 2022). Na seringa, uma solução polimérica é acondicionada e através da bomba hidrostática, essa solução é direcionada para uma placa coletora metálica, que atua como um suporte para a coleta do material desenvolvido. Assim, à medida que a solução polimérica vai sendo liberada pela agulha, ela vai sendo energizada, causando uma deformação da gota e seu afilamento, e assim, formando as nanofibras e os biomateriais (Braghirolli *et al.*, 2014; Maurmann; Sperling; Pranke, 2018).

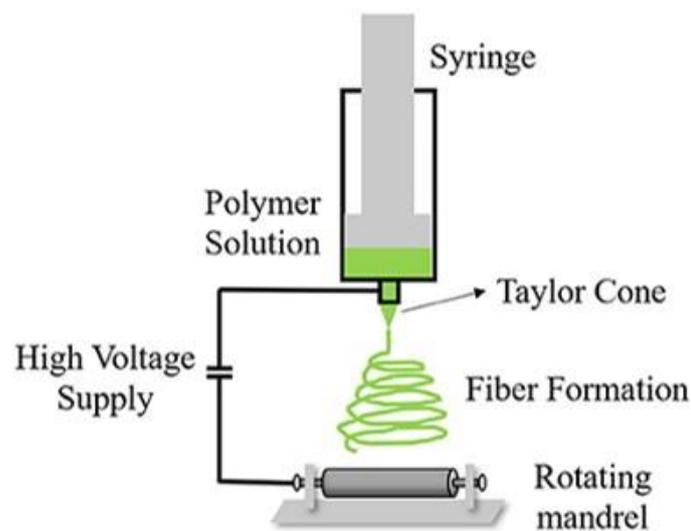


Figura 1 - Representação da técnica de *electrospinning*. (Adaptado de Leal *et al.*, 2021).

A partir dessas características do *electrospinning*, um número crescente de trabalhos utilizando essa técnica para a regeneração vascular estão sendo publicados. De acordo com trabalho prévio do grupo, até junho de 2020, na base de dados *Pubmed*, 2.226 artigos haviam sido publicados envolvendo o termo “*tissue engineering and vascular grafts*” (Figura 2).

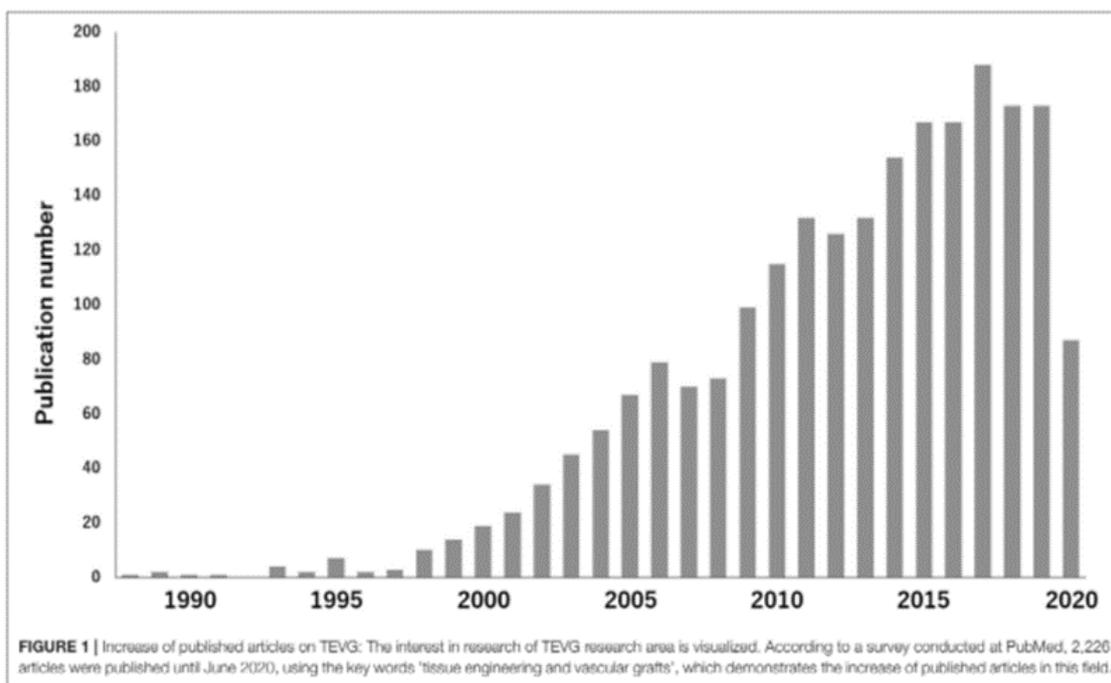


Figura 2 - Artigos publicados na base de dados *Pubmed* até junho de 2020, utilizando os termos “*tissue engineering and vascular grafts*”. (Retirado de Leal *et al.*, 2021).

A estrutura dos materiais desenvolvidos por *electrospinning* é semelhante à MEC, sendo uma característica benéfica para a adesão, proliferação e migração celular (Lan *et al.*, 2021; Leal *et al.*, 2021). Ainda, essa técnica possui algumas vantagens, como o simples manuseio e pela possibilidade de desenvolver materiais na escala micro a nanométrica (Rhamati *et al.*, 2021).

Os polímeros a serem utilizados neste equipamento, para o desenvolvimento dos biomateriais, devem ser escolhidos de acordo com o tecido a ser reparado, podendo ser naturais ou sintéticos (Jia *et al.*, 2020). Os polímeros sintéticos mais utilizados na engenharia de tecidos vasculares são a PCL e poli(L-ácido láctico)-co-caprolactona (PLCL) (Leal *et al.*, 2021), representados na figura 3. Eles possuem melhor taxa de degradação e sua maior vantagem é a possibilidade de ajustar as características de acordo com as necessidades clínicas, como as propriedades mecânicas (Carrabba; Madeddu, 2018). No entanto, a falta das características biológicas desses polímeros é uma das limitações. Portanto, comumente, são associados polímeros naturais e sintéticos no desenvolvimento de biomateriais vasculares (Ercolani; Gaudio; Bianco, 2015; Jia *et al.*, 2020).

Os polímeros naturais mais utilizados na engenharia de tecidos vasculares são o colágeno e a quitosana (Leal *et al.*, 2021) (Figura 3). Eles possuem propriedades

biológicas semelhantes às da MEC, em termos de grupos funcionais e, assim, domínios naturais, que suportam o reconhecimento e adesão celular, bioatividade, susceptibilidade à degradação proteolítica desencadeada por células e remodelação natural (Ercolani; Gaudio; Bianco, 2015). No entanto, esses polímeros apresentam baixa bioestabilidade, risco de antigenicidade e baixas propriedades mecânicas, além de degradação rápida (Jia *et al.*, 2020; Qiu *et al.*, 2019).

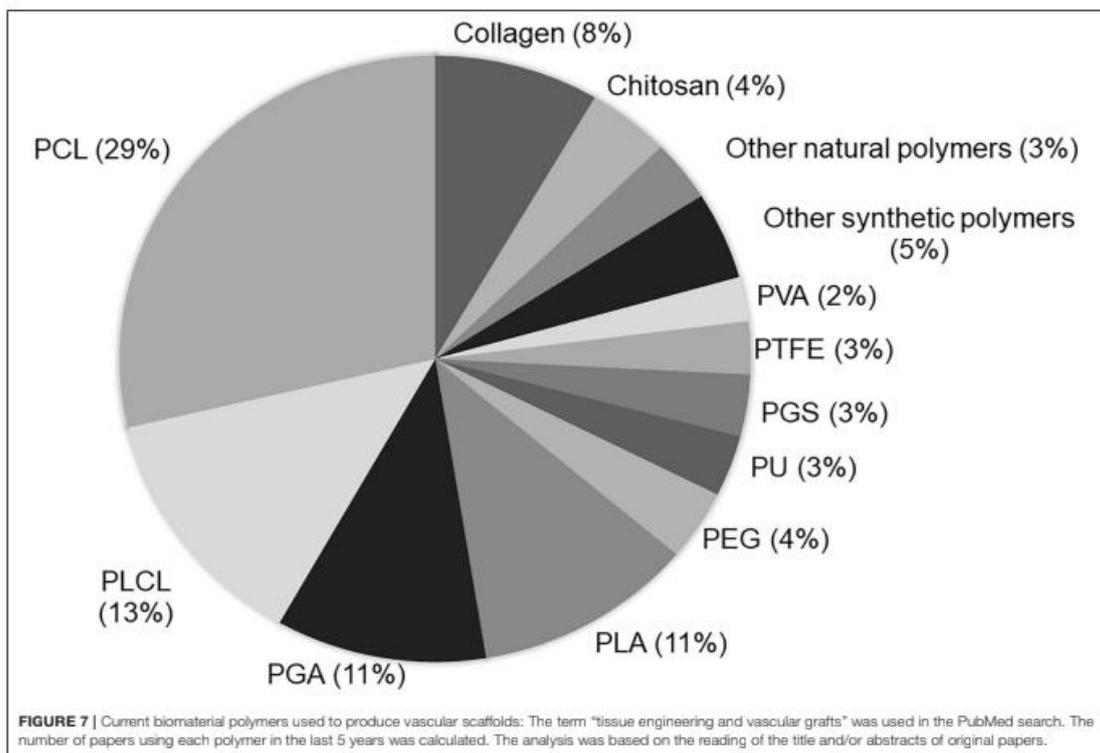


Figura 3 - Polímeros utilizados para o desenvolvimento de *scaffolds* vasculares. (Retirado de Leal *et al.*, 2021).

2.2.2 Poli(caprolactona)

A PCL é o polímero sintético mais utilizado na engenharia de tecidos vasculares (Leal *et al.*, 2021). O mesmo é um polímero aprovado e certificado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização biomédica, sendo amplamente estudado para liberação de medicamentos e outros materiais biológicos (Braghirolli *et al.*, 2017; Dou *et al.*, 2019). Sua fórmula química é $C_6H_{10}O_2$ e sua estrutura está representada na figura 4.

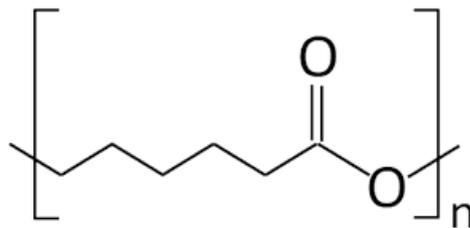


Figura 4 - Representação da estrutura química da PCL. (Retirado de Google imagens).

Suas principais características incluem biocompatibilidade e biodegradabilidade, alta resistência mecânica e elasticidade (Fawal *et al.*, 2021). Possui uma taxa de degradação lenta e controlada, que contribui na diminuição da citotoxicidade e inflamação *in vivo*. A degradação lenta também é compatível com a taxa de formação dos tecidos vasculares. Além disso, essa característica permite o desenvolvimento de fibras eletrofiadas com boas propriedades morfológicas, capazes de reproduzir a estrutura da MEC natural dos vasos sanguíneos (Zavan *et al.*, 2021). No entanto, a principal desvantagem desse polímero é a propriedade hidrofóbica que limita sua aplicação, devido à falta de grupos funcionais de superfície bioativos, os quais são essenciais para ligação de receptores celulares. Por esse motivo, frequentemente a PCL é associada aos polímeros naturais (Pandiyaraji *et al.*, 2021).

Ainda, para o desenvolvimento de biomateriais vasculares, devem ser utilizados polímeros que tenham boas propriedades mecânicas. A PCL possui resistência mecânica e elasticidade, que são características essenciais para aplicação vascular. Eles devem apresentar essas propriedades, semelhantes aos tecidos nativos, devido ao alto fluxo e pressão de sangue que irá passar pelos vasos sanguíneos (Norouzi; Shamloo, 2019).

2.2.3 Colágeno

O colágeno é um polímero natural, sendo a proteína mais abundante em animais e o componente predominante da MEC nativa (Copes *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019). A estrutura química do colágeno está representada na figura 5.

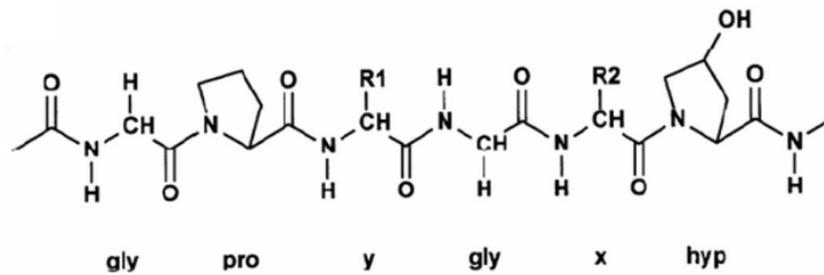


Figura 5 - Estrutura química do colágeno. (Retirado de Google imagens).

O colágeno tem como características a antigenicidade fraca, biocompatibilidade, biodegradável e promove adesão celular através de receptores celulares que reconhecem uma sequência específica (Steffens *et al.*, 2018). Além disso, os *scaffolds* de colágeno auxiliam na angiogênese e na formação de neo-vasculatura (Copes *et al.*, 2019). Como relatado anteriormente, o colágeno é o polímero natural mais utilizado na engenharia de tecidos, no entanto, possui duas limitações principais, a trombogenicidade intrínseca (quando o contato com o sangue desencadeia um papel importante) do colágeno e suas fracas propriedades mecânicas (Copes *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2019). Por esse motivo, os polímeros são associados aos polímeros sintéticos, a fim do biomaterial desenvolvido ter boas propriedades mecânicas.

Zhang e colaboradores desenvolveram um *scaffold* de tecido vascular tubular híbrido, chamado de “circular-knitted”, devido à sua característica tubular, utilizando filamentos de colágeno eletroquimicamente alinhados associados ao polímero poli(L-ácido lático) (PLLA). Os resultados demonstraram que o colágeno promoveu o recrutamento e a proliferação de células endoteliais, auxiliando três vezes mais na adesão celular do que quando o *scaffold* de PLA foi utilizado isoladamente. Ainda, o PLA forneceu resistência mecânica e estabilidade estrutural, em que a complacência do *scaffold* foi de $3,98 \pm 1,94\%/100$ mmHg, semelhante à artéria coronária humana ($3,8 \pm 0,3\%/100$ mmHg). Assim, a combinação do polímero natural e sintético é promissora para a construção de enxertos vasculares (Zhang *et al.*, 2020).

2.3 Desenvolvimento celular nos biomateriais vasculares

Para realizar a substituição dos tecidos nativos, os enxertos vasculares devem estabelecer a organização celular e tecidual semelhante à dos vasos sanguíneos. A parede vascular nativa é organizada em três camadas distintas: camada íntima,

média e adventícia (Jia *et al.*, 2020). A camada íntima é a mais próxima do fluxo sanguíneo, contendo células endoteliais que estão envolvidas nas transduções de sinalização biológica, agregação antiplaquetária e interação celular. Além disso, essas células auxiliam na angiogênese, na regulação da vasoconstrição e na manutenção do sistema fibrinolítico (Ding *et al.*, 2020; Tan; Bai; Yan, 2020). A camada média dos vasos sanguíneos é composta pelas células musculares lisas, que mantêm a mecânica do vaso sanguíneo e resposta vasoativa. A migração dessas células, para auxílio na regeneração, comumente ocorre durante o desenvolvimento vascular em resposta à lesão vascular. No entanto, pouco se sabe sobre essa estratégia para auxiliar na regeneração dos vasos sanguíneos (Jia *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2020). A camada adventícia é a mais externa dos vasos sanguíneos, composta por fibroblastos e feixes de colágeno e auxilia na prevenção da expansão dos vasos acima do estresse fisiológico e no suporte mecânico (Jia *et al.*, 2020).

Na engenharia de tecidos vasculares, o objetivo inicial para o reparo dos vasos sanguíneos é o estabelecimento da camada endotelial, sendo essa, crucial para o sucesso do enxerto vascular (Zheng *et al.*, 2016). Ainda, a camada endotelial é responsável pela homeostase e é um meio importante para prevenir eventos trombóticos após a implantação do enxerto vascular. Para obter a regeneração endotelial desejada, os biomateriais devem favorecer o desenvolvimento de células endoteliais sobre os biomateriais (Tan *et al.*, 2020).

As HUVECs estão sendo bastante utilizadas na engenharia de tecidos vasculares em modelos *in vitro*. Elas possuem características como baixa imunogenicidade e expressam muitos biomarcadores endoteliais importantes (Zhang *et al.*, 2021). Assim, elas são utilizadas como modelo celular, sendo importantes para avaliação em doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Zhou *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2016).

3 HIPÓTESES

A associação de um polímero sintético a um natural, componente da matriz extracelular, pode auxiliar no aumento da adesão celular e viabilidade celular. Enquanto isso, os polímeros sintéticos possuem ótimas propriedades mecânicas. A aplicação de células endoteliais de veia umbilical humana sobre esse biomaterial irá auxiliar na endotelização do vaso sanguíneo e, assim, na regeneração tecidual, quando o mesmo for utilizado como enxerto vascular.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver um biomaterial a partir de PCL e colágeno extraído pele de tilápia para utilização como enxerto vascular em doenças arteriais periféricas.

4.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um biomaterial de PCL pela técnica de *electrospinning*;
- b) Desenvolver dois biomateriais de PCL e colágeno, em diferentes proporções, pela técnica de *electrospinning*;
- c) Desenvolver um biomaterial de PCL e, após sua produção, funcionalizar sua superfície com colágeno;
- d) Avaliar as características morfológicas e físico-químicas dos biomateriais produzidos;
- e) Realizar o cultivo *in vitro* de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) sobre os biomateriais desenvolvidos;
- f) Avaliar as propriedades biológicas dos biomateriais desenvolvidos em termos de adesão, viabilidade e morfologia celular.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Produção das soluções poliméricas e dos biomateriais

Quatro grupos de *scaffolds* foram desenvolvidos, utilizando a técnica de *electrospinning*. Inicialmente, foi desenvolvida uma solução de PCL (90 000 g mol⁻¹, Sigma- Aldrich). A PCL foi dissolvida em metanol:clorofórmio 50:50, de forma a se obter uma concentração final de 6%. A solução de colágeno foi obtida pela dissolução deste polímero em 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFIP), de forma a se obter uma concentração final de 5%. Para o desenvolvimento do primeiro grupo de biomateriais, a solução de PCL foi acondicionada ao equipamento de *electrospinning*. Para obtenção das blendas poliméricas, as soluções de PCL e colágeno (Col) foram misturadas em diferentes proporções, de forma a se obter blendas de PCL/Col nas proporções 50:50 e 25:75. A técnica de *electrospinning* foi conduzida com as soluções de PCL, PCL/Col 50:50 e PCL/Col 25:75. Um quarto grupo de biomateriais foi desenvolvido a partir dos *scaffolds* produzidos apenas com PCL. Para isso, após a produção, os *scaffolds* foram funcionalizados com colágeno (20 µg/mL), pelo método de imersão, por 1 hora. Os parâmetros utilizados para a eletrofiação foram padronizados de maneira a se obter biomateriais compostos por fibras homogêneas e lisas. Os *scaffolds* foram depositados em lamínulas de vidro de diâmetro de 13 mm, dispostas sobre a placa coletora e, após sua produção, foram esterilizados com luz ultravioleta por 1 hora, em capela de fluxo laminar. Foram avaliados quatro grupos de biomateriais desenvolvidos por *electrospinning*: biomateriais de PCL (PCL), biomateriais de PCL funcionalizados com colágeno (PCL/Func) e biomateriais de PCL associados ao colágeno em duas proporções diferentes, 50/50 (PCL/Col 50:50) e 25/75 (PCL/Col 25:75).

5.2 Caracterização físico-química dos biomateriais

5.2.1 Morfologia dos biomateriais e diâmetro de fibras

A morfologia dos biomateriais produzidos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, as amostras foram metalizadas com ouro e a tensão de aceleração utilizada foi de 10 kV. A partir das imagens obtidas por MEV,

o diâmetro das fibras foi determinado pelo *software* Image J[®]. Foram analisadas trinta fibras de cada amostra, obtidas em dias diferentes (n=3).

5.2.2 Propriedades mecânicas dos biomateriais

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram analisadas através do ensaio de tensão-deformação, pelo equipamento de análise dinâmico-mecânica (DMA), a partir do qual foram determinados o módulo de elasticidade e a tensão máxima. As análises foram realizadas no equipamento DMA Controlled Force – Tension: Film (2980 DMA V1.7B), com rampa de força de 0,5 N/min, com carga máxima de 15 N.

5.2.3 Ângulo de contato

A hidrofiliicidade/hidrofobicidade dos biomateriais foi determinada pela análise do ângulo de contato. Para isso, 3 µL de água destilada foram adicionados na superfície das amostras e o ângulo de contato foi medido usando o *software* SurfTens 4.5. (Phoenix Mini 1100) (n=3).

5.2.4 Infravermelho

A presença dos grupos funcionais do colágeno e da PCL nos grupos de biomateriais produzidos foi analisada na região na faixa de 4000 e 400 cm⁻¹ em um espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Spectrum 1000, PerkinElmer), com média de 32 varreduras em uma resolução de 4 cm⁻¹. Todas as amostras foram misturadas com brometo de potássio (KBr) (SigmaAldrich, EUA) e prensadas em forma de disco. Os polímeros, colágeno e PCL, foram utilizados como controles da técnica para comparação dos espectros.

5.3 Caracterização biológica

Os biomateriais foram caracterizados biologicamente através da sua interação com as HUVECs, (Lonza C2519AS) em termos de adesão, viabilidade e morfologia celular. Como grupo controle foram utilizados poços tratados colágeno tipo I (5 µg cm²). Para a caracterização biológica, os *scaffolds* foram fixados em placas de 24 poços. As HUVECs foram semeadas sobre os biomateriais em uma densidade de 5

x 10⁵ células/amostra. Em seguida, os biomateriais semeados foram cultivados em meio de crescimento endotelial (EGM2) (Lonza), a 37°C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

5.3.1 Adesão celular

Após 24 horas de cultivo celular, o meio de cultura foi removido e as amostras lavadas com PBS (do inglês *Phosphate buffer solution*). As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 30 minutos e seus núcleos marcados com dicloridrato de 4,5- diamidino-2-fenilindole (DAPI) (Sigma Aldrich). Após, nove campos aleatórios de cada amostra foram observados em microscópio de fluorescência (LEICA Dmi8), na magnificação de 200X. Os núcleos celulares marcados foram quantificados através do software LAS X, onde foi possível estimar o número de células aderidas/ amostra (n=3).

5.3.2 Viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade celular, as células foram cultivadas durante 1, 3 e 7 dias e analisadas através do reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich) (n=3). Nos tempos determinados, o meio de cultura foi removido, a solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada e as amostras foram incubadas por duas horas, a 37° C. Transcorrido esse tempo, a solução reagente foi retirada e em seguida foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais de formazan. As amostras foram então analisadas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda em 570 e 630 nm.

5.3.3 Morfologia celular

Após 1, 3 e 7 dias de cultivo, as HUVECs foram analisadas em relação à sua morfologia. Para isso, o núcleo das células foi marcado com DAPI, conforme descrito anteriormente, e o citoesqueleto, com faloidina (Sigma Aldrich). Para a realização dessa marcação, as amostras foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1%, por 10 minutos. Após, as amostras foram deixadas em contato com faloidina-rodamina (50 µg/mL) (Sigma Aldrich) por 40 minutos e então, lavadas com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência (LEICA Dmi8), na magnificação de 200X.

5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios foram analisados através da média \pm desvio padrão e o estudo de simetria de suas distribuições serão analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk. Para avaliar o diâmetro das fibras e a adesão celular dos biomateriais, os grupos foram comparados usando o teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. Para avaliar a viabilidade celular e o ângulo de contato dos biomateriais, os grupos foram comparados pelo teste de ANOVA seguido de Tukey. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5. O nível de significância de $P < 0,05$ foi utilizado como critério para análise de diferença estatística.

REFERÊNCIAS

Abdollahi, Sara; Bektor, Joseph; Hibino, Narutoshi. Bioprinting of freestanding vascular grafts and the regulatory considerations for additively manufactured vascular prostheses. **Translational Research**, v. 211, p. 123-138, Set 2019.

Aslani, Saba *et al.* Vascular tissue engineering: Fabrication and characterization of acetylsalicylic acid-loaded electrospun scaffolds coated with amniotic membrane lysate. **Journal of Cellular Physiology**, 234, p. 1608-16096, Feb 2019.

Bi, Chunhuan *et al.* Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of *tilapia* skin collagen. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 2, p. 234-240, Ago 2019.

Boudriot, Ulrich *et al.* Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering—A Brief Overview. **Artificial Organs**, v. 30, n. 10, p. 785-792, 2006.

Braghirolli, Daikelly *et al.* Electrospun scaffolds functionalized with heparin and vascular endothelial growth factor increase the proliferation of endothelial progenitor cells. **Biomedical Materials**, v. 12, n. 2, p. 025003, Mar 2017.

Braghirolli, Daikelly; Steffens, Daniela; Pranke, Patricia. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 6, p. 743-753, Jun 2014.

Buso, Giacomo *et al.* In postmenopausal women, lower limb peripheral arterial disease, assessed by ankle-brachial index, may be a strong predictor of cardiovascular risk. **European Journal of Internal Medicine**, Fev 2022.

Carrabba, Michele; Madeddu, Paolo. Current Strategies for the Manufacture of Small Size Tissue Engineering Vascular Grafts. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 41, Abril 2018.

Chang, Ting *et al.* 3D PCL/collagen nanofibrous medical dressing for one-time treatment of diabetic foot ulcers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 214, p. 112480, Mar 2022.

Choi, Minji *et al.* Fibroblast cell derived extracellular matrix containing electrospun scaffold as a hybrid biomaterial to promote in vitro endothelial cell expansion and functionalization. **Materials Science & Engineering C**, v. 120, p. 111659, Out 2021.

Copes, Francesco *et al.* Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 166, Jul 2019.

Costa, Bruno *et al.* Use of Tilapia Skin as a Xenograft for Pediatric Burn Treatment: A Case Report. **Burn Care & Research**, v. 40, n. 5, p. 714-717, Out 2019.

Cui, Haitao *et al.* 3D bioprinting for cardiovascular regeneration and Pharmacology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, p. 252-269, Jul 2018.

Cunnane, Eoghan M. *et al.* Future Perspectives on the Role of Stem Cells and Extracellular Vesicles in Vascular Tissue Regeneration. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, p. 86, Jul 2018.

DARGAVILLE, Bronwin L. *et al.* Electrospinning and crosslinking of low-molecular-weight poly(trimethylene carbonate-co-L-lactide) as an elastomeric scaffold for vascular engineering. **Acta Biomaterialia**, 9, p. 6885-6897, 2013.

Dien, Nele *et al.* Development of photo-crosslinkable collagen hydrogel building blocks for vascular tissue engineering applications: A superior alternative to methacrylated gelatin?. **Materials Science & Engineering C**, v. 130, p. 112460, Set 2021.

Ding, May-Hui *et al.* THE ROLE OF ANGIOGENIC INDUCING MICRORNAS IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING. **Tissue Engineering Part A**, v. 26, n. 23-24, Dez 2020.

Dou, Jie *et al.* PCL/sulfonated keratin mats for vascular tissue engineering scaffold with potential of catalytic nitric oxide generation. **Materials Science & Engineering C**, v. 107, p. 110246, Out 2019.

Eid, Mark; Mehta, Kunal; Goodney, Philip. Epidemiology of peripheral artery disease. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 34, p. 38-46, 2021.

Ercolani, Enrico; Gaudio, Costantino; Bianco, Alessandra. Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, p. 861-888, Jan 2015.

Fawal, Gomma *et al.* Fabrication of scaffold based on gelatin and polycaprolactone (PCL) for wound dressing application. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102501, Mar 2021.

Fernandez-Colino, Alicia *et al.* Fibrosis in tissue engineering and regenerative medicine: treat or trigger? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 146, p. 17-36, Jun 2019.

Gao, Jingchen *et al.* The grafts modified by heparinization and catalytic nitric oxide generation used for vascular implantation in rats. **Regenerative Biomaterials**, 5, n. 2, p. 105-114, Mar 2018.

Gerhard-Herman *et al.* A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. **Circulation**, v. 135, p. e686-e725, 2017.

Gupta, Prerak *et al.* Bioresorbable silk grafts for small diameter vascular tissue engineering applications: In vitro and in vivo functional analysis. **Acta Biomaterialia**, v. 105, p. 146-158, Jan 2020.

Hayat, Uzma *et al.* Biodegradable polymeric conduits: Platform materials for guided nerve regeneration and vascular tissue engineering. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 67, p. 103014, 2022.

Jia, Weibin *et al.* Design and comprehensive assessment of a biomimetic tri-layer tubular scaffold via biodegradable polymers for vascular tissue engineering applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 110, p. 110717, Feb 2020.

Jia, Weibin *et al.* Fabrication and assessment of chondroitin sulfate-modified collagen nanofibers for small-diameter vascular tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 257, p. 117573, Jan 2021.

Jin, Qianheng *et al.* Nanofiber electrospinning combined with rotary bioprinting for fabricating small-diameter vessels with endothelium and smooth muscle. **Composites Part B**, v. 234, p. 109691, Jan 2022.

Joshi, Akshat *et al.* Co-culture of mesenchymal stem cells and human umbilical vein endothelial cells on heparinized polycaprolactone/gelatin co-spun nanofibers for improved endothelium remodeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 186-192, Feb 2020.

Junior, Edmar *et al.* Pediatric Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft for Superficial Partial-Thickness Wounds: A Pilot Study. **Burn Care & Research**, v. 14, n. 2, Abril 2020.

Kang, Lingzhi *et al.* Hyaluronic acid oligosaccharide-modified collagen nanofibers as vascular tissue-engineered scaffold for promoting endothelial cell proliferation. **Carbohydrate Polymers**, v. 223, p. 115106, Jul 2019.

Kayama, Takafumi *et al.* A Pilot Study Investigating the Use of Regional Oxygen Saturation as a Predictor of Ischemic Wound Healing Outcome after Endovascular Treatment in Patients with Chronic Limb-Threatening Ischemia. **Ann Vascular Disc**, v. 14, n. 1, p. 23-30, Mar 2021.

Kim, Ran; Choi, Sun; Kim, Yeo. The Efficacy of Cone-Beam CT-Based Perfusion Mapping in Evaluation of Tissue Perfusion in Peripheral Arterial Disease. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, p. 947, Mar 2021.

Lan, Xingzi *et al.* Multidrug-loaded electrospun micro/nanofibrous membranes: Fabrication strategies, release behaviors and applications in regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, v. 330, p. 1264-1287, Nov 2021.

Leal, Bruna *et al.* Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, p. 592361, Jan 2021.

Lecouturier, Jan *et al.* Peripheral arterial disease diagnosis and management in primary care: a qualitative study. **British Journal of General Practice**, v. 3, n. 3, Ago 2019.

Li, Dan; Xia, Younan. Electrospinning of Nanofibers Reinventing the Wheel? **Advanced Materials**, v. 16, n. 14, Jul 2004.

Li, Pengfei *et al.* Fabrication of PCL/keratin composite scaffolds for vascular tissue engineering with catalytic generation of nitric oxide potential. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 28, p. 6092-6099, Jun 2020.

Liu, Songtao; Li, Ping; Hai, Su. Four-Limb Blood Pressure Measurement with an Oscillometric Device: a Tool for Diagnosing Peripheral Vascular Disease. **Current Hypertension Reports**, v. 21, n. 15, 2019.

Machin, M *et al.*, Systematic review of inframalleolar endovascular interventions and rates of limb salvage, wound healing, restenosis, rest pain, reintervention and complications. **Vascular**, v. 30, n. 1, p. 105-114, Feb 2022.

Maina, Renee *et al.* Generating vascular conduits: from tissue engineering to three-dimensional bioprinting. **Innov Surg Sci**, v. 3, n. 3, p. 203-213, Jul 2018.

Maurmann, Natasha; Sperling, Laura-Elena; Pranke, Patricia. Electrospun and Electrospayed Scaffolds for Tissue Engineering. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1078, p. 79-100, 2018.

Miranda-Buendia, E *et al.* Activity patterns of cardiomyocytes in electrospun scaffolds of poly (-caprolactone), collagen, and epicatechin. **Materials Today Communications**, v. 31, p. 103405, Mar 2022.

Mohammadalizadeh, Zahra; Bahremandi-Toloue, Elahe; Karbasi, Saeed. Recent advances in modification strategies of pre- and post-electrospinning of nanofiber scaffolds in tissue engineering. **Reactive and Functional Polymers**, v. 172, p. 105202, Jan 2022.

Mostafavi, Azadeh *et al.* Highly tough and ultrafast self-healable dual physically crosslinked sulfated alginate-based polyurethane elastomers for vascular tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 257, p. 117632, Jan 2021.

Norouzi, Sara; Shamloo, Amir. Bilayered heparinized vascular graft fabricated by combining electrospinning and freeze drying methods. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, p. 1067-1076, Jan 2019.

Noble, Christopher *et al.* Patient Specific Characterization of Artery and Plaque Material Properties in Peripheral Artery Disease. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 101, p. 103453, Jan 2020.

O'conner, R; Cahill, P; McGuinness, G. Effect of electrospinning parameters on the mechanical and morphological characteristics of small diameter PCL tissue engineered blood vessel scaffolds having distinct micro and nano fibre populations – A DOE approach. **Polymer Testing**, v. 96, p. 107119, Feb 2021.

Pandiyaraj, K *et al.* Non-thermal plasma jet-assisted development of phosphorus-containing functional coatings on 3D-printed PCL scaffolds intended for bone tissue

engineering. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 154, p. 110025, Mar 2021.

Qin, Kang *et al.* Hyaluronan promotes the regeneration of vascular smooth muscle with potent contractile function in rapidly biodegradable vascular grafts. **Biomaterials**, v. 257, p. 120226, Jul 2020.

Qiu, Yan-Ling *et al.* Characterization of different biodegradable scaffolds in tissue engineering. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 5, p. 4043-4056, Mar 2019.

Raczeck, Paul *et al.* Diagnostic Performance of a Lower-dose Contrast-Enhanced 4D Dynamic MR Angiography of the Lower Extremities at 3 T Using Multisegmental Time-Resolved Maximum Intensity Projections. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 53, n. 3, p. 763-774, Set 2021.

Rahmati, Maryam *et al.* Electrospinning for tissue engineering applications. **Progress in Material Science**, v. 117, p. 100721, Abril 2021.

Saenz-Pipaon, Goren *et al.* Lipocalin-2 and Calprotectin Potential Prognosis Biomarkers in Peripheral Arterial Disease. **European Journal of Vascular & Endovascular Surgery**, Jan 2022.

Sharma, Shubham *et al.* Collagen-based formulations for wound healing: A literature review. **Life Sciences**, v. 290, p. 120096, Out 2022.

Sohn, Sung *et al.* Evaluation of 3D Templated Synthetic Vascular Graft Compared with Standard Graft in a Rat Model: Potential Use as an Artificial Vascular Graft in Cardiovascular Disease. **Materials**, v. 14, p. 1239, Mar 2021.

Stapenhorst, Fernanda *et al.* Bioprinting: A promising approach for tissue regeneration. **Bioprinting**, v. 22, p. e00130, Fev 2021.

Steffens, Daniela *et al.* Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 8, p. 1474-1488, Aug 2018.

Tan, Juanjuan; Bai, Jing; Yan Zhiqiang. An Aligned Patterned Biomimetic Elastic Membrane Has a Potential as Vascular Tissue Engineering Material. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 704, Jun 2020.

Tu, Chengyi *et al.* Nanoscale Strategies: Treatment for Peripheral Vascular Disease and Critical Limb Ischemia. **ACS Nano**, v. 9, n. 4, p. 3436-3452, 2015.

Vacanti, C *et al.* Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 88, p. 753-759, Nov 1991.

Verde, Maria *et al.* Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. **Acta Histochemica**, v. 123, p. 151762, Jul 2021.

Wang, Zhen *et al.* Vascular endothelial cells mediated the indirect effect of mPEG-PCL copolymers on blood coagulation. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 39, p. 100326, Out 2020.

Weekes, Angus *et al.* Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 138, p. 92-111, Nov 2022.

Wei, Yongzhen *et al.* Tissue-engineered vascular grafts and regeneration mechanisms. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 165, p. 40-53, Dez 2021.

Zavan, Barbara *et al.* Electrospun PCL-Based Vascular Grafts: In Vitro Tests. **Nanomaterials**, v. 11, p. 751, Mar 2021.

Zhang, Fan *et al.* Engineering small-caliber vascular grafts from collagen filaments and nanofibers with comparable mechanical properties to native vessels. **Biofabrication**, v. 11, p. 035020, Mai 2019.

Zhang, Fan *et al.* A hybrid vascular graft harnessing the superior mechanical properties of synthetic fibers and the biological performance of collagen filaments. **Materials Science & Engineering C**, v. 118, p. 111418, Ago 2020.

Zhang, Yanli *et al.* Effects of carbon-based nanomaterials on vascular endothelia under physiological and pathological conditions: interactions, mechanisms and potential therapeutic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 330, p. 945-962, 2021.

Zhao, Chen *et al.* Dynamic Multiscale Regulation of Perfusion Recovery in Experimental Peripheral Arterial Disease: A Mechanistic Computational Model. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 7, n. 1, p. 28-50, Jan 2022.

Zheng, Yuanyuan *et al.* Vitreous Cryopreservation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells with Low Concentration of Cryoprotective Agents for Vascular Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part C**, v. 22, n. 10, p. 964-973, Nov 2016.

Zhou, Fei *et al.* Stachydrine promotes angiogenesis by regulating the VEGFR2/MEK/ERK and mitochondrial-mediated apoptosis signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110724, Set 2020.



Vascular Tissue Engineering: Polymers and Methodologies for Small Caliber Vascular Grafts

Bruna B. J. Leal^{1,2†}, Naohiro Wakabayashi^{3†}, Kyohei Oyama³, Hiroyuki Kamiya³, Daikelly I. Braghirolli¹ and Patricia Pranke^{1,2,*}

¹Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil, ²Post-graduate Program in Physiology, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil, ³Division of Cardiac Surgery, Department of Medicine, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan, ⁴Stem Cell Research Institute, Porto Alegre, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrea Caporali,
University of Edinburgh,
United Kingdom

Reviewed by:

Junxi Wu,
University of Strathclyde,
United Kingdom
Michele Carrabba,
University of Bristol, United Kingdom

*Correspondence:

Patricia Pranke
patriciapranke@ufrgs.br

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Cardiovascular Biologics and
Regenerative Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 06 August 2020

Accepted: 09 December 2020

Published: 11 January 2021

Citation:

Leal BBJ, Wakabayashi N, Oyama K,
Kamiya H, Braghirolli DI and Pranke P
(2021) Vascular Tissue Engineering:
Polymers and Methodologies for
Small Caliber Vascular Grafts.
Front. Cardiovasc. Med. 7:592361.
doi: 10.3389/fcvm.2020.592361

Cardiovascular disease is the most common cause of death in the world. In severe cases, replacement or revascularization using vascular grafts are the treatment options. While several synthetic vascular grafts are clinically used with common approval for medium to large-caliber vessels, autologous vascular grafts are the only options clinically approved for small-caliber revascularizations. Autologous grafts have, however, some limitations in quantity and quality, and cause an invasiveness to patients when harvested. Therefore, the development of small-caliber synthetic vascular grafts (<5 mm) has been urged. Since small-caliber synthetic grafts made from the same materials as middle and large-caliber grafts have poor patency rates due to thrombus formation and intimal hyperplasia within the graft, newly innovative methodologies with vascular tissue engineering such as electrospinning, decellularization, lyophilization, and 3D printing, and novel polymers have been developed. This review article represents topics on the methodologies used in the development of scaffold-based vascular grafts and the polymers used *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: vascular tissue engineering, cardiovascular disease, vascular graft, electrospinning, polymers

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is a group of diseases related to the heart and vasculature including coronary, cerebral, and peripheral artery disease (1, 2), and was responsible for 15.2 million deaths in 2016 according to the World Health Organization, being the major cause of death throughout the world (3). Atherosclerosis is the most common predisposition of CVD and the damage to blood vessels can provoke morphological changes such as stenosis, occlusion, or dilation, causing malperfusion of end-organs or rupture of vascular walls (4, 5). Despite pharmacotherapy using vasodilators or anticoagulants being the first-line treatment for symptomatic patients, surgical repair is an indispensable treatment option in patients with advanced diseases, and replacement or bypass of diseased vessels with vascular grafts is generally performed regardless of the pathological or anatomical categories above (6).

Middle and Large-Caliber Grafts

Because of the absence of alternative autologous grafts and an adequate patency rate, large-caliber (10–30 mm) synthetic grafts have predominantly been developed. Bakey reported the