



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA

**“ESTUDO DOS MÉTODOS MECÂNICOS ENVOLVIDOS
NA DECELULARIZAÇÃO DO CORAÇÃO”**

ANA PAULA MACEDO DE SOUZA BRANDÃO

Belo Horizonte, 02 de Junho de 2016

Ana Paula Macedo de Souza Brandão

**“ESTUDO DOS MÉTODOS MECÂNICOS ENVOLVIDOS NA
DECELULARIZAÇÃO DO CORAÇÃO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Estevam Barbosa de Las Casas

Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Dra. Rosana de Carvalho Cruz

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2016

B817e

Brandão, Ana Paula Macedo de Souza.

Estudo dos métodos mecânicos envolvidos na decelularização do coração [manuscrito] / Ana Paula Macedo de Souza Brandão. - 2016. 102 f., enc.: il.

Orientador: Estevam Barbosa de Las Casas.
Coorientadora: Rosana de Carvalho Cruz.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Anexos: f.94-102.

Bibliografia: f. 79-93.

1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Bioengenharia - Teses. 3. Matriz extracelular - Teses. 4. Eletrodos - Teses. I. Las Casas, Estevam Barbosa de. II. Cruz, Rosana de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 621(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA MECÂNICA

Av. Antônio Carlos, 6627 - Campus Universitário
31270-901 - Belo Horizonte - MG
Tel.: +55 31 3409.5145
E-mail: cpgmec@demec.ufmg.br

**"ESTUDO DOS MÉTODOS MECÂNICOS ENVOLVIDOS NA
DECELULARIZAÇÃO DO CORAÇÃO"**

ANA PAULA MACEDO DE SOUZA BRANDÃO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de "**Mestre em Engenharia Mecânica**", na área de concentração de "**Bioengenharia**".

Dissertação aprovada no dia 02 de junho de 2016.

Por:

Dr. Estevam Barbosa de las Casas
Orientador - Departamento de Engenharia de Estruturas/UFMG

Dra. Rosana de Carvalho Cruz
Coorientadora - Pesquisadora do Laboratório de Bioengenharia/UFMG

Dr. Gregory Thomas Kitten
Instituto de Ciências Biológicas/UFMG

Dr. Rodrigo Lambert Orefice
Departamento de Eng. Metalúrgica e de Materiais/UFMG

Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva
Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer/CTI

Dedico este trabalho à memória do Prof. Marcos Pinotti, mais do que um orientador, uma inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser esperança em minha vida.

Ao meu marido Daniel, meu porto seguro, pela compreensão durante o tempo que estivemos separados, pelo apoio para que eu continuasse sempre em frente e pela parceria, na alegria e na tristeza.

Aos meus pais e meu irmão Bruno, pelo amor incondicional, pela luta sem fim para que eu pudesse chegar até a Universidade e me tornasse uma pessoa melhor e por sempre acreditarem em mim mesmo quando eu mesma não acreditava.

À minha sogra Priscila, que por um bom tempo foi minha conselheira e cuidou de mim tão bem.

À minha família e a família do Daniel por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao Jonathas, Isabela, Rodrigo e Filipe pela companhia nos experimentos, pela troca de conhecimentos e por toda a ajuda durante este projeto.

À Rosana e Betânia, por todo o conhecimento transmitido, pelas correções, conselhos e contatos compartilhados.

À Marina, do PPGMEG, pela sua simpatia e disposição em ajudar desde o primeiro dia e ao professor Ramon Molina que se dispôs a arcar com os custos para que o trabalho pudesse ser finalizado.

Ao professor Estevam, que me recebeu de braços abertos em sua equipe e foi essencial para que este trabalho fosse concluído com sucesso.

Aos colegas do LabBio, que escutaram pacientemente um pouco dos meus lamentos e tornaram meus dias no laboratório mais agradáveis. Em especial, ao Artur que estava sempre pronto para responder todas as minhas perguntas e a Suelen, Camila e Carla, pela amizade e por todas as risadas.

À Cida, pela amizade e por tentar que tudo fosse um pouquinho mais fácil.

A todos os meus amigos, que de alguma forma participaram da minha vida neste tempo e contribuíram para que tudo fosse mais leve.

À Sandra Fernandes pelo incentivo e por me socorrer com reagentes e materiais.

À Granja Ave Nova, em especial, à Lorena que sempre disponibilizou os corações pontualmente e da forma como solicitado.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, pela compreensão e pelo trabalho de qualidade.

Ao Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro e às professoras coordenadoras, Patrícia Cisalpino e Danielle Souza, por disponibilizar os equipamentos e infraestrutura necessária para a realização deste trabalho. Em especial, aos alunos Patrícia Campi, Lucas, Raquel Duque, Camila e Zélia por toda a ajuda.

À professora Denise Carmona do ICB, pela sua disposição em me ajudar e por disponibilizar o microscópio ótico para realização das imagens.

Ao professor Gregory Kitten do ICB, pela disponibilidade, interesse e por todas as discussões acerca deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Meus sinceros agradecimentos.

“ A criatividade em todos os campos, e também no campo da medicina, é e será a grande arma que diferencia as pessoas medíocres daquelas que são úteis à humanidade. O ser humano dotado de criatividade é capaz de romper barreiras, abandonar o óbvio e gerar novos conceitos que, muitas vezes, mudam o curso dos acontecimentos. ”

Domingo Marcolino Braile

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	12
LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	14
RESUMO.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. O coração.....	21
3.2. A insuficiência cardíaca e as alternativas para substituição do coração doente.....	22
3.3. Engenharia de tecidos.....	25
3.3.1. Matriz Extracelular.....	28
3.3.2. A engenharia de tecidos para fabricação de órgãos bioartificiais.....	30
3.4. Decelularização.....	31
3.4.1. Métodos de decelularização.....	32
3.4.2. Decelularização de coração.....	35
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. Esquema metodológico.....	38
4.2. Obtenção do órgão.....	39
4.3. Modificação do protocolo de perfusão descrito na literatura.....	39
4.3.1. Protocolo inicial.....	39
4.3.2. Testes-piloto utilizando perfusão e imersão com agitação.....	40
4.3.3. Estabelecimento do protocolo de testes com modificações.....	40
4.4. Teste do método mecânico de perfusão utilizando protocolo modificado.....	41
4.5. Teste do método de decelularização por imersão com agitação utilizando protocolo modificado.....	42

4.6. Teste dos métodos de perfusão e imersão com agitação combinados com eletrodos.....	43
4.7. Avaliação da eficiência dos métodos de decelularização testados, por meio de análises microscópicas, teste mecânico e biologia molecular.....	45
4.7.1. Análises microscópicas.....	45
4.7.1.1. Microscopia ótica.....	45
4.7.1.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	46
4.7.2. Teste mecânico – Teste do balão de látex.....	48
4.7.3. Análise de biologia molecular – Quantificação de RNA.....	48
4.8. Análises Estatísticas.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Modificação do protocolo de perfusão descrito na literatura.....	51
5.1.1. Testes-piloto.....	51
5.1.1.1. Testes-piloto com o método de perfusão.....	51
5.1.1.2. Testes-piloto com o método de imersão com agitação.....	53
5.2. Teste do método mecânico de perfusão utilizando protocolo modificado.....	54
5.3. Teste do método de decelularização por imersão com agitação utilizando protocolo modificado.....	55
5.4. Teste dos métodos de perfusão e imersão com agitação combinados com eletrodos.....	57
5.5. Avaliação da eficiência dos métodos de decelularização testados, por meio de análises microscópicas, teste mecânico e biologia molecular.....	60
5.5.1. Análises microscópicas.....	60
5.5.1.1. Microscopia ótica.....	60
5.5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	64
5.5.2. Teste mecânico – Teste do balão de látex.....	69
5.5.3. Análise de biologia molecular – Quantificação de RNA.....	72
5.6. Resumo dos resultados.....	73
6. CONCLUSÕES.....	74
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
ABSTRACT.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXO A.....	94
ANEXO B.....	95

ANEXO C.....	96
ANEXO D.....	100
ANEXO E.....	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1. A estrutura do coração.....	22
FIGURA 3.2. As diferenças entre o coração das aves e dos mamíferos.....	22
FIGURA 3.3. Quantidade estimada de transplantes necessários no Brasil comparada com o número de transplantes realizados em 2015.....	24
FIGURA 3.4. Biomateriais.....	27
FIGURA 3.5. Estrutura básica da matriz extracelular.....	28
FIGURA 3.6. Exemplos de órgãos de rato, antes e depois da decelularização.....	32
FIGURA 3.7. Ilustração do processo de decelularização por perfusão em coração de porco.....	36
FIGURA 3.8. Ilustração do processo de decelularização por perfusão e recelularização em coração de rato.....	37
FIGURA 3.9. Transplante heterotópico de coração de rato.....	37
FIGURA 4. 1. Esquema metodológico deste trabalho.....	38
FIGURA 4. 2. Estrutura montada para realização da perfusão.....	42
FIGURA 4.3. Estrutura para realização do processo de imersão com agitação.....	43
FIGURA 4.4. Inclusão de eletrodos no método de decelularização por perfusão.....	44
FIGURA 4.5. Inclusão de eletrodos no método de decelularização por imersão com agitação.....	45
FIGURA 4.6. Esquema simplificado da metodologia utilizada no preparo das lâminas para análises de microscopia óptica.....	46
FIGURA 4.7. Esquema simplificado da metodologia utilizada no preparo dos stubs para análises de microscopia eletrônica de varredura.....	47
FIGURA 4.8. Esquema da estrutura utilizada para realização do teste do balão.....	48
FIGURA 4.9. Esquema simplificado da metodologia utilizada para quantificação de RNA..	49
FIGURA 5.1. Teste-piloto de perfusão à temperatura ambiente.....	52
FIGURA 5.2. Teste-piloto de imersão com agitação à temperatura ambiente.....	53
FIGURA 5.3. Imagens do coração antes e depois do tratamento com o método perfusão...	55

FIGURA 5.4. Imagens do coração antes e depois do tratamento com o método de imersão com agitação.....	56
FIGURA 5.5. Detalhe do ventrículo esquerdo após imersão com agitação.	56
FIGURA 5.6. Depósito de material no eletrodo positivo.....	58
FIGURA 5.7. Imagens do coração antes e depois do tratamento de perfusão com adição do eletrodo.....	58
FIGURA 5.8. Imagens do coração antes e depois do tratamento de imersão com agitação e adição do eletrodo.....	59
FIGURA 5.9. Fotomicrografias dos ventrículos esquerdos dos corações controle e tratados corados com hematoxilina e eosina.....	61
FIGURA 5.10. Fotomicrografias de vasos sanguíneos presentes no ventrículo esquerdo dos corações controle e perfundidos, corados com hematoxilina e eosina.....	63
FIGURA 5.11. Fotomicrografias da aorta dos corações controle e tratados, corados com hematoxilina e eosina.....	64
FIGURA 5.12. Eletromicrografias do ventrículo esquerdo de corações controle e tratados (miocárdio)	66
FIGURA 5.13. Eletromicrografias de corações controle e tratados (epicárdio)	67
FIGURA 5.14. Eletromicrografias de vasos sanguíneos presentes no ventrículo esquerdo dos corações controle e perfundidos.....	68

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 5.1. Teste do balão de látex.....	70
---	----

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA. 5.1. Quantificação de RNA nos corações controle e tratados.....	72
TABELA 1. Valores das massas dos corações, medidos antes (massa inicial) e depois (massa final) dos tratamentos, para cálculo da porcentagem de redução de massa.....	94
TABELA 2. Quantificação de RNA (valores da medição)	95
QUADRO 1. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes volumes utilizados no experimento independente do protocolo.....	96
QUADRO 2. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 0,5 mL.....	97
QUADRO 3. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 1,0 mL.....	97
QUADRO 4. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 1,5 mL.....	98
QUADRO 5. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 2,0 mL.....	98
QUADRO 6. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 2,5 mL.....	99
QUADRO 7. Análise pareada (teste <i>t</i>) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 3,0 mL.....	99
TABELA 3. Valores de pressão medidos em resposta ao aumento volumétrico do balão de látex inserido no ventrículo esquerdo de corações controle e tratados.....	100
QUADRO 1. Quadro resumo dos métodos e resultados obtidos nos experimentos de imersão com agitação.....	101
QUADRO 2. Quadro resumo dos métodos e resultados obtidos nos experimentos de perfusão.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CAT	Coração Artificial Total
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propano-sulfonato
CO ₂	Gás carbônico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DAV	Dispositivo de Assistência Ventricular
DC	Corrente contínua
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Insuficiência cardíaca
iPSC	Células tronco de pluripotência induzida
kV	Quilovolt
LabBio	Laboratório de Bioengenharia
µL	microlitro
µm	Micrômetros
M	Molar
mbar	milibar
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
MP	Mega Pixels
m/v	Massa por volume
ng	nanogramas
nm	nanômetros
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino
PGA	Poli (ácido glicólico)
PGLA	Poli (ácido glicólico-ácido lático)

PLA	Poli (ácido láctico)
pmp	por milhão de população
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
vs	Versus

RESUMO

A engenharia de tecidos permite a construção de substitutos biológicos para tecidos ou órgãos danificados. Um dos arcabouços utilizados para crescimento de células é a matriz extracelular, que influencia diretamente os processos de adesão, proliferação e diferenciação celular. O processo de decelularização possibilita remover as células do tecido ou órgão, preservando a estrutura e os componentes da matriz extracelular, mantendo a sua geometria e as propriedades mecânicas. Diferentes métodos são utilizados em conjunto para promover a decelularização. O emprego simultâneo de métodos químicos e mecânicos é uma possibilidade para o estabelecimento de protocolos mais eficientes. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos mecânicos, combinados a um método químico, envolvidos na decelularização do coração de galinha. Os métodos mecânicos testados foram perfusão, e imersão com agitação, com ou sem eletrodos. Estes, foram combinados com métodos químicos (lavagens com tampão fosfato salino e dodecil sulfato de sódio). Para avaliar a eficiência dos métodos na remoção das células e manutenção da integridade da matriz extracelular do órgão, foram realizados testes mecânicos com balão de látex, análises microscópicas e moleculares. Os resultados mostraram que a perfusão foi mais eficiente para decelularizar o coração, já que, não foi possível a observação de núcleos celulares na matriz extracelular além de redução na quantidade de RNA total. Além disso, a matriz extracelular permaneceu preservada. Nos processos de imersão com agitação, apesar de grande redução na quantidade de RNA, a decelularização ocorreu apenas externamente. Ambos tratamentos, alteraram a estabilidade mecânica do órgão. A adição dos eletrodos não influenciou na eficiência ou na velocidade do processo, mas parece interagir com os componentes orgânicos removidos do órgão. Não foram encontrados outros trabalhos que reportam o uso de eletrodos (corrente elétrica) como variável para aumentar a eficiência da remoção de restos celulares. Portanto, o uso da força elétrica pode ser promissor, uma vez ajustados os parâmetros de teste. A perfusão é o método mais adequado para a decelularização de órgãos inteiros, densos e complexos, enquanto a imersão com agitação é melhor para tecidos mais delgados. O conhecimento acerca dos parâmetros que influenciam os processos de decelularização, sejam eles químicos ou mecânicos, é de grande importância

para o estabelecimento de um protocolo específico conforme características singulares de cada órgão.

Palavras-chave: matriz extracelular, decelularização, métodos mecânicos, perfusão, imersão com agitação, eletrodos.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de óbito no Brasil (BOCCHI et al., 2009). Em 1955, ocorreu o primeiro transplante de órgão sólido em humanos, marcando uma nova era para pacientes com doenças em fase terminal. No entanto, a inabilidade para monitorar e controlar a rejeição após o transplante, a carência de imunossupressão satisfatória e o número limitado de doadores de órgãos, levaram pesquisadores a buscarem outras alternativas para o transplante, como, terapia gênica, terapias celulares e engenharia de tecidos (MURPHY; ATALA, 2012).

Dentre as alternativas citadas acima, a engenharia de tecidos é promissora para a substituição de órgãos naturais, pois permite a construção e manutenção, *in vitro*, de tecidos e órgãos utilizando-se biomateriais sintéticos ou naturais como substrato para adesão e diferenciação de células (SOTO GUTIERREZ et al. 2010). Entretanto, o uso de uma matriz natural é vantajoso porque matrizes sintéticas são potencialmente imunogênicas e podem sofrer degradação tóxica e desencadear reação inflamatória (WEYMANN et al., 2011).

O processo de decelularização permite preservar a estrutura e os componentes da matriz extracelular com pouco ou nenhum dano (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006), mantendo as propriedades mecânicas e a geometria do órgão, o que influencia diretamente os processos de mitose, quimiotaxia e diferenciação celular, indispensáveis para o sucesso da recelularização, que é a reconstrução do órgão ou tecido por meio da adição de células. (WEYMANN et al., 2011).

Diferentes métodos são utilizados em conjunto para promover a decelularização incluindo processos mecânicos, químicos e enzimáticos. Dentre os processos mecânicos podem ser citados métodos que incluem agitação em solução, perfusão vascular, choque térmico, ultrasonicação e ruptura manual. Dentre os principais métodos químicos para decelularizar tecidos, os mais utilizados estão classificados em categorias como detergentes, solventes, soluções ácidas e alcalinas e soluções iônicas. Os métodos enzimáticos são empregados para quebrar moléculas específicas como DNA, RNA, lipídeos ou proteínas (GILBERT, 2012).

Protocolos de decelularização já foram estabelecidos na literatura, utilizando-se corações de porcos, ratos e até mesmo partes de coração humano, porém ainda existem lacunas no processo. Análises histológicas e quantitativas revelam que a maioria dos protocolos de decelularização até então estabelecidos não são completamente eficazes na remoção de restos celulares e material genético (WEYMANN et al., 2011; METHE et al., 2014; WAINWRIGTH et al., 2010). Logo, métodos mais completos e eficientes são desejáveis no sentido de assegurar a máxima remoção do conteúdo antigênico, que representam uma barreira ao uso dessas matrizes devido ao risco de transmitir doenças e desencadear uma resposta imune, resultando na rejeição do implante (WONG; GRIFFITHS, 2014). O melhor protocolo de decelularização seria aquele que preservasse a composição, propriedades fisiológicas, integridade mecânica da matriz extracelular e a estrutura vascular, além de, seletivamente, eliminar antígenos alogênicos (obtidos de um doador da mesma espécie) e xenogênicos (obtidos de um doador de espécie diferente), tão bem quanto conteúdo celular e nuclear (GALVEZ-MONTÓN et al., 2013).

O emprego simultâneo de métodos de decelularização químicos e mecânicos é uma possibilidade para o estabelecimento de protocolos mais eficazes com relação à remoção de antígenos imunogênicos, uma vez que o processo de lise de membranas celulares promovido pelos métodos químicos precisa ser complementado pela remoção dos restos das células, por meio de forças de arrasto, promovida pelos métodos mecânicos.

Nesse cenário, a realização deste trabalho poderá promover um melhor entendimento dos métodos químicos e mecânicos envolvidos na decelularização e proporcionar o desenvolvimento de um protocolo mais eficiente em relação àqueles já existentes, com o objetivo de aumentar a eficácia na remoção de antígenos, de forma que a matriz extracelular gerada ainda preserve suas propriedades biológicas e mecânicas naturais, e, seja menos reativa imunologicamente. Uma vez padronizados, os métodos poderão ser adaptados para o estabelecimento de protocolos de decelularização para órgãos morfologicamente diferentes. A engenharia de tecidos a partir da decelularização, pode modificar a realidade dos transplantes, sendo uma alternativa mais rápida em relação à fila de transplantes e que poderá beneficiar todas as faixas etárias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes métodos mecânicos, combinados a um método químico, envolvidos na decelularização do coração de galinha.

2.2. Objetivos específicos

- 1)** Modificar o protocolo de perfusão descrito na literatura de modo a permitir o estudo dos processos mecânicos envolvidos na decelularização do coração.
- 2)** Testar os métodos mecânicos de (i) perfusão utilizando protocolo modificado; (ii) de imersão com agitação utilizando protocolo modificado; (iii) de perfusão e imersão com agitação combinados com eletrodos.
- 3)** Avaliar a eficiência dos métodos testados no processo de decelularização, por meio de teste mecânico, análises microscópicas, análises de biologia molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O coração

O coração dos vertebrados tem a função de bombear o sangue através dos vasos para os tecidos e órgãos conforme a necessidade metabólica de cada um. O coração é um órgão contrátil composto principalmente por células musculares estriadas e estruturas fibrosas. Ele é dividido em quatro cavidades: átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito e ventrículo esquerdo. O lado direito está separado do esquerdo por septos, enquanto os átrios estão separados dos ventrículos por válvulas, que impedem o retorno sanguíneo (FIG. 3.1). Estas cavidades são responsáveis por separar totalmente o sangue venoso (sangue não oxigenado e rico em gás carbônico) do arterial (sangue rico em oxigênio). Os átrios possuem paredes mais finas enquanto os ventrículos têm a parede mais grossa devido à sua função de bombear o sangue para o pulmão (direito) ou para o resto do corpo (esquerdo) (TIMBY; SMITH, 2005; KARDONG, 2011).

As paredes do coração são formadas por camadas. A camada mais interna é chamada endocárdio e está em contato direto com o sangue, a camada intermediária, muscular e espessa, é o miocárdio, e a mais externa, o epicárdio, ou também chamada de pericárdio visceral. O pericárdio, é uma membrana que reveste e protege o coração e está dividido em pericárdio seroso e visceral (FIG. 3.1) (TIMBY; SMITH, 2005).

De maneira geral os corações das aves e dos mamíferos são semelhantes, ambos possuem quatro cavidades e não há mistura de sangue arterial e venoso, entretanto existem algumas diferenças morfológicas entre eles. Basicamente, nas aves a aorta está orientada para a direita e o tronco braquiocefálico (artérias derivadas da aorta) é duplo (FIG. 3.2A), enquanto nos mamíferos a aorta está orientada para a esquerda e o tronco braquiocefálico é único (FIG. 3.2B). Esta diferença ocorre devido à necessidade de irrigação dos músculos peitorais, principais responsáveis pelo voo nas aves (SEBBEN et al., 2015).

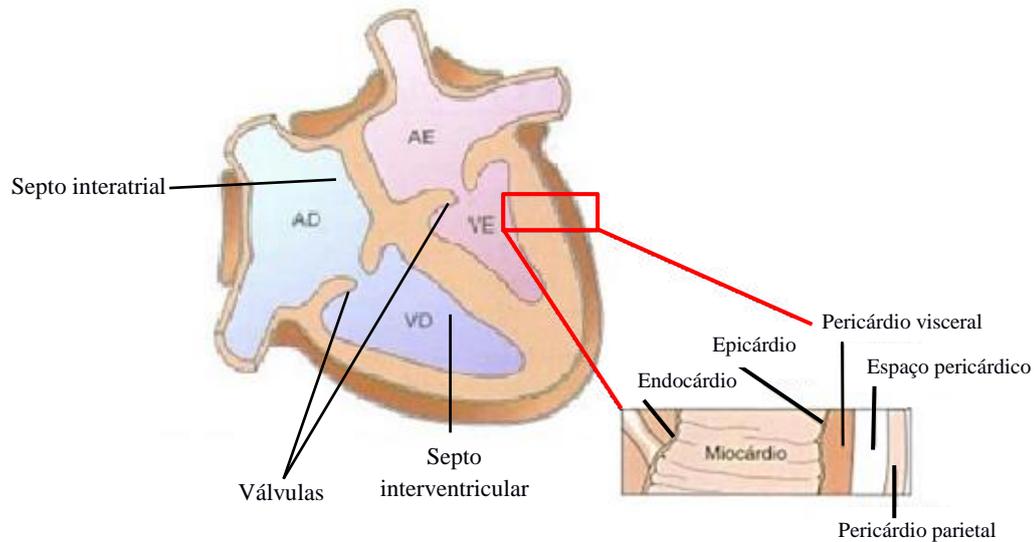


FIGURA 3.1. A estrutura do coração. O coração é dividido em quatro cavidades: AD – Átrio direito; VD – Ventrículo direito; AE - Átrio esquerdo; VE – Ventrículo esquerdo separadas por válvulas e septos. Em destaque as camadas que formam a parede do coração.
 FONTE: Adaptado de Timby e Smith, 2005, p. 388 e 389.

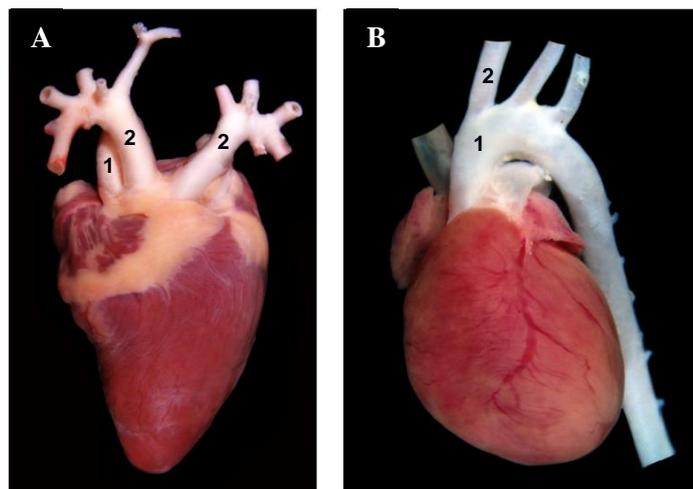


FIGURA 3.2. As diferenças entre o coração das aves e dos mamíferos. (A) Coração de ave (carcará) com (1) aorta orientada para a direita e (2) tronco braquiocefálico duplo bem próximo à raiz da aorta. (B) Coração de mamífero (roedor) com (1) aorta orientada para a esquerda e (2) tronco braquiocefálico único.
 FONTE: SEBBEN et al., 2015, p. 24.

3.2. A insuficiência cardíaca e as alternativas para substituição do coração doente

As doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de óbito no Brasil (BOCCHI et al., 2009) e no mundo (HUNT et al., 2009; BRISTOW; LOWES, 2004). Dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca (IC) leva à

deterioração progressiva do músculo cardíaco e perda da função de bomba dos ventrículos (HUNT et al., 2009).

Nos Estados Unidos, cerca de 550.000 novos casos de IC são diagnosticados, anualmente, sendo a quinta causa mais frequente de hospitalização e a mais comum no idoso (HUNT et al., 2009). No Brasil, embora estimativas tenham sido realizadas (utilizando percentuais populacionais de outros países e extrapolando estes dados para realidade brasileira), não existem estudos epidemiológicos que descrevam a prevalência nacional da IC (ABUHAB, 2012).

No último censo (2010), observou-se crescimento da população idosa no Brasil e, portanto, com potencial crescimento de pacientes em risco ou portadores de IC (BOCCHI et al., 2012). As projeções do IBGE têm como cenário nos próximos 10 anos um incremento de mais de 1,0 milhão de idosos anualmente, devendo atingir aproximadamente 73,5 milhões de indivíduos acima de 60 anos de idade em 2060 (BORGES; CAMPOS; SILVA, 2015), tornando a realidade ainda mais preocupante. Por outro lado, o fato de cada vez mais adultos em idade produtiva serem acometidos, causa um grande ônus à sociedade e torna o impacto socioeconômico desta doença ainda maior (ABUHAB, 2012).

Atualmente, a única forma capaz de interromper o curso da doença e oferecer retorno às condições hemodinâmicas normais é o transplante cardíaco. A substituição de um coração doente por um coração saudável é essencial, porém não isenta de riscos. Os benefícios do transplante de coração são limitados, principalmente, por rejeição aguda do coração transplantado e complicações da terapia imunossupressora de uso indispensável (JESSUP, 2001; LEVITSKY et al., 2011; KĘDZIERSKA et al., 2016). Além disso, o procedimento não pode ser oferecido a todos, principalmente pela carência de doadores de órgãos. No Brasil, o transplante cardíaco vem crescendo desde 2006, e em 2015 aumentou 14,5%, mantendo uma taxa de crescimento contínuo nos últimos quatro anos, entretanto, ainda está distante da necessidade estimada de 8 pmp (por milhão de população) (REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2015), conforme ilustrado pela FIG. 3.3.

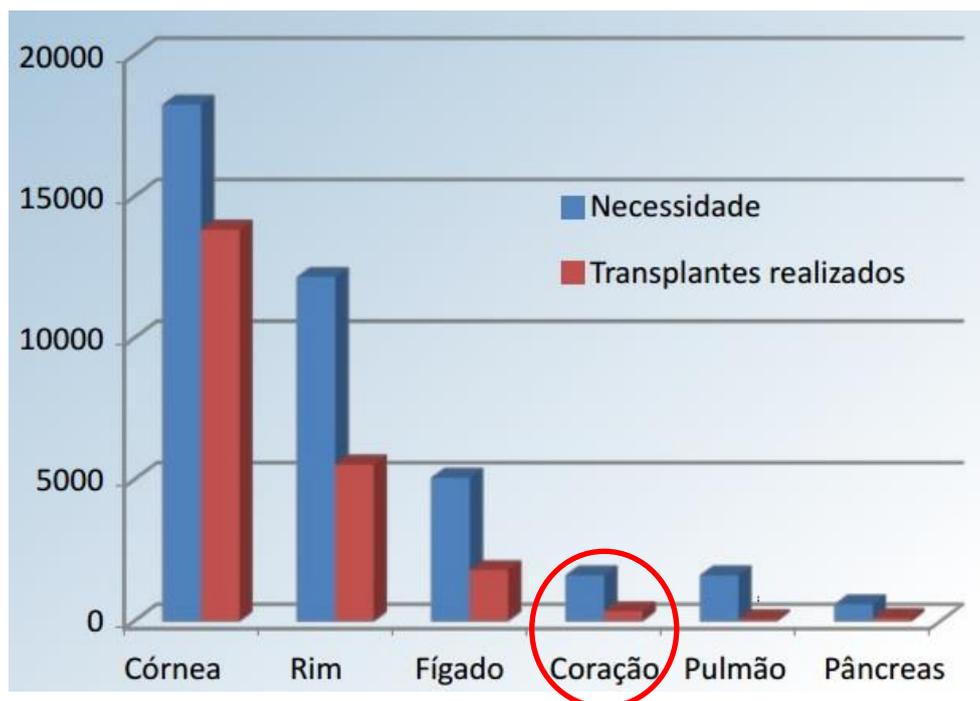


FIGURA 3.3. Quantidade estimada de transplantes necessários no Brasil comparada com o número de transplantes realizados em 2015. Em evidência (círculo), a realidade dos transplantes cardíacos, cuja necessidade estimada é de 1622 e o número de transplantes realizados igual a 353.

FONTE: REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES, 2015, p.1.

Desta forma, fica clara a necessidade da adoção de alternativas terapêuticas para amparar pacientes que estão na espera para o transplante e apresentam piora clínica, ou para aqueles que são contraindicados por razões diversas como, portadores de tumores malignos ou de outras doenças crônicas. Nestas situações especiais, o uso de terapias ou dispositivos capazes de manter as condições hemodinâmicas dos pacientes por período prolongado e substituir, total ou parcialmente, de forma temporária ou definitiva, as funções de bomba do coração, apresentam lugar especial (FIORELLI et al., 2008). Entre elas, pode-se citar, os dispositivos de assistência ventricular, os corações artificiais totais e a medicina regenerativa.

O dispositivo de assistência ventricular (DAV) auxilia o coração insuficiente, mas não o substitui. A maioria dos modelos de DAV é implantada no abdômen, ligada a tubos por meio dos quais o sangue é colhido a partir de um dos ventrículos do coração e bombeado para dentro do sistema circulatório. O DAV temporário pode auxiliar um ventrículo; dois DAVs podem auxiliar ambos. O coração artificial total (CAT) é semelhante ao conceito de dois DAVs, mas substitui o coração doente. (HOGNESS; VANANTWERP, 1991).

Apesar dos sistemas mecânicos de bombeamento de sangue serem uma alternativa promissora para pacientes que tem problemas de insuficiência cardíaca e aguardam um transplante, tais sistemas também têm desvantagens como aumento do risco de infecções, rejeição, complicações tromboembólicas e sangramentos (QUAINI et. al., 1997; CONGER et. al., 2000). Outros importantes problemas relacionados com o implante do coração artificial são o funcionamento inadequado do aparelho, o tamanho desproporcional ao paciente, a reduzida mobilidade, além de questões étnicas e sociais (ARDITO et. al., 2005).

A medicina regenerativa engloba uma ampla variedade de abordagens para substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos (MASON; DUNNILL, 2008). Entre elas, destaca-se a engenharia de tecidos, que aplica os princípios da interação entre a engenharia e as ciências biomédicas para produzir substitutos biológicos para tecidos ou órgãos danificados (LANGER; VACANTI, 1993). Uma abordagem alternativa para o transplante de órgãos naturais, envolvendo engenharia de tecidos, está sendo estudada e desenvolvida em laboratório, e consiste na fabricação de órgãos bioartificiais, construídos com componentes naturais (SMIT; DOHMEN, 2014). Estes órgãos têm potencial para aliviar a falta de doadores de órgãos bem como resolver os problemas associados aos transplantes (uso de imunossupressores e rejeição) devido à possibilidade de utilização das células do próprio receptor (REN; OTT, 2014).

3.3. Engenharia de tecidos

Basicamente, a engenharia de tecidos possui três abordagens diferentes: (1) cultivo de células *in vitro* para posterior reparação ou substituição de tecidos doentes *in vivo*; (2) implante de dispositivos, que podem ou não conter células, para induzir a regeneração de tecidos; (3) desenvolvimento de dispositivos que contêm células, projetados para substituir um determinado tecido ou órgão doente. Estes dispositivos são desenvolvidos com materiais biocompatíveis (biomateriais), que podem ser naturais ou sintéticos, atuando como suporte para as células e interagindo com elas (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

As células utilizadas para engenharia de tecidos devem apresentar ciclo de vida normal quando transplantadas, ter potencial de serem replicadas *in vitro* indefinidamente e capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares. Algumas

linhagens de células tronco são preferenciais para o uso terapêutico como células tronco de pluripotência induzida (iPSC), células tronco de tecido embrionário ou adultas (MURPHY; ATALA, 2012).

No transplante celular, as células podem ser injetadas no organismo através da corrente sanguínea ou diretamente no tecido de interesse para recuperar um dano local ou sistêmico, como é o caso do transplante de células da medula óssea. Entretanto, estudos demonstraram uma alta taxa de morte celular, baixa adesão celular (tipicamente <10% das células) (WU et al., 2008) e perda do controle das células transplantadas no interior do corpo, o que torna o sucesso desta técnica limitada a pequenas regiões (SOTO GUTIERREZ et al. 2010). A grande maioria dos tipos celulares dos mamíferos são dependentes da ancoragem com um substrato, e morrem, caso a adesão celular não ocorra. Logo, uma alternativa para aumentar a taxa de sobrevivência celular é utilizar como suporte, um biomaterial capaz de fornecer um ambiente propício para a adesão celular, mimetizando a função biológica e mecânica da matriz extracelular natural de modo que as células permaneçam viáveis (MURPHY; ATALA, 2012).

Há alguns anos, esperava-se que os biomateriais fossem praticamente inertes desencadeando um processo inflamatório normal com formação de cápsula fibrosa ao redor do implante, sem interação com tecidos vizinhos. A nova geração de biomateriais, porém, tende a ser biocompatível, e guiar os processos para adesão celular e/ou regeneração tecidual. Biomateriais utilizados para engenharia de tecidos e órgãos podem ser divididos em três classes: (1) materiais sintéticos como, polímeros e cerâmicas; (2) polímeros naturais individualizados, como colágeno, ácido hialurônico, e alginato; ou (3) matriz extracelular, conforme ilustrado na FIG. 3.4 (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006, MURPHY; ATALA, 2012).

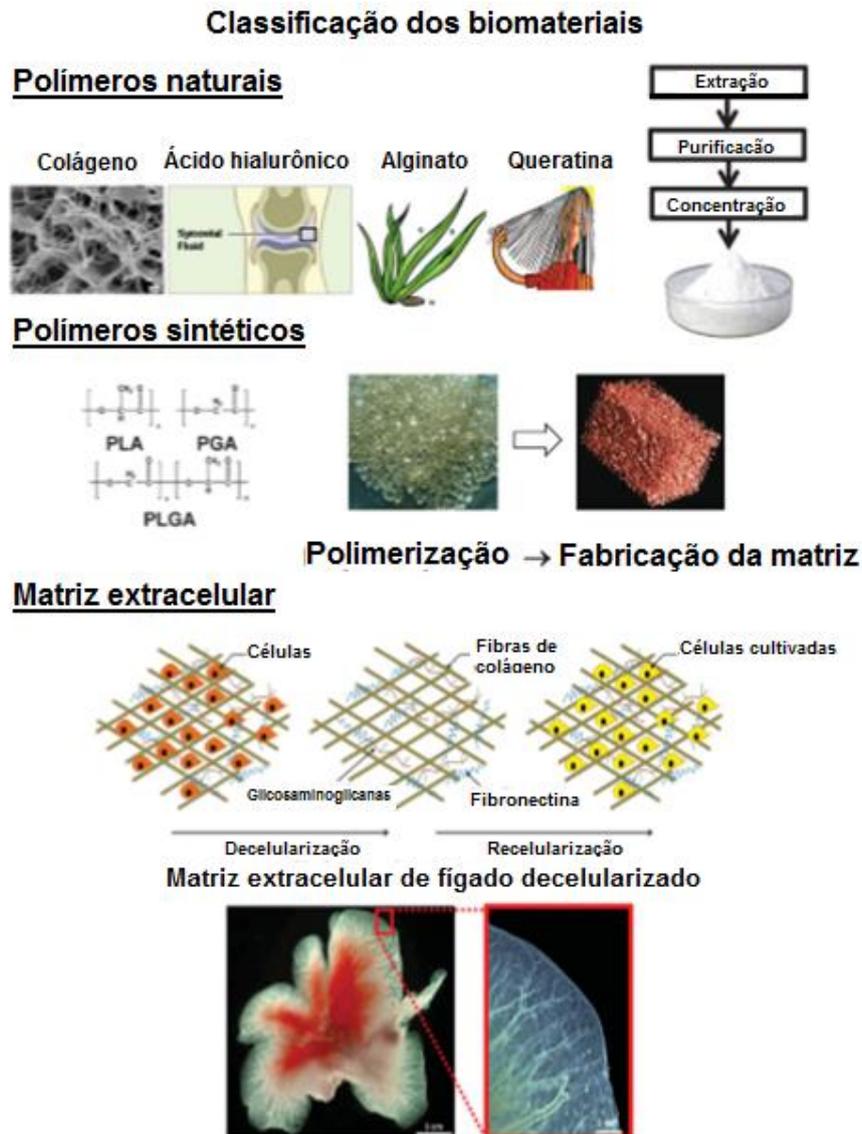


FIGURA 3.4: Biomateriais. A figura ilustra alguns biomateriais sintéticos e naturais utilizados na engenharia de tecidos e a forma como eles são obtidos ou fabricados.
 FONTE: Adaptado de Murphy e Atala, 2012, p.167.

Estudos mostram que polímeros sintéticos podem ser reproduzidos em larga escala com padrão de microestrutura e superfície bem conhecidos. Este padrão pode ser alterado e controlado para estimular processos metabólicos das células promovendo maior adesão celular. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido glicólico-ácido láctico) (PGLA), são os mais utilizados em medicina regenerativa, pois interagem com as células e apresentam características termoplásticas, permitindo a fabricação tridimensional de matrizes de acordo com a forma e as dimensões requeridas (PILLAI; SHARMA, 2010, FREED et al., 1994). Entretanto, o uso de matrizes naturais é preferencial porque as

matrizes sintéticas quando submetidas às condições corpóreas humanas, muitas vezes desconhecidas devido à falta de testes *in vivo*, podem sofrer degradação tóxica e/ou desencadear uma reação inflamatória (WEYMANN et al., 2011). Os polímeros naturais e matrizes extracelulares já possuem características originalmente importantes para a adesão, migração, proliferação e diferenciação da célula, uma vez que desempenham este papel no organismo (MURPHY; ATALA, 2012).

3.3.1. Matriz extracelular

A matriz extracelular atua como um arcabouço natural para as células e consiste em uma estrutura tridimensional formada por proteínas e biomoléculas secretadas pelas células residentes de cada tecido ou órgão onde está localizada (FIG. 3.5). A interação entre as células e o microambiente adjacente a elas é mediada pela matriz extracelular de forma recíproca, pois, as células secretam componentes da matriz e, por sua vez, estas proteínas produzidas, regulam a proliferação e a diferenciação celular que são essenciais para a formação e a estabilidade do tecido (NELSON; BISSEL, 2006). A composição e a distribuição específica dos componentes da matriz extracelular variam de acordo com o tecido de origem (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009).

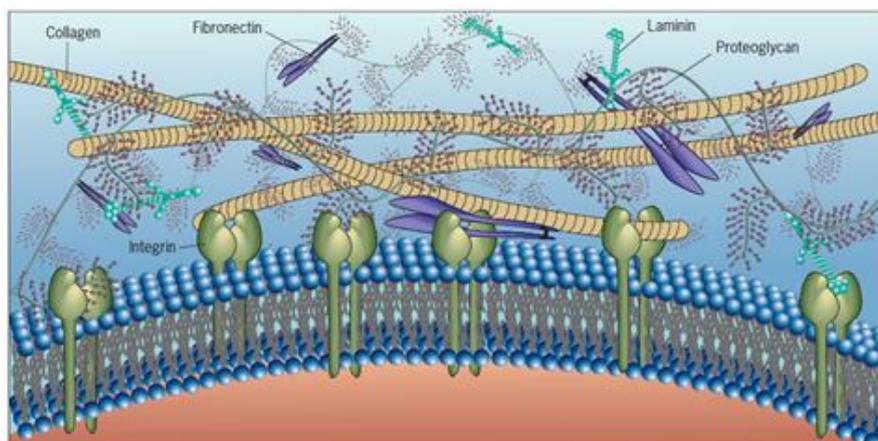


FIGURA 3.5: Estrutura básica da matriz extracelular.
FONTE: Adaptada de Karp, 2010.

No coração, a matriz extracelular apresenta diferentes componentes que são responsáveis, juntamente com as células cardíacas e com o sistema elétrico, pela manutenção da estrutura, morfologia e fisiologia do órgão. Os principais componentes presentes na matriz extracelular do coração são: proteoglicanos, glicosaminoglicanos,

colágeno (tipo I, III, IV, VI, principalmente), fibronectina, fibrilina, tenascina, laminina e elastina, porém as funções específicas de muitas dessas moléculas no coração ainda não foram totalmente elucidadas (LOCKHART et al., 2011).

Os glicosaminoglicanos promovem a proliferação celular e a motilidade das células na matriz extracelular cardíaca (TOOLE, 2001). Os proteoglicanos são essenciais para a formação de válvulas cardíacas e da membrana basal dos cardiomiócitos, além de manter a integridade da parede do ventrículo (COSTELL et al., 2002). A fibronectina interage com integrinas, proteoglicanos e colágeno para mediar a adesão celular. O colágeno é um regulador bem conhecido da rigidez do miocárdio e a ligação cruzada dos feixes de colágeno é um fator determinante (NORTON et al., 1997) fornecendo elasticidade e integridade estrutural ao tecido cardíaco (LOCKHART et al., 2011).

No coração, o pericárdio é um tecido fino, que envolve externamente o órgão e é composto principalmente por colágeno (LIAO et al., 2005). Em contraste com o pericárdio, o colágeno constitui uma fração relativamente pequena da massa do miocárdio. No entanto, a rede de colágeno do miocárdio é essencial para a mecânica do coração (WEBER, 1989) pois, é ela que proporciona a resistência, a rigidez e a força requerida pelo órgão durante os batimentos cardíacos (WEYMANN et al., 2011).

Além do colágeno, o miocárdio contém elastina, tanto nas paredes dos vasos sanguíneos quanto no interstício, mas segundo Fomovsky; Thomopoulos; Holmes, (2010), não está claro como ela contribui significativamente para o comportamento mecânico desta camada. As funções mecânicas do colágeno, elastina e proteoglicanas são muito melhor compreendidas em outros tecidos moles do que no coração (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2010).

Os componentes individuais da matriz extracelular podem ser isolados e utilizados tanto *in vitro* como *in vivo* para facilitar o crescimento e a diferenciação celular. Várias amostras de matriz extracelular têm sido utilizadas como suportes biológicos para promover a remodelagem construtiva de tecidos e órgãos (BADYLAK; FREYTES; GILBERT, 2009). Alguns produtos feitos com matriz extracelular são aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico, como, dispositivos dermatológicos, válvulas cardíacas ou próteses ortopédicas (SONG; OTT, 2011).

A matriz extracelular possui características ideais para ser utilizada como arcabouço na engenharia de tecidos. Além de interagir com as células e apresentar propriedades mecânicas indispensáveis para o bom funcionamento dos órgãos, ela é um

meio de suporte para vasos sanguíneos, permitindo a difusão de nutrientes (HE; CALLANAN, 2013).

As matrizes extracelulares são obtidas por meio da decelularização de órgãos ou tecidos de origem humana podendo ainda serem obtidos de outros animais como porco, bovinos ou macacos. Os métodos, basicamente, atuam na remoção dos componentes celulares e preservam as matrizes para subsequente recelularização e fabricação de tecidos ou órgãos bioartificiais (MURPHY; ATALA, 2012). Este processo está exemplificado na FIG. 3.4.

3.3.2. A engenharia de tecidos para a fabricação de órgãos bioartificiais

Obter matrizes com qualidade e em grande escala para tratamentos clínicos é apenas uma das dificuldades de se fabricar um órgão viável e funcional (SONG; OTT, 2011). Órgãos sólidos e complexos possuem diferentes tipos de células, que, por sua vez, estão orientadas de forma variada e organizadas em camadas com espessuras diferentes, o que dificulta o cultivo destas células de forma homogênea na matriz extracelular (SOTO GUTIERREZ et al., 2010). A distância de difusão do oxigênio nos tecidos é muito pequena, o que restringe a suplementação das células podendo levá-las à morte por hipóxia. A angiogênese ou o aporte auxiliar de oxigênio na matriz tornam-se fundamentais para a viabilidade tecidual. Da mesma forma, a correta conformação macroscópica e molecular da matriz, a estrutura microvascular e a adequada interação célula-matriz, célula-célula e célula-mediadores são essenciais para uma engenharia de tecidos bem-sucedida. (MURPHY; ATALA, 2012).

Para o desenvolvimento de órgãos bioartificiais, é necessário cultivar células vivas em contato com matrizes tridimensionais que, juntamente com os nutrientes e fatores de crescimento, irão estimular o metabolismo celular e todos os processos de adesão, migração, replicação e diferenciação. Ao final do processo *in vitro*, será obtido um órgão viável e funcional para substituir um órgão doente (PROKOP, 2001).

Os estudos para o desenvolvimento de um órgão bioartificial, ainda são recentes. Atala et al. (2006) implantaram em pacientes portadores de doença terminal, bexigas produzidas com uma matriz de colágeno e ácido poli glicólico cultivada com células autólogas. Após o implante estes pacientes obtiveram retorno das funções urinárias normais. Em 2008, Ott et al. introduziram o primeiro coração derivado de uma

matriz decelularizada, em um modelo de rato. Neste mesmo ano, Macchiarini et al. (2008) mostraram o primeiro implante humano do brônquio esquerdo fabricado a partir de tecido traqueal cadavérico decelularizado e semeado com células do próprio paciente. O implante desempenhou suas funções normais sem a necessidade de utilização de drogas imunossupressoras.

3.4. Decelularização

O objetivo da decelularização consiste em remover completamente o conteúdo celular preservando a matriz extracelular sem qualquer perda, ruptura ou dano (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006, CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Diferentes tecidos e órgãos podem ser decelularizados, sejam eles espessos, delgados, densos, inteiros ou seccionados (ARENAS-HERRERA et al., 2013), podendo fazer uso de métodos variados. Inúmeros tecidos e órgãos produzidos por meio de diferentes técnicas de decelularização podem ser citados: coração (OTT et al., 2008, WAINWRIGHT et al., 2010, WEYMANN et al., 2011, GUYETTE et al., 2016), pulmão (PETERSEN et al., 2010, CORTIELLA et al 2010), fígado (UYGUN et al., 2010, BAPTISTA et al., 2010, BAIOCCHINI et al., 2016), rim (ROSS et al., 2009, LIU et al., 2015), válvulas cardíacas (KUNA et al., 2015, YU et al., 2013, AKHYARI et al., 2010), bexiga urinária (YANG et al., 2010, FREYTES; STONER; BADYLAK, 2008), derme (REING et al., 2010, XU et al., 2008), traqueia (MACCHIARINI et al., 2008), entre outros. Os trabalhos são desenvolvidos com órgãos de ratos, porcos, bovinos e cadáveres humanos. Alguns órgãos de rato decelularizados estão exemplificados na FIG. 3.6.

Poucos testes clínicos com implante de órgãos ou tecidos decelularizados foram realizados. A maioria dos testes clínicos já realizados e reportados foram com válvulas cardíacas ou componentes vasculares (O'BRIEN et al., 1999; DOHMEN et al. 2002; CEBOTARI et al., 2011, DA COSTA et al., 2010, DOHMEN, 2012), sendo o trabalho de Macchiarini et al. (2008) com traqueia, o único encontrado para órgãos inteiros.

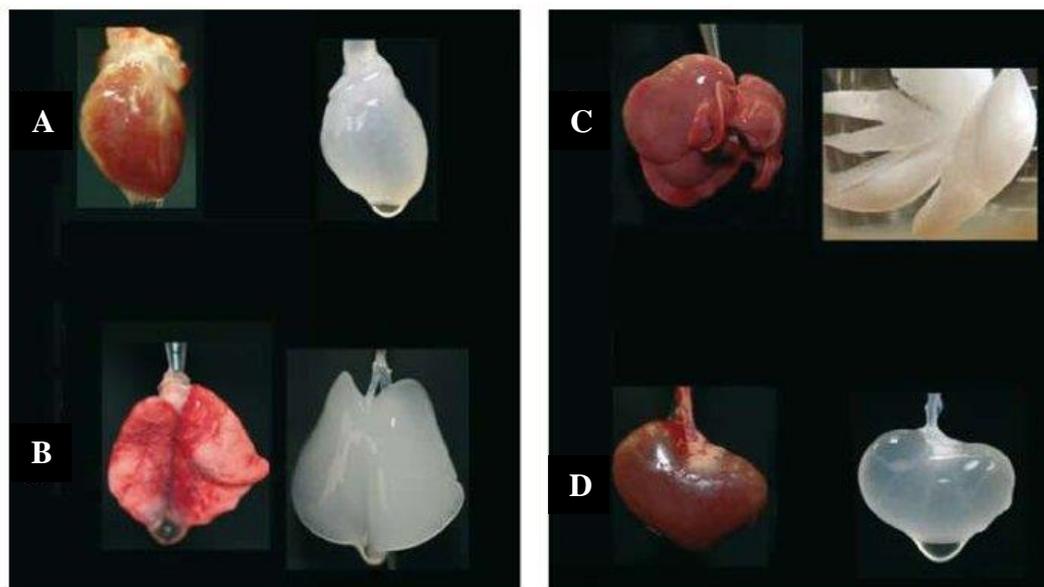


FIGURA 3.6. Exemplos de órgãos de rato, antes e após o processo de decelularização. (A) Coração; (B) Pulmão; (C) Fígado; (D) Rim.
 FONTE: TAYLOR; ROBERSTON, 2009, p 1042.

3.4.1. Métodos de decelularização

Os métodos utilizados para decelularização de órgãos se dividem basicamente em mecânicos (físicos), químicos e enzimáticos, podendo ser usados sozinhos ou combinados. A escolha de quais métodos utilizar depende das características do tecido ou órgão como por exemplo, a densidade celular, a espessura e o conteúdo lipídico (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os métodos mecânicos promovem ruptura das membranas celulares e/ou a remoção de suas junções celulares por meio de força ou pressão, facilitando a decelularização. Dentre eles os métodos usados, incluem-se perfusão, imersão com agitação, choque térmico (congelamento e descongelamento), sonicação (ultrassom), eletroporação irreversível e ruptura manual. Tanto a agitação quanto a perfusão proporcionam o contato das soluções de decelularização com o tecido. A agitação é, normalmente, utilizada para tecidos mais delgados e a perfusão, para tecidos mais complexos e espessos em que a rede vascular ou sistemas de canais (como os canais biliares ou o ureter do rim) estão acessíveis (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006, CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Em particular, as forças mecânicas incorporadas às outras técnicas de decelularização são importantes para aumentar a eficiência do processo. Diferentes níveis de forças mecânicas devem ser aplicados a

processos de decelularização, dependendo do tamanho e característica do órgão (ARENAS-HERRERA et al., 2013).

Os órgãos delgados, como bexiga urinária, podem ser efetivamente decelularizados por meio de imersão com agitação em um curto espaço de tempo. Porém, tecidos, como derme ou órgãos mais densos, como, a traqueia, requerem protocolos mais longos combinados com outros métodos químicos e enzimáticos (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Neste processo, a remoção de DNA e a perda de componentes da matriz extracelular são influenciadas pela velocidade de agitação (GUO et al., 2010).

A perfusão pode ser anterógrada, no sentido normal do fluido que percorre aquele vaso sanguíneo ou canal (como ureter ou canais biliares, por exemplo), ou retrógrada, no sentido contrário. Na perfusão, as soluções são distribuídas uniformemente ao longo do órgão por meio da rede vascular, permitindo que a decelularização ocorra de forma homogênea. Ott et al. (2008; 2010) demonstraram que aplicações de certas pressões, durante o processo de perfusão, fizeram com que as soluções de decelularização atingissem de forma eficaz todo o tecido desde grandes vasos sanguíneos até o nível capilar, permitindo a remoção dos restos celulares. As diferentes pressões geradas, durante o processo, podem ainda reduzir a distância de difusão por desbaste da parede do órgão, permitindo a infiltração das soluções através do tecido (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Este mesmo efeito pode ser negativo, já que pressões excessivas podem romper os vasos e promover uma decelularização incompleta.

Os métodos químicos, geralmente, são utilizados para solubilizar as membranas celulares, dissociar o DNA das proteínas e remover o material celular dos tecidos. Eles podem ser: ácidos, bases, soluções hipertônicas e hipotônicas, detergentes e solventes. A escolha das soluções, bem como, o tempo de lavagem, dependem do tipo de tecido, pois influenciam diretamente na integridade da matriz extracelular, uma vez que algumas delas podem danificar proteínas da matriz (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006, CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os detergentes são os produtos químicos mais utilizados para decelularização e podem ser iônicos, não iônicos e zwitteriônicos. Triton X-100, um detergente não iônico, e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), um detergente iônico, são os mais conhecidos pela capacidade de remover as células tanto de tecidos finos quanto espessos. Porém há relatos de danos à matriz como perda de colágeno e elastina, ruptura da estrutura e eliminação de fatores de crescimento. Detergentes zwitteriônicos, como o CHAPS, têm

comportamento iônico e não iônico e apresentam-se mais efetivos apenas em tecidos mais finos, com uma capacidade intermediária de causar dano à matriz (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006, CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Os métodos enzimáticos são altamente específicos na remoção de células ou componentes indesejáveis da matriz extracelular, pois as enzimas atuam somente naquele determinado alvo como, nucleases (DNA e RNA), lipases (lipídios), proteases (proteínas) ou alfa-galactosidade (antígenos alfa-galactose). (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006, GILBERT, 2012).

Segundo Momtahan et al. (2015), a redução do tempo no processo de decelularização é um fator crítico para a otimização do mesmo, pois limita os danos à matriz extracelular devido à exposição aos reagentes, reduz o risco de contaminação e minimiza os custos de material e de trabalho.

Para Gilbert et al. (2012), a retenção de resíduos de produto na matriz extracelular após decelularização com métodos químicos e enzimáticos, e os efeitos adversos destes resíduos em processos de remodelagem e recelularização, também são preocupantes, porém ainda pouco estudados. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas abordagens para a decelularização de tecidos que não necessitam de produtos químicos seria interessante.

Apesar dos diferentes métodos e protocolos de decelularização, hoje não é possível remover completamente o conteúdo celular da matriz (WEYMANN et al., 2011, GILBERT; FREUND; BADYLAK, 2009, GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006) o que levou os pesquisadores, a utilizarem critérios para avaliação da eficiência da decelularização tendo em vista o sucesso da recelularização das matrizes. São eles: (1) a ausência de núcleos com base na coloração histológica com hematoxilina e eosina e DAPI, (2) medição quantitativa do DNA em menos de 50 ng/mg de peso do tecido seco e (3) tamanho do fragmento de DNA abaixo 200 pb (GILBERT; FREUND; BADYLAK, 2009, CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Entretanto, outros autores mostraram que tecidos ineficientemente decelularizados apresentaram a mesma capacidade de remodelamento daqueles efetivamente decelularizados e, que a retenção dos componentes intracelulares, e do DNA, nas matrizes biológicas, tem a capacidade de desencadear uma forte resposta imune no receptor principalmente quando utilizadas matrizes xenogênicas (KEANE et al. 2012, BADYLAK; GILBERT (2008), COOPER et al., 1993, GALILI, 2001).

3.4.2. Decelularização de coração

O processo de decelularização de coração é relativamente recente, sendo o trabalho de Ott et al. (2008), o pioneiro. Após este trabalho, muitos outros foram desenvolvidos utilizando-se corações de rato, porco e até humanos (MOMTAHAN et al., 2015).

Os corações de rato são muitas vezes utilizados como modelo experimental devido à facilidade para a obtenção. O menor tamanho permite ainda que a área decelularizada seja melhor controlada e estudada com um menor custo tanto para decelularização quanto para recelularização (MOMTAHAN et al., 2015).

Os corações de porco, apesar de maiores, oferecem vantagens em relação à possibilidade de uso clínico da matriz, dentre elas, tamanho e forma semelhante ao humano (podendo serem inclusive utilizado em crianças) (WEYMANN et al., 2011).

A maioria dos protocolos descritos na literatura para decelularização de coração inteiro se baseia no método da perfusão combinado com métodos químicos (WEYMANN et al., 2011, WEYMANN et al., 2014, WAINWRIGTH et al., 2010, OTT et al., 2008, ROBERTSON et al., 2014, EITAN et al., 2010, CARVALHO et al., 2012, AKHYARI et al., 2011, REMLINGER; WEARDEN; GILBERT, 2012, SANCHEZ et al., 2012, GUYETTE et al., 2016). Para decelularização de secções do coração, principalmente, miocárdio, é utilizado o método de imersão com agitação (CASTRO BRÁS et al., 2013, WANG et al., 2010, OBERWALLNER et al., 2014).

Sanchez et al. (2012) utilizaram apenas o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) para perfundir corações humanos, rejeitados para transplante, com protocolos que levaram de 4 a 8 dias. A matriz extracelular (estrutura, composição e orientação das fibras) manteve-se preservada independente do tempo de perfusão, bem como a geometria do órgão, as válvulas e a rede vascular, proporcionado a adesão, alinhamento e sobrevivência das células tronco, após recelularização de uma região do ventrículo esquerdo. Um estudo subsequente de Sanchez et al. (2015), reportou ainda que a matriz extracelular é capaz de promover a organização de cardiomiócitos com atividade elétrica no tecido muscular em formação. Resultados semelhantes foram mostrados por Guyette et al. (2016).

Diferentes estudos trabalharam com corações de porco. Os protocolos propostos por Weymann et al. (2011; 2014) e Methe et al. (2014) são baseados no uso de

detergentes, sendo que o protocolo de Methe et al. (2014), que também incluiu passos de agitação, foi mais longo. Apesar de obterem corações macroscopicamente decelularizados (FIG. 3.7B), em relação ao coração antes do tratamento (FIG. 3.7A), os estudos apontaram a retenção de conteúdo celular (WEYMANN et al., 2011) e de proteínas contráteis (METHE et al., 2014) na matriz. Além dos detergentes, WAINWRIGTH et al. (2010), REMLINGER; WEARDEN; GILBERT (2012) e EITAN et al. (2010) também utilizaram soluções ácidas, hipertônicas, hipotônicas e enzimas e não observaram presença de núcleos ou proteínas contráteis remanescentes. Em todos estes trabalhos, o conteúdo e a estrutura da matriz extracelular permaneceram preservadas.

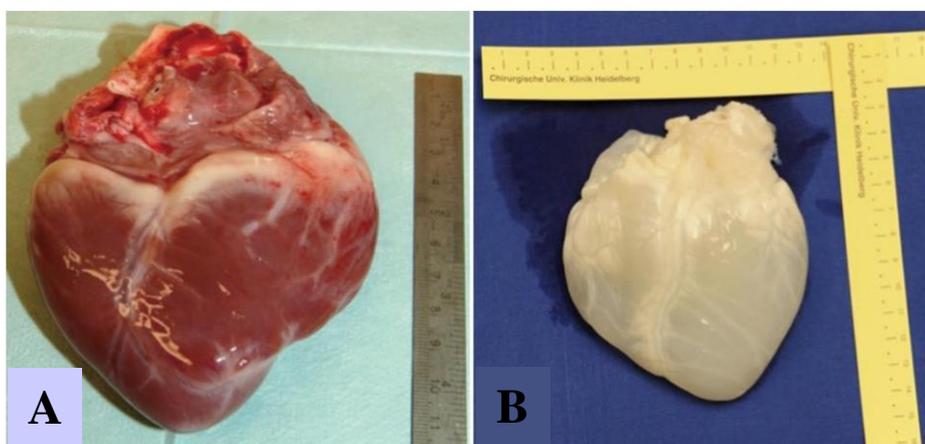


FIGURA 3.7. Ilustração do processo de decelularização por perfusão em coração de porco. (A) Coração antes do processo de perfusão. (B) Coração depois de 12 horas de perfusão com aspecto esbranquiçado e translúcido típico de um coração decelularizado.

FONTE: WEYMANN et al., 2011, p. 854.

Outros estudos avaliaram a eficiência dos métodos de perfusão no coração de ratos. Akhyari et al. (2011) foram os únicos que compararam quatro métodos diferentes para decelularização, todos os outros trabalhos seguiram o protocolo descrito por Ott et al. 2008, que faz lavagens com SDS e Triton X-100, por aproximadamente, 13 horas, com posterior recelularização. A FIG. 3.8 mostra o coração que passou por processos de decelularização (FIG. 3.8A-C) e recelularização (FIG. 3.8D e E). Nestes trabalhos, foi obtida uma matriz extracelular decelularizada, e a remoção dos núcleos celulares foi comprovada, assim como a preservação do conteúdo e da estrutura da matriz, porém com uma pequena quantidade de DNA residual (OTT et al., 2008, ROBERTSON et al., 2014, CARVALHO et al., 2012, AKHYARI et al., 2011).

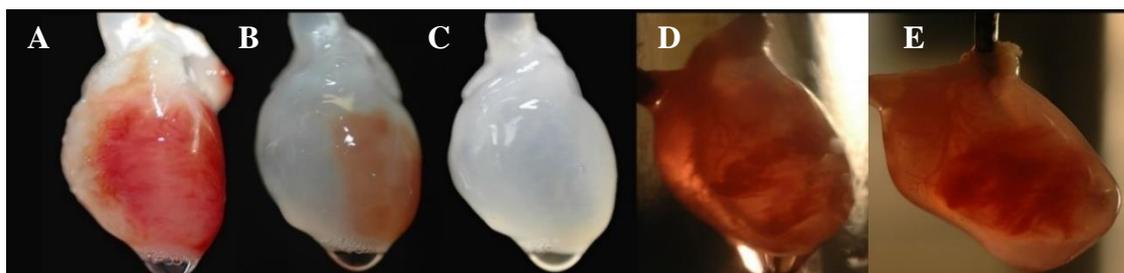


FIGURA 3.8. Ilustração do processo de decelularização por perfusão e recelularização em coração de rato. (A-C) Sequência de fotos do processo de decelularização; (D e E) Sequência de fotos do processo de recelularização.

FONTE: Adaptada de Ott et al. 2008, p. 214 e 217.

Ott et al. (2008) ganharam destaque no trabalho com perfusão de coração, pois realizaram o transplante heterotópico do coração decelularizado, em rato, (FIG. 3.9A) e observaram, *in vivo*, a perfusão de sangue pelos vasos sanguíneos que foram preservados na matriz (FIG. 3.9B).

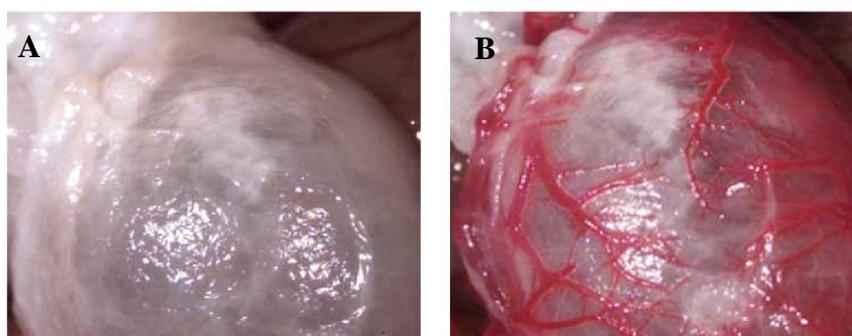


FIGURA 3.9. Transplante heterotópico de coração de rato. (A) Coração decelularizado transplantado em rato. (B) Coração transplantado recebendo aporte de sangue, após ligação com a aorta do animal.

FONTE: OTT et al. 2008, p. 216

Robertson et al. (2014) também realizaram transplante heterotópico em ratos de matriz decelularizada e reendotelizada. Porém, após uma semana, houve formação de trombos em ambos e não foram observados marcadores de células musculares.

A decelularização efetiva do coração é essencial para o sucesso da recelularização, pois, a preservação das estruturas anatômicas tridimensionais na matriz torna possível a formação de uma camada de miocárdio funcional com espessura desejada e reduz o risco de resposta imune adversa ou formação de trombos, fatores indispensáveis para a construção de um órgão viável para transplante (OTT et al., 2008, MOMTAHAM et al., 2015).

4. METODOLOGIA

4.1. Esquema metodológico

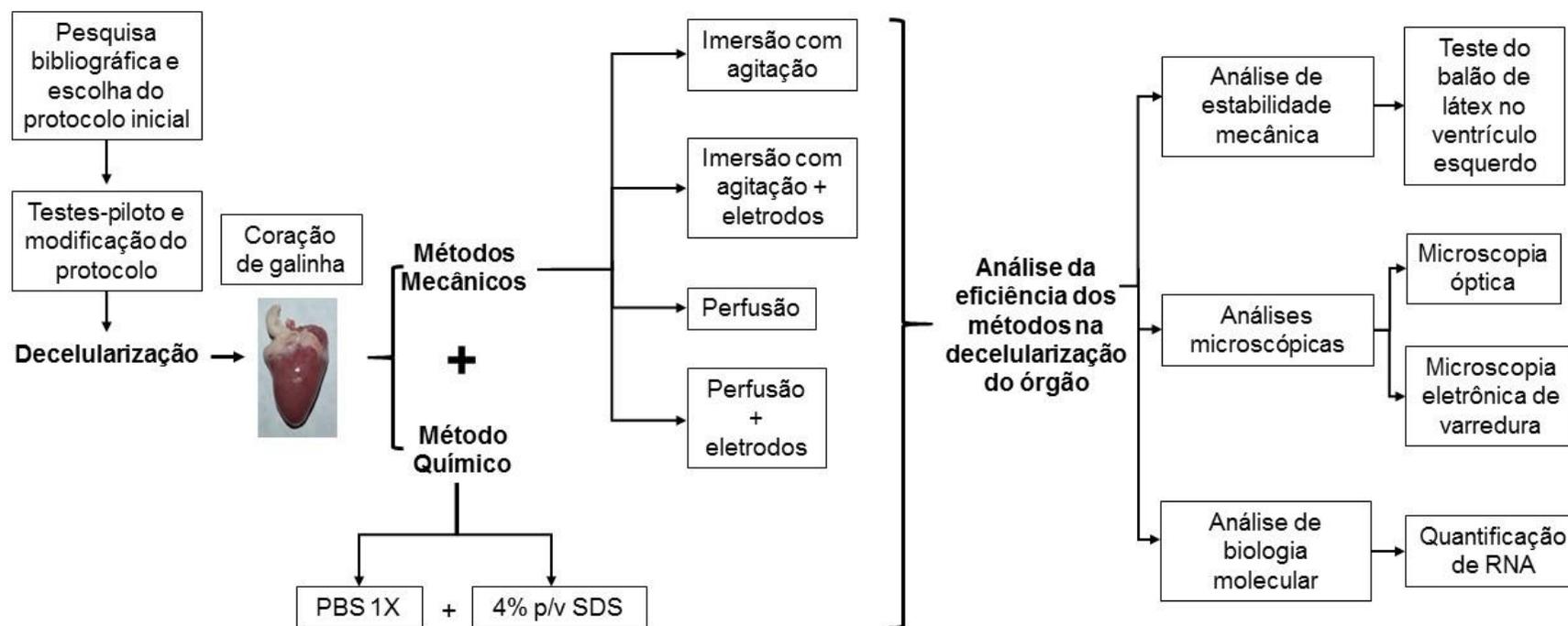


Figura 4.1. Esquema metodológico deste trabalho.

Para avaliar a influência de métodos mecânicos na decelularização de coração, foram realizadas diferentes abordagens experimentais em ensaios, *ex vivo*, usando corações de galinha. Estes órgãos foram utilizados como modelo experimental devido, ao menor tamanho em comparação ao coração de porco, o que reduz os custos associados aos testes e devido à facilidade para obtenção do órgão íntegro e fresco.

4.2. Obtenção do órgão

Os corações de galinha foram obtidos frescos, logo após abate, na Granja Ave Nova, (Grupo Brasília Agroindustrial Avícola Ltda). O abatedouro é devidamente regulamentado e autorizado a realizar o abate do animal. Os corações coletados foram imediatamente armazenados em uma caixa térmica contendo gelo e transportados ao Laboratório de Bioengenharia (LabBio), Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG, onde foram pesados e medidos para serem utilizados no presente trabalho.

As pesagens e medições foram realizadas antes e após os processos de decelularização. Os tamanhos dos corações foram medidos utilizando-se uma régua com escala de milímetros e pesados em balança de precisão (AY220, Marte®, Brasil). Posteriormente, os corações foram colocados em um recipiente contendo tampão fosfato-salino (*PBS*) 1X e armazenados na geladeira, por um período máximo de 24 horas, antes de serem submetidos ao tratamento. Corações que passaram por processos de decelularização foram denominados tratados enquanto aqueles naturais, sem tratamento, foram denominados controle.

4.3. Modificação do protocolo de perfusão descrito na literatura

4.3.1. Protocolo inicial de Weymann et al. (2011)

A escolha do protocolo de decelularização inicial foi baseado em levantamentos bibliográficos considerando dados da relação entre a eficiência do processo e os danos causados à matriz extracelular. O protocolo utilizado como referência neste trabalho foi proposto por Weymann et al. (2011). O grupo tratou o coração com anticoagulante e, como método mecânico, utilizou a perfusão através da aorta, à pressão constante de 100 mmHg e temperatura de 37°C. O processo químico

consistiu em lavagens com solução de 4% m/v do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), por 12 horas, trocando a cada 3 horas e intercalando com tampão fosfato-salino (PBS) 1X, por 15 minutos a cada troca. Ao final do tratamento com SDS, os corações foram lavados com PBS 1X por mais 24 horas para remover os resíduos de detergente e restos celulares.

4.3.2. Testes-piloto utilizando perfusão e imersão com agitação

Os testes-piloto utilizando perfusão e imersão com agitação foram realizados utilizando o método químico proposto por Weymann et al. (2011). Na perfusão, para evitar vazamento de pressão durante o processo, duas aberturas localizadas próximas à base da aorta (devido à remoção das artérias braquiocefálicas do coração de frango durante o processamento) foram fechadas por pontos feitos com linha ou fio dental. Após este procedimento, a aorta foi canulada e o coração foi perfundido com o auxílio de uma bomba peristáltica (5M6002, Travenol Laboratories, Estados Unidos) à temperatura ambiente, sob pressão variável.

No processo de imersão com agitação, o coração foi preso a uma haste de vidro por meio da aorta e imerso em um béquer, que foi colocado sob um agitador magnético (78HW-1, Biomixer, Brasil), sem aquecimento e com a velocidade constante. Tanto na perfusão quanto na imersão com agitação, os corações foram submetidos ao tratamento com PBS 1X e solução de 4% m/v de SDS por 37 horas conforme descrito no item 4.2.1. Ao final do tratamento, os corações foram analisados macroscopicamente, para avaliar se o mesmo apresentava aspecto esbranquiçado indicando que o tecido muscular havia sido removido.

Após os testes-piloto, alguns pontos críticos no processo de decelularização, foram observados, como: a importância da retirada de gordura e sangue coagulado do órgão, a influência da temperatura na velocidade do processo e o número de lavagens. Estas variáveis foram consideradas determinantes no processo de decelularização e então, novos ensaios foram padronizados. Estes pontos serão discutidos no item Resultados e Discussão deste trabalho.

4.3.3. Estabelecimento do protocolo de testes com modificações

Com o objetivo de melhorar a eficiência do protocolo inicial na remoção das células e com base nos resultados obtidos nos testes-piloto, algumas modificações foram propostas para realização dos experimentos subsequentes:

- a) Limpeza do coração - retirada do excesso de gordura, tecidos conectivos e remoção de coágulos de sangue por meio de massagens;
- b) Inclusão de uma lavagem inicial com PBS 1X por 15 minutos para remoção de coágulos de sangue remanescentes, uma vez que não foi utilizado anticoagulante;
- c) Pressão variável na perfusão;
- d) Aumento do número de trocas de SDS, que passaram a ser realizadas a cada 2 horas;
- e) Aumento do número de lavagens com PBS durante o tratamento com SDS;
- f) No último passo do protocolo (24 horas com PBS), o PBS foi trocado após as primeiras 12 horas de lavagem.
- g) Inclusão de eletrodos nos processos de imersão com agitação e perfusão;

As concentrações dos reagentes e a temperatura de tratamento (37°C) foram mantidas, conforme proposto por Weymann et al. (2011). Todos os demais experimentos do presente trabalho foram realizados seguindo as modificações experimentais mencionadas acima.

4.4. Teste do método mecânico de perfusão utilizando protocolo modificado

A aorta, com as aberturas das artérias braquiocefálicas, devidamente fechadas, foi canulada com um cateter de 3 mm e conectada à máquina de perfusão por meio de tubos de silicone. As soluções de decelularização foram bombeadas para uma câmara de decelularização por meio de uma bomba peristáltica (5M6002, Travenol Laboratories, Estados Unidos), com velocidade de rotação inicial de 18 rpm, variando até 21 rpm, ao final do processo. O aumento da velocidade foi feito devido à redução de pressão observada durante a perfusão, este ajuste fez com que a pressão permanecesse entre 30 e 50 mbar até o final do processo. A pressão foi monitorada por meio de um manômetro analógico (EN 837-3, DFX, Brasil). A temperatura foi mantida constante por um banho ultratermostático (ECO RE 630, Lauda, Alemanha). A máquina de perfusão

utilizada neste trabalho (FIG. 4.2) foi adaptada no LabBio a partir de uma máquina de circulação extracorpórea pelo aluno Jonathas Haniel.

Utilizou-se PBS 1X e solução 4% m/v de SDS para realização das lavagens conforme modificações especificadas no item 4.3.2, totalizando 37 horas de processo. Os testes foram executados em triplicata. Após os experimentos, os corações foram pesados, cortados e, uma parte das amostras foi destinada para análises de microscopia e a outra parte foi congelada para ensaios de biologia molecular.

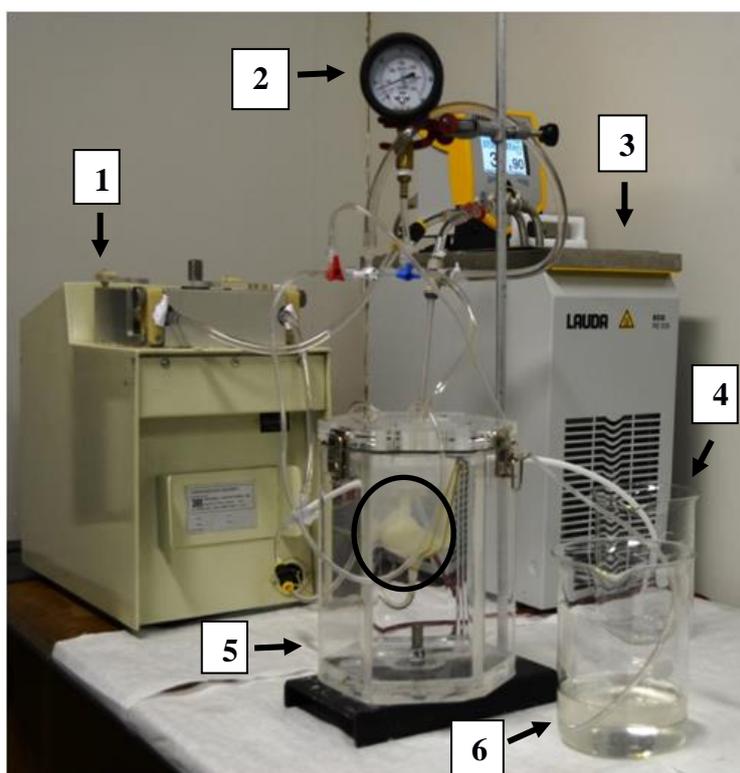


FIGURA 4. 2. Estrutura montada para realização da perfusão. A máquina de perfusão é composta por: (1) Bomba peristáltica acoplada a tubos de silicone; (2) Manômetro; (3) Banho ultratermostático; (4) Recipiente para adição de soluções; (5) Câmara de decelularização; (6) Recipiente para descarte de solução. O círculo na figura, destaca o coração sendo perfundido.

4.5. Teste do método de decelularização por imersão com agitação utilizando protocolo modificado

Os corações foram presos pela aorta a uma haste de vidro e imersos em um béquer onde foram adicionadas as soluções de decelularização, PBS 1X e 4% m/v de SDS, conforme protocolo descrito no item 4.4. As soluções foram agitadas por meio de um agitador magnético com aquecimento (78HW-1, Biomixer, Brasil) a uma temperatura

média de 37°C aferida por um termômetro digital (TM879, Equitherm, Brasil), conforme indicado na FIG. 4.3. A velocidade de agitação foi padronizada no controlador analógico do agitador e permaneceu constante em todos os experimentos. Os testes foram realizados em triplicata. Ao final do experimento, os corações foram pesados, cortados e assim como, aqueles tratadas com perfusão, uma parte foi fixada para microscopia e outra parte foi congelada para ensaios de biologia molecular.

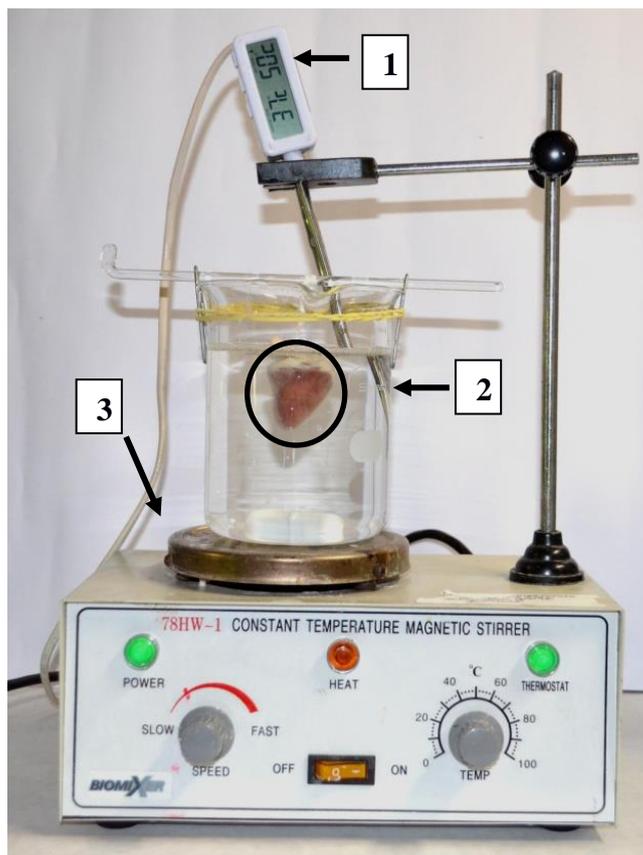


FIGURA 4.3. Estrutura para realização do processo de imersão com agitação. Para realização do processo foram necessários: (1) termômetro digital; (2) Recipiente para imersão do coração; (3) Agitador magnético com aquecimento. O círculo na figura, destaca o coração sendo agitado.

4.6. Teste dos métodos de perfusão e imersão com agitação combinados com eletrodos

Os eletrodos de grafite foram usados no processo de decelularização devido à sua característica inerte e com o objetivo de aumentar a eficiência da remoção dos restos celulares através de atração entre cargas elétricas. Eletrodos com 2 mm de diâmetro foram ligados aos polos positivo e negativo de uma fonte de alimentação DC regulada (MPL

3303, Minipa, Brasil) e imersos nas soluções de decelularização durante os processos de perfusão e imersão com agitação como descrito nas seções 4.4 e 4.5, respectivamente. A FIG. 4.4 ilustra o processo de perfusão e a FIG. 4.5 ilustra o processo de imersão com agitação adicionando os eletrodos.

Durante todo o experimento, os eletrodos receberam uma tensão de $3,3V \pm 0,1V$. Eles foram trocados 14 horas, após o início do tratamento e eventualmente, quando houve quebra do mesmo durante o experimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. Os corações obtidos, após o tratamento, foram pesados e cortados, e as amostras, fixadas para microscopia ou congelados para análises futuras.

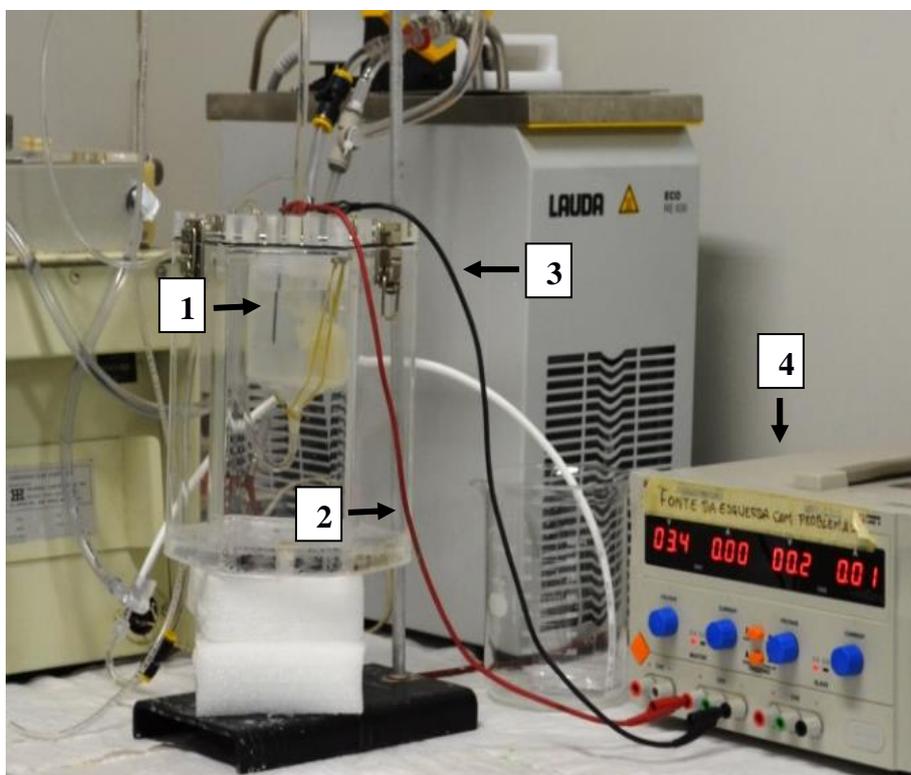


FIGURA 4.4. Inclusão de eletrodos no método de decelularização por perfusão. Além da máquina de perfusão, foram incluídos no processo: (1) Eletrodos ligados ao (2) polo positivo e ao (3) polo negativo de uma (4) fonte de alimentação.

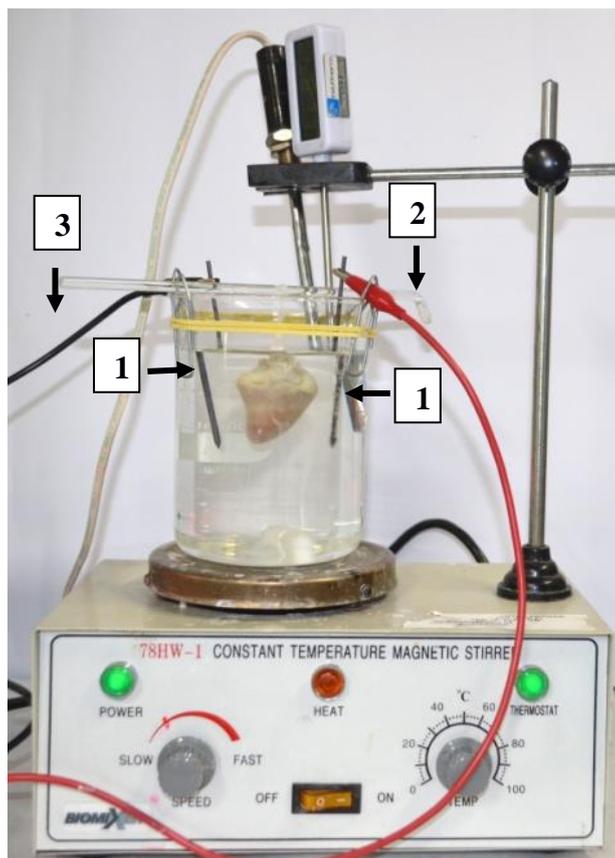


FIGURA 4.5. Inclusão de eletrodos no método de decelularização por imersão com agitação. Além dos equipamentos utilizados no processo de imersão com agitação, foram incluídos: (1) Eletrodos ligados ao (2) polo positivo e ao (3) polo negativo de uma fonte de alimentação.

4.7. Avaliação da eficiência dos métodos de decelularização testados, por meio de análises microscópicas, teste mecânico e biologia molecular.

4.7.1. Análises microscópicas

4.7.1.1. Microscopia ótica

A microscopia ótica foi escolhida para avaliar se há ausência de núcleos celulares nos corações tratados.

O preparo e as análises das lâminas foram realizados em parceria com o Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Cortes longitudinais e transversais da aorta e dos ventrículos de corações controle e tratados com as diferentes abordagens metodológicas, foram fixados em formol

10%, desidratados em concentrações crescentes de etanol (50% a 100%) e clareados com xilol para posterior infiltração e inclusão em parafina. Após a inclusão, os tecidos foram cortados em secções de 5µm em um micrótomo (RM2125RTS, Leica, Alemanha) e colocados sobre a lâmina de vidro que, posteriormente, foram desparafinizadas em estufa e xilol, e reidratados com concentrações decrescentes de etanol (70% a 100%) e água corrente (RAJABI-ZELETI et al., 2014).

Após coloração com hematoxilina e eosina (RAJABI-ZELETI et al., 2014), as lâminas foram novamente desidratadas e montadas com Entellan® (Merck, Estados Unidos). As análises foram realizadas em microscópio óptico (BX41, Olympus, Japão) em diferentes aumentos (40X, 100X e 200X) e as micrografias foram fotografadas no microscópio (BX40, Olympus, Japão) acoplado à câmera de vídeo digital de 5.0MP (Moticam 2500, Motic, China). Esta metodologia está esquematizada de forma simplificada na FIG. 4.6.

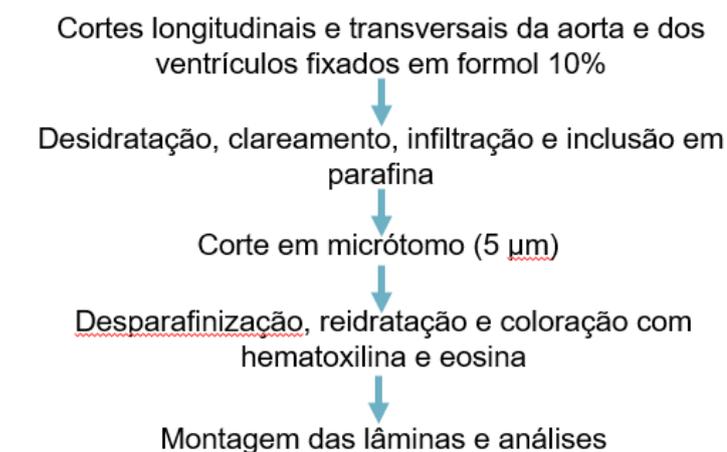


Figura 4.6. Esquema simplificado da metodologia utilizada no preparo das lâminas para análises de microscopia óptica.

4.7.1.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura foi escolhida para gerar imagens com maior nível de detalhes, avaliar a morfologia tridimensional da matriz extracelular e verificar a presença ou ausência de miofibrilas e estruturas vasculares.

A preparação das amostras e as imagens foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG.

Para dar início ao processo, cortes longitudinais e transversais do ventrículo esquerdo foram fixados em solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído e

paraformaldeído) e armazenados em geladeira por 48 horas. Após este período, a solução fixadora foi trocada por tampão fosfato 0,1M e permaneceram na geladeira até o prosseguimento do processo de preparo das amostras.

Posteriormente, as amostras foram fixadas novamente (fixação secundária) com tetróxido de ósmio e ácido tânico e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (30% a 100%). Na câmara de ponto crítico (EMCPD030, Leica, Alemanha), injetou-se CO₂ líquido que foi convertido em gás com o aumento de temperatura. Esse gás possibilitou que a pressão interna na câmara aumentasse, atingindo um ponto crítico de temperatura em que não há transição de fases, fazendo com que todo o líquido se convertesse em gás sem influência da tensão superficial. Depois da secagem, a amostra foi removida seca, sem alterações na forma.

As amostras foram então, montadas em suportes (*stub*) com fita adesiva de carbono e transferidas para a metalizadora (MED020, Bal-Tec.), onde foram metalizadas com uma camada de 10nm de ouro. A metalização faz com que elas se tornem condutoras e sejam capazes de interagir com o feixe de elétrons (CASTRO, 2011). As análises e a obtenção de eletromicrografias, foram feitas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta™ FEG 3D, FEI, Estados Unidos). As imagens foram obtidas a partir de feixes de elétrons com tensões aceleradoras de 5kV. Esta metodologia está esquematizada de forma simplificada na FIG. 4.7.

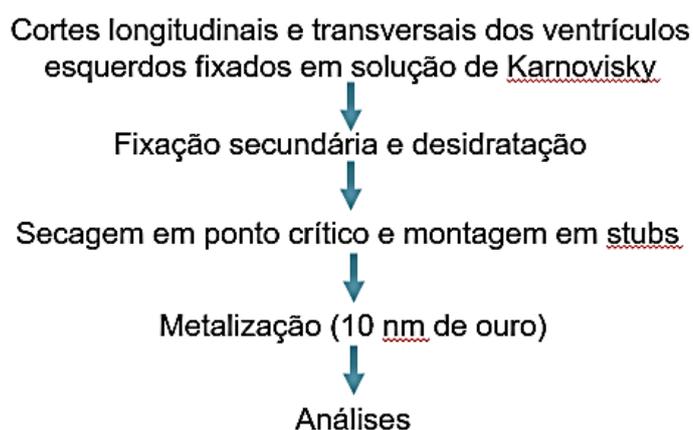


Figura 4.7. Esquema simplificado da metodologia utilizada no preparo dos stubs para análises de microscopia eletrônica de varredura.

4.7.2. Teste mecânico – Teste do balão de látex

Este teste foi realizado em corações do grupo controle e tratados para medir a estabilidade mecânica, por meio da resposta de pressão do ventrículo esquerdo à compressão e expansão de sua parede pelo aumento volumétrico de um balão. Um balão de látex acoplado a uma seringa e a um manômetro analógico (EN 837-3, DFX, Brasil) foi inserido no ventrículo esquerdo por meio da aorta (WEYMANN et al., 2011). A FIG. 4.8 representa o aparato utilizado para realização desse teste.

Uma quantidade variável de água foi injetada no balão por meio de uma seringa até que a pressão de reação das paredes do ventrículo do coração começasse a ser medida no manômetro, neste ponto o medidor foi zerado. Volumes de 0,5 mL de água foram injetados no balão e as pressões instantâneas em resposta aos diferentes volumes utilizados neste ensaio, foram medidas utilizando o manômetro. Como não havia protocolo disponível na literatura para este teste com corações de galinha, as pressões foram medidas com volumes de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mL.

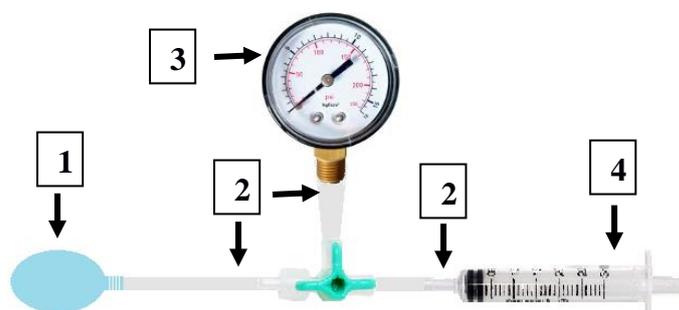


FIGURA 4.8. Esquema da estrutura utilizada para realização do teste do balão látex. O aparato para realização do teste continha: (1) balão acoplado a (2) tubos de silicone ligados a um (3) manômetro e, a uma (4) seringa, onde os volumes eram ministrados. Imagem meramente ilustrativa.

4.7.3. Análise de biologia molecular – Quantificação de RNA

Análises de biologia molecular foram realizadas para avaliar se houve manutenção de células viáveis na matriz através da presença de RNA.

Essa análise foi realizada em parceria com o Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foram realizados testes anteriores de quantificação de DNA, porém, os resultados obtidos foram inconclusivos e por este motivo optou-se por quantificar o RNA.

Para tal, foi feito um teste preliminar com duas amostras de corações do grupo controle e 2 amostras de cada tratamento, imersão com agitação e perfusão. Para conservação das amostras àquelas submetidas ao tratamento com o eletrodo não foram incluídas neste teste preliminar.

As amostras foram descongeladas em geladeira e secas com papel absorvente. O peso foi medido em balança de precisão (AY220, Marte®, Brasil) sendo 20 mg de tecido para amostras de corações controle e tratados com imersão e agitação, e devido à menor massa do coração perfundido, 15 mg para amostras tratadas com perfusão. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador mecânico (Power Gen 1000, Fisher Scientific, Estados Unidos) com 1mL de Trizol® (Life Technologies, Estados Unidos) e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, foi adicionado 200µL de clorofórmio (Synth®, Brasil), agitado vigorosamente em um agitador de bancada (Classic, Velp Scientifica, Itália), por 15 segundos, e novamente incubado por 2 minutos em temperatura ambiente. Os tubos então foram centrifugados a 14000 rpm, por 15 minutos, a uma temperatura de 4°C. Após completa centrifugação, o conteúdo do tubo apresentou 3 fases, porém apenas a primeira fase aquosa incolor, onde permanece o RNA, foi coletada e transferida para outro tubo (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). A quantificação de cada amostra foi feita em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos), utilizando absorbância de 260 nm e 280 nm. Os valores do conteúdo de RNA nas amostras foram expressos em nanogramas de RNA por miligrama de tecido seco. Esta metodologia está esquematizada de forma simplificada na FIG. 4.9.

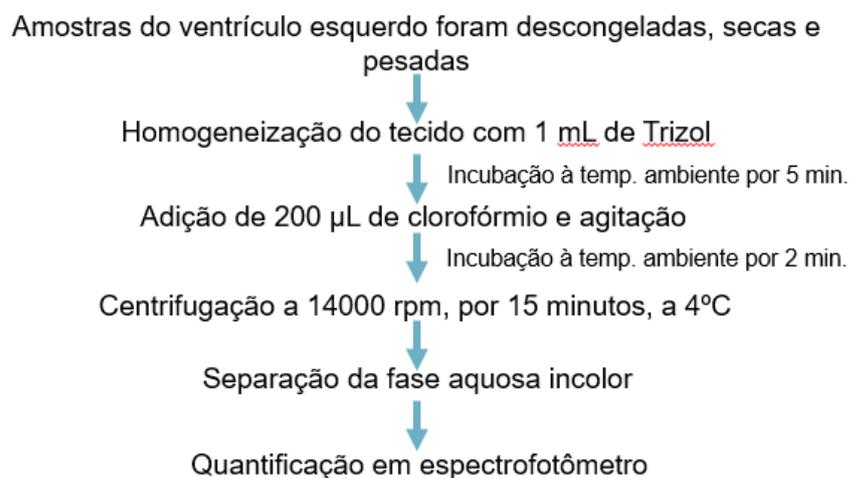


Figura 4.9. Esquema simplificado da metodologia utilizada para quantificação de RNA.

4.8. Análises Estatísticas

Os experimentos de estabilidade mecânica foram realizados em triplicatas. As variáveis testadas foram pressão e volume, classificadas como contínuas e distribuição paramétrica (coeficiente de variação menor do que 50%). O tratamento estatístico contemplou análise de variância para comparações entre os grupos e teste *t* para análises de pareamento. O intervalo de confiança usado foi 95% e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (SAMPAIO, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Modificação do protocolo de perfusão descrito na literatura

Neste trabalho, optou-se por reproduzir o protocolo estabelecido por Weymann et al. (2011) pois o mesmo não utiliza enzimas ou outra solução capaz de causar danos à matriz. Os autores reportam bons resultados em relação à manutenção da estabilidade mecânica da mesma, após a decelularização, quando comparado com o trabalho de Wainwright et al. (2010) que utilizou em seu protocolo, além do detergente, solução ácida, quelante, hipotônica e tripsina. Estas observações são sustentadas por Merna et al. (2013) que mostram que o uso de enzimas, como tripsina, causa um enfraquecimento da matriz quando comparado ao tratamento realizado com detergente. Neste mesmo sentido, Castro Brás et al. (2013) mostraram que somente protocolos de decelularização que continham o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) foram realmente eficientes para a remoção de células e restos celulares em amostras de ventrículo esquerdo.

No entanto, os resultados obtidos por Weymann et al. (2011) também apontam que a matriz obtida após o processo de decelularização ainda apresentavam núcleos celulares, bem como uma reduzida quantidade de DNA, que tem grande potencial imunogênico e pode levar à perda do órgão (WONG; GRIFFITHS, 2014; BADYLAK; GILBERT, 2008). Portanto, na tentativa de estabelecer um protocolo mais eficiente, capaz de remover completamente as células e restos celulares, como DNA, foram propostos métodos mecânicos alternativos à perfusão e o método químico foi modificado conforme os resultados observados nos testes-piloto.

5.1.1. Testes-piloto

5.1.1.1. Testes-piloto com o método de perfusão

Testes iniciais de perfusão realizados à temperatura ambiente mostraram-se ineficientes em relação àqueles realizados por Weymann et al. (2011) a 37°C, uma vez que, apesar da diferença em relação ao coração antes do tratamento (FIG. 5.1A), os

corações tratados à temperatura ambiente não foram visivelmente decelularizados e ainda permaneceram com tecido muscular no ventrículo esquerdo e, principalmente, na região entre o átrio e o ventrículo (FIG 5.1B). Por isso a temperatura de 37°C foi mantida.

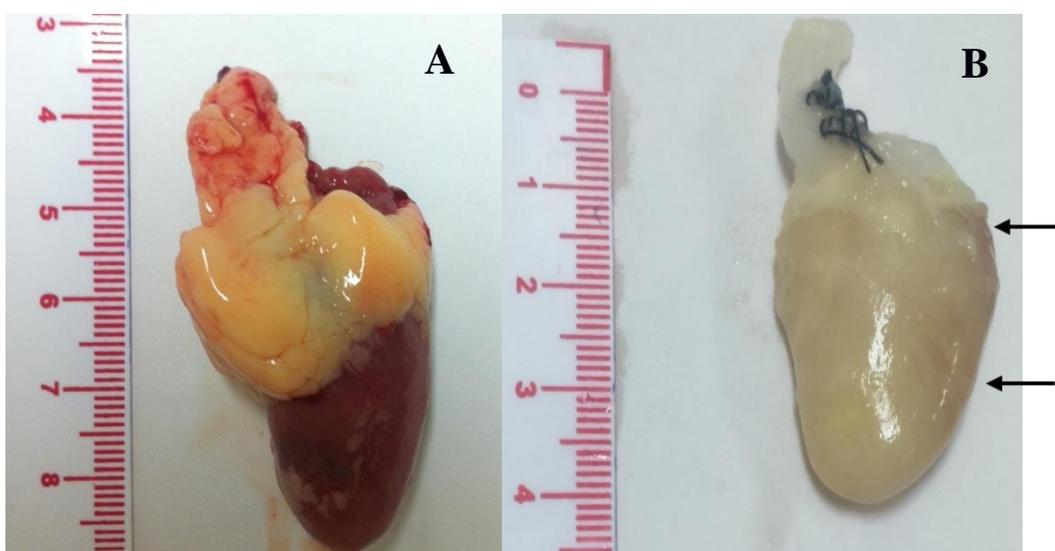


FIGURA 5.1. Teste-piloto de perfusão à temperatura ambiente. Imagens do coração antes e depois do tratamento de perfusão à temperatura ambiente. (A) Coração antes do tratamento de perfusão (o excesso de gordura foi retirado para realização do experimento). (B) Depois do tratamento de perfusão, manutenção de tecido muscular na região atrioventricular e no ventrículo esquerdo (setas).

Estes resultados apontaram que a temperatura influencia no processo, aumentando sua eficiência, uma vez que o processo realizado em temperaturas menores (ambiente) foi menos efetivo na remoção do tecido em comparação com aqueles realizados a 37°C. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Oberwallner et al. (2014), que mostraram que protocolos de decelularização de miocárdio humano desenvolvidos a 4°C foram mais lentos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o uso de temperaturas muito altas, acima da temperatura fisiológica, pode levar à desnaturação das proteínas danificando a matriz extracelular.

Corações que não foram limpos corretamente também apresentaram tecido muscular remanescente em pontos bem delimitados do ventrículo esquerdo, e também na região atrioventricular, o que pode ser explicado pela oclusão dos vasos por um coágulo de sangue, impedindo a passagem das soluções de decelularização.

5.1.1.2. Testes-piloto com o método de imersão com agitação

Os testes iniciais de imersão com agitação realizados à temperatura ambiente não apresentaram resultados macroscópicos diferentes em relação àqueles realizados à 37°C. Em ambos, houve clareamento da superfície externa do coração, flacidez e branqueamento da região atrial, artéria pulmonar e aorta (FIG. 5.2B), comparando-se ao coração antes do tratamento (FIG. 5.2A). A retirada do excesso de gordura contribuiu para o aumento da superfície de contato, essencial para o processo, tendo em vista a importância do contato das soluções de decelularização com a superfície do órgão no processo de imersão com agitação.

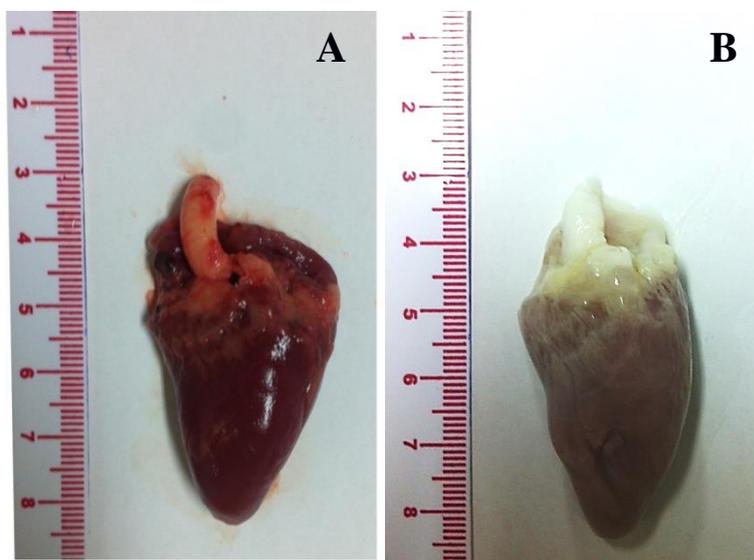


FIGURA 5.2. Teste-piloto de imersão com agitação à temperatura ambiente. (A) Coração antes do tratamento. (B) Coração depois do tratamento de imersão com agitação, coloração mais clara e manutenção do tecido muscular em toda a região ventricular.

Além disso, durante os experimentos de imersão com agitação e perfusão, observou-se que a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) 1X foi determinante para a remoção do tecido muscular visível do coração. Sendo assim, optou-se por aumentar o número de trocas de dodecil sulfato de Sódio (SDS) e, por consequência, o número de lavagens com PBS 1X, além de realizar uma troca de PBS 1X, após 12 horas, para reduzir a saturação da solução com restos celulares e aumentar a eficiência do processo.

5.2. Teste do método mecânico de perfusão utilizando protocolo modificado

Os resultados macroscópicos observados durante o processo de perfusão variaram entre os corações, porém o objetivo final de obter o coração visivelmente decelularizado foi alcançado no final do processo. Essas diferenças de resposta podem ser explicadas devido às variações fisiológicas e morfológicas naturais entre os corações.

No início do processo de perfusão, a pressão medida foi em média de 150 mbar. Após 3 horas de perfusão, a pressão ficou menor, variando entre 50 e 100 mbar e permanecendo entre 30 e 50 mbar, após 6 horas. As diferenças de pressão observadas entre os corações podem ter sido influenciadas pelas suturas feitas manualmente na aorta, porém, a redução da pressão de perfusão no decorrer das lavagens também foi relatada por Wainwright et al. 2010.

De forma geral, na primeira lavagem com PBS, o líquido (perfusato) fica avermelhado e é possível ver o jato saindo do coração pelo átrio direito, vindo pelo seio coronário e pela artéria pulmonar, o que indica que a perfusão foi realizada de forma correta. Após 2 horas de tratamento, os ventrículos já exibiam pontos mais claros e, após 7 horas, o coração já estava esbranquiçado em quase toda a sua extensão. Ao final do tratamento completo com SDS (13 horas), alguns corações estavam completamente esbranquiçados enquanto outros ainda tinham alguns pontos amarronzados, que foram completamente removidos após lavagem *overnight* de 12 horas com PBS 1X. Na perfusão, as soluções após a lavagem têm sua turbidez reduzida à medida que o processo ocorre.

Ao final do processo de perfusão, após 37 horas, comparando-se com o estado inicial antes do tratamento (FIG. 5.3A), os corações não continham pontos de tecido visíveis, apresentavam cor branca/amarelada e textura flácida (FIG 5.3B). As mesmas características foram observadas no interior do coração tratado, após corte frontal do ventrículo esquerdo (FIG. 5.3C).

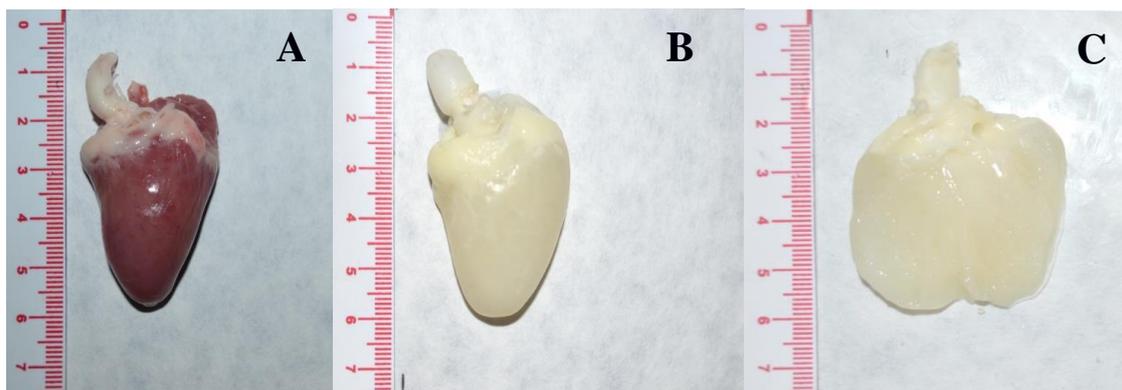


FIGURA 5.3. Imagens do coração antes e depois do tratamento com o método de perfusão. (A) Antes do tratamento de perfusão. (B) Depois do tratamento de perfusão, com aspecto esbranquiçado e flácido. (C) Interior do ventrículo esquerdo em corte longitudinal após o tratamento, completamente esbranquiçado com ausência de tecido muscular visível.

Os corações tiveram sua massa reduzida em 35,6%, comparando-se com a massa inicial antes do tratamento, o que indica que houve remoção de componentes do tecido.

5.3. Teste do método de imersão com agitação utilizando protocolo modificado

No método de imersão com agitação, o processo de decelularização foi mais evidente na região atrial, aorta e artéria pulmonar. Após 2 horas de lavagem, a artéria pulmonar já se encontrava translúcida, o que começou a ocorrer com os átrios após 4 horas de lavagem. Neste mesmo tempo, a aorta tornou-se mais esbranquiçada. Após o tratamento com SDS (13 horas), a região superior do coração apresentava-se translúcida, porém o tecido muscular da região ventricular foi mantido. Após lavagem *overnight* com PBS 1X por 12 horas, a solução de lavagem estava turva e o coração tornou-se mais claro em relação à condição inicial. Em relação às características apresentadas pelo coração antes do tratamento (FIG. 5.4A), não houve mudanças expressivas até o final do processo, o tecido muscular foi mantido nos ventrículos, apesar disso, o ventrículo direito ficou mais flácido, e a região superior de grandes vasos e átrios estava translúcida e esbranquiçada (FIG. 5.4B).

Ao final, após 37 horas de tratamento, o interior do órgão que permaneceu visivelmente inalterado (FIG 5.4C), mantendo inclusive restos de sangue coagulado, o que indica que as soluções não alcançaram o interior do órgão. Ainda, foi possível verificar no corte frontal do ventrículo esquerdo uma fina camada externa, mais clara (FIG. 5.5), em relação às outras camadas do miocárdio, o que sugere que a decelularização ocorreu na região mais externa, em contato com o líquido em movimento.

Os corações tratados tiveram uma redução de massa de 23%, em relação à massa inicial antes do tratamento, o que indica que houve remoção de material do órgão, porém, em menor quantidade quando comparado ao que foi obtido com o método de perfusão.

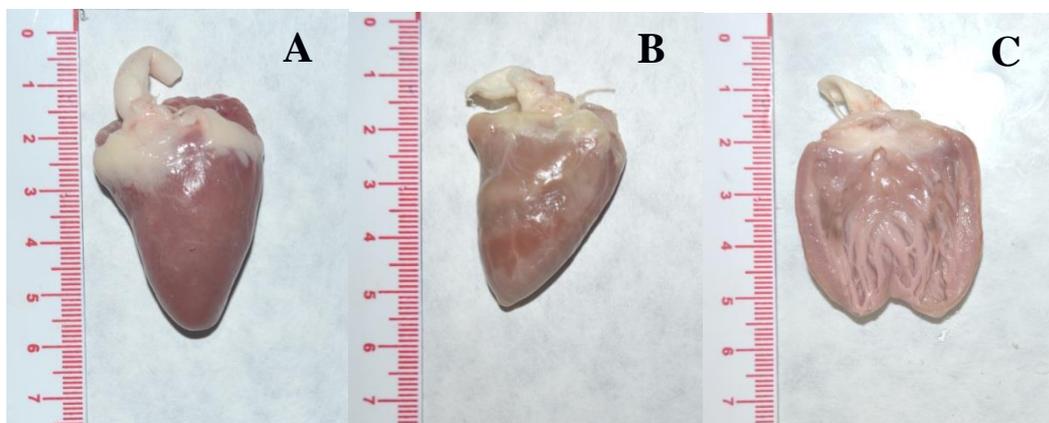


FIGURA 5.4. Imagens do coração antes e depois do tratamento com o método de imersão com agitação. (A) Antes do tratamento. (B) Depois do tratamento, apresenta coloração mais clara e maior flacidez na região atrial mais esbranquiçada e no ventrículo direito, porém ventrículo esquerdo mantém o tecido muscular. (C) Interior do ventrículo esquerdo em corte longitudinal após o tratamento, com tecido muscular presente.

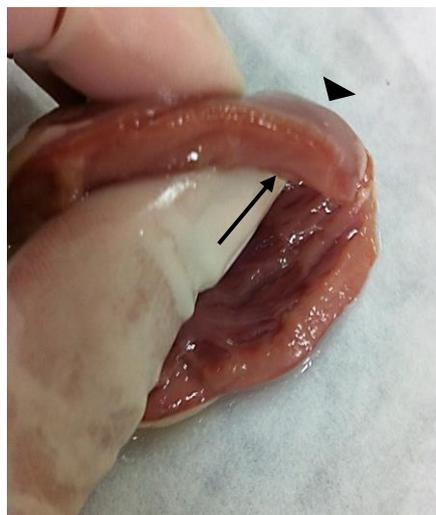


FIGURA 5.5. Detalhe do ventrículo esquerdo após imersão com agitação. Houve uma diferença de coloração entre o exterior do coração (cabeça de seta), em contato com as soluções de lavagem, e o interior do órgão (seta), após final do processo de imersão com agitação. O miocárdio permanece com coloração avermelhada enquanto a superfície externa se apresenta mais clara com uma camada esbranquiçada.

Resultados macroscópicos indicam que o método de perfusão foi mais eficiente do que o método de imersão com agitação, na remoção do tecido muscular do

coração. Crapo; Gilbert; Badylak (2011), citam a maior eficiência na decelularização de pulmão utilizando o método de perfusão em detrimento da agitação, tendo em vista a diferença de duração entre os protocolos. Métodos de imersão com agitação são usados na decelularização de válvulas cardíacas (YU et al., 2013), traqueia (MACCHIARINI et al., 2008), bexiga (YANG et al., 2010; FREYTES; STONER; BADYLAK, 2008), derme (REING et al. 2010, XU et al., 2008), esôfago (OZEKI et al., 2006) ou pedaços do miocárdio (OBERWALLNER et al., 2014;), pericárdio (RAJABI-ZELETI et al., 2014) e ventrículo direito (CASTRO BRÁS et al., 2013). Os protocolos utilizados para tecidos cardíacos seccionados foram capazes de produzir uma matriz extracelular viável, porém, diferente do protocolo utilizado neste trabalho, os métodos utilizaram outras soluções de decelularização, como um segundo detergente ou enzimas, e o tempo para completar o processo foi maior. Tecidos mais delgados podem ser efetivamente decelularizados por este método em um curto tempo, enquanto tecidos mais espessos e densos requerem protocolos mais prolongados (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011), como é o caso do coração.

A aorta permaneceu íntegra durante todos os experimentos realizados tanto com perfusão quanto com imersão com agitação. Mesmo após todos os tratamentos, não foram observadas rupturas nesta artéria, o que era esperado, já que, vasos arteriais, possuem naturalmente grande resistência para suportar altas tensões durante todo o tempo (ROBERTSON et al., 2014). Assim, a aorta pode ser considerada uma boa via de sustentação do coração em processos de decelularização e recelularização.

5.4. Teste dos métodos de perfusão e imersão com agitação combinados com eletrodos

A inclusão do eletrodo no processo de imersão com agitação e no processo de perfusão não alterou visivelmente a eficiência dos métodos. Os padrões de resposta ao tratamento foram mantidos. Entretanto, durante os experimentos, foi possível observar formação de bolhas nos eletrodos, menor turbidez da solução, aderência de coágulos de sangue (FIG. 5.6A) e depósito de material no eletrodo positivo tanto na imersão com agitação (FIG. 5.6B) quanto na perfusão (FIG. 5.6C).

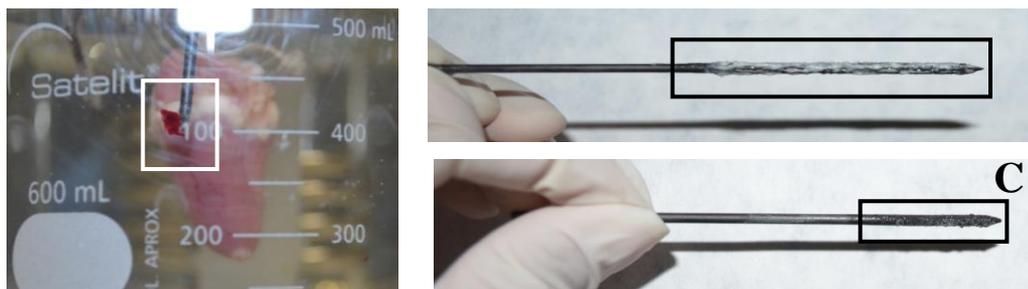


FIGURA 5.6. Depósito de material no eletrodo positivo. (A) Coágulo de sangue aderido ao eletrodo positivo no processo de imersão com agitação. (B) Eletrodo positivo ao final do processo de imersão com agitação apresentando resíduos aderidos. (C) Eletrodo positivo ao final do processo de perfusão apresentando resíduos aderidos.

A FIG. 5.7 representa aqueles corações tratados com perfusão incluindo o eletrodo. Antes do tratamento o coração possuía cor avermelhada e tecido firme (FIG. 5.7A), depois do tratamento o coração estava flácido e esbranquiçado (FIG. 5.7B). A FIG. 5.8 representa os corações tratados com imersão e agitação, antes e depois do tratamento. Eles apresentam cor mais clara em relação ao que foi observado antes do tratamento (FIG. 5.8A) com região atrial translúcida e flácida. O ventrículo direito também se apresentou mais flácido, entretanto foi possível observar manutenção do tecido muscular na região ventricular (FIG. 5.8B).

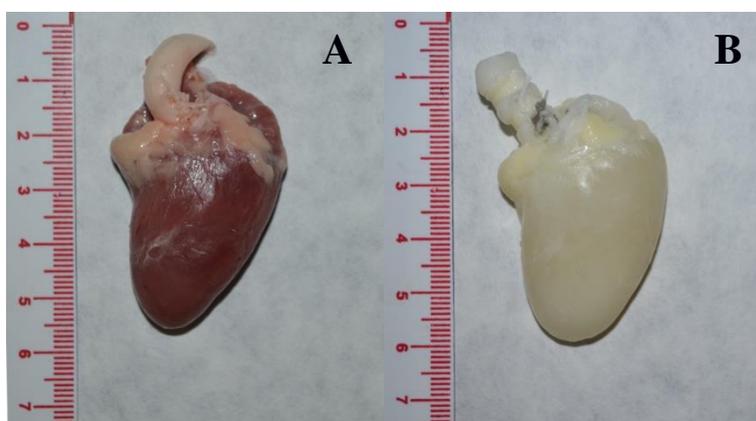


FIGURA 5.7. Imagens do coração antes e depois do tratamento de perfusão com adição do eletrodo. (A) Antes do tratamento. (B) Depois do tratamento.

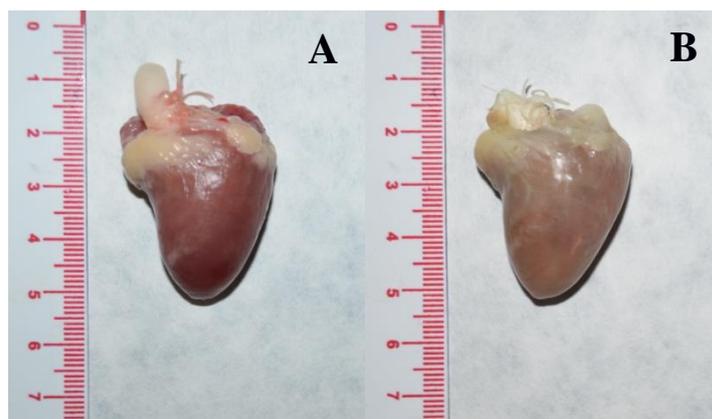


FIGURA 5.8. Imagens do coração antes e depois do tratamento de imersão com agitação e adição do eletrodo. (A) Antes do tratamento. (B) Depois do tratamento.

A redução de massa observada nos experimentos de imersão com agitação adicionando o eletrodo foi de 16% enquanto nos experimentos de perfusão com eletrodo esta redução foi de 36% em relação à massa inicial, antes do tratamento. Estes valores são semelhantes àqueles obtidos nos testes sem o eletrodo, e indicam que o a adição do eletrodo parece não influenciar no processo, sendo a perfusão ainda mais eficiente na remoção de componentes do tecido. A tabela completa com os valores das massas medidas para todos os tratamentos está disponível no ANEXO A.

A remoção dos restos celulares, promovido pela adição dos eletrodos nos processos, ocorreria, uma vez que as células tenham sido fragmentadas pelo detergente ou pelo método mecânico empregado. Esta remoção se daria por meio da interação entre as cargas elétricas dos polos positivo e negativo com as cargas dos componentes celulares, dessa forma, os restos celulares seriam atraídos para os eletrodos. Os principais componentes celulares naturalmente carregados são: DNA carregado negativamente devido aos grupamentos fosfato (ROSELINO, 2008), proteínas que tem carga total definida pelos aminoácidos que as compõem e fosfolipídios de membrana que possuem uma extremidade polar (QUILLFELDT, 2005).

Entretanto, os resultados observados neste trabalho sugerem que houve uma interação entre as cargas elétricas dos eletrodos e as moléculas do SDS, que possuem caráter aniônico, bem como a aderência de material orgânico, porém, a força de atração não foi suficiente para promover uma remoção mais efetiva dos restos celulares, que pudesse tornar o processo mais rápido ou eficiente.

Este trabalho foi pioneiro em utilizar eletrodos no processo de decelularização, pois, não foram encontrados trabalhos para comparação que reportam

dados relacionados ao uso de força elétrica como método de decelularização ou da interação da mesma com tecidos. Apesar da necessidade de mais estudos e ajuste de parâmetros, este método pode reduzir a necessidade da utilização de produtos químicos e enzimáticos nos processos de decelularização. Gilbert (2012) sugere que o estabelecimento de novos métodos de decelularização é importante para reduzir a possibilidade de retenção de resíduos das soluções na matriz.

5.5. Avaliação da eficiência dos métodos de decelularização testados, por meio de análises microscópicas, teste mecânico e biologia molecular.

5.5.1. Análises microscópicas

5.5.1.1. Microscopia óptica

Nas amostras coradas com hematoxilina e eosina, o citoplasma é corado em rosa e os núcleos celulares em roxo. A FIG (5.9) mostra os resultados comparativos entre os corações controle e tratados. Os corações utilizados como controle apresentaram um tecido muscular denso e organizado, com típicos discos intercalares unindo as células, que demonstram a integridade do tecido (FIG. 5.9A).

Os órgãos tratados por meio do método de imersão com agitação (FIG. 5.9B) exibiram, no miocárdio, tecido muscular denso, porém desorganizado, apresentando espaços livres entre as células e ausência de discos intercalares visíveis, o que indica que o processo de decelularização, mesmo ineficiente, pode ter afetado o tecido. O mesmo foi observado nos corações tratados com o método de imersão com agitação adicionando os eletrodos (FIG. 5.9C). Ainda em corações tratados com imersão e agitação, a FIG. 5.9D mostra o epicárdio deste órgão com ausência de células mesoteliais, o que confirmou que a decelularização ocorre apenas nas camadas mais externas. Em contrapartida, os corações tratados pelo método de perfusão (FIG. 5.9F) apresentaram ausência de células em todas as camadas do órgão, confirmando maior eficiência do método para a remoção de células em relação à agitação mecânica. Não foi possível observar diferenças histológicas significativas entre os corações tratados sem o eletrodo em relação àqueles tratados com o eletrodo.

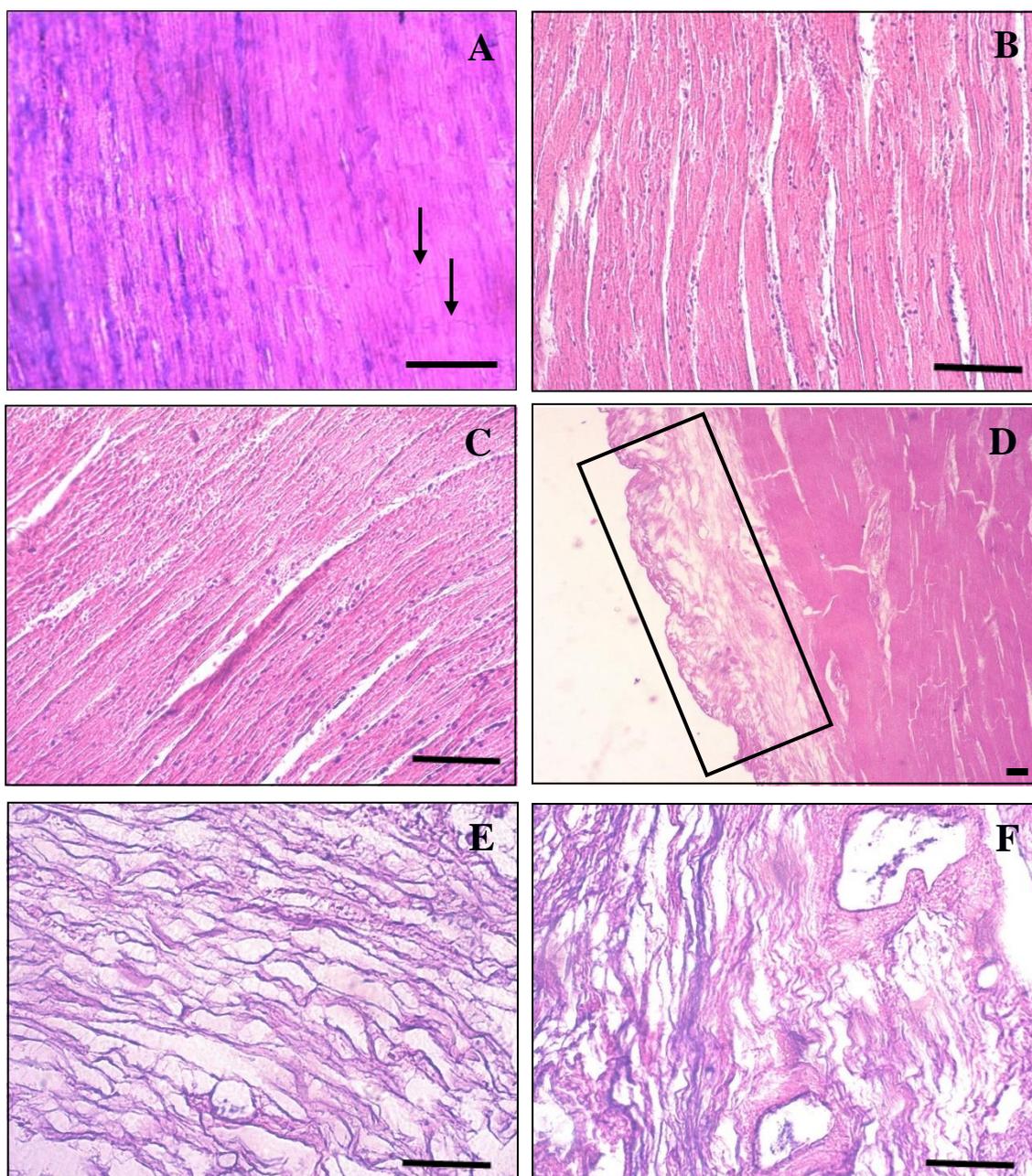


FIGURA 5.9. Fotomicrografias dos ventrículos esquerdos dos corações controle e tratados corados com hematoxilina e eosina. (A) Miocárdio do coração controle apresentou estrutura densa e organizada de células musculares longitudinais unidas por discos intercalares (setas); (B e C) Miocárdio do coração tratado com o método de imersão com agitação sem o eletrodo (B) e com o eletrodo (C) exibiu células musculares longitudinais com espaços livres entre elas e ausência de discos intercalares; (D) Em destaque, epicárdio do coração tratado com imersão e agitação mostrou ausência de células, ao contrário do que foi observado no miocárdio. (E e F) Miocárdio de corações tratados com método de perfusão sem o eletrodo (E) e com o eletrodo (F) apresentou ausência de células. A, B, D, E, F: Aumento de 200X. C: Aumento de 40X. Barra de escala: 50 μ m

De acordo com o que foi observado macroscopicamente, os resultados obtidos com as análises histológicas dos ventrículos dos corações controle e tratados confirmaram que apenas os métodos de perfusão foram eficientes para remover as células

do órgão, enquanto os métodos de imersão com agitação conservaram o tecido muscular no interior do coração, que apresentou-se decelularizado apenas na camada mais externa em contato com as soluções de decelularização. Esta remoção das células na camada mais externa foi estimulada, provavelmente, pelo atrito e pela tensão de cisalhamento do movimento laminar das soluções de decelularização em contato com a superfície do coração. Estes resultados indicam que as soluções tiveram grande dificuldade de se difundirem pelo ventrículo, não alcançando assim, as camadas mais internas do órgão. A espessura da parede ventricular é maior do que a barreira de difusão (aproximadamente 100µm), o que dificulta a remoção das células no interior do órgão (SARIG; MACHLUF, 2011; KAULLY et al., 2009).

Por outro lado, na perfusão, o uso da própria rede vascular do órgão leva as soluções de decelularização a todas as regiões e promove uma decelularização uniforme mesmo nas camadas mais internas. Além disso, a pressão permitiu a dilatação dos vasos, diminuindo efetivamente a distância de difusão entre as células e aumentando a vazão facilitando a remoção do material celular (WAINWRIGHT et al., 2010).

Além de ser eficiente na remoção de grande parte das células do tecido muscular do coração, o método de perfusão ainda mantém íntegro, mesmo após o tratamento, o arcabouço dos vasos sanguíneos de maior calibre como artérias, veias, arteríolas e vênulas, um importante fator para a recelularização futura, no auxílio à manutenção da viabilidade celular e angiogênese. A rede vascular leva os nutrientes a todas as células, reduzindo assim a taxa de morte celular durante a recelularização (WANG et al., 2010; ROBERTSON et al., 2014).

A FIG. 5.10 ilustra os vasos sanguíneos preservados no ventrículo esquerdo dos corações perfundidos sem o eletrodo (B) ou com a adição do mesmo (C). Diferente do controle (FIG. 5.10A), os vasos sanguíneos dos corações tratados (FIG. 5.10B e C) não apresentam núcleos celulares. Apesar disso, as formas foram visivelmente mantidas, o que sugere a manutenção da camada adventícia rica em matriz extracelular.

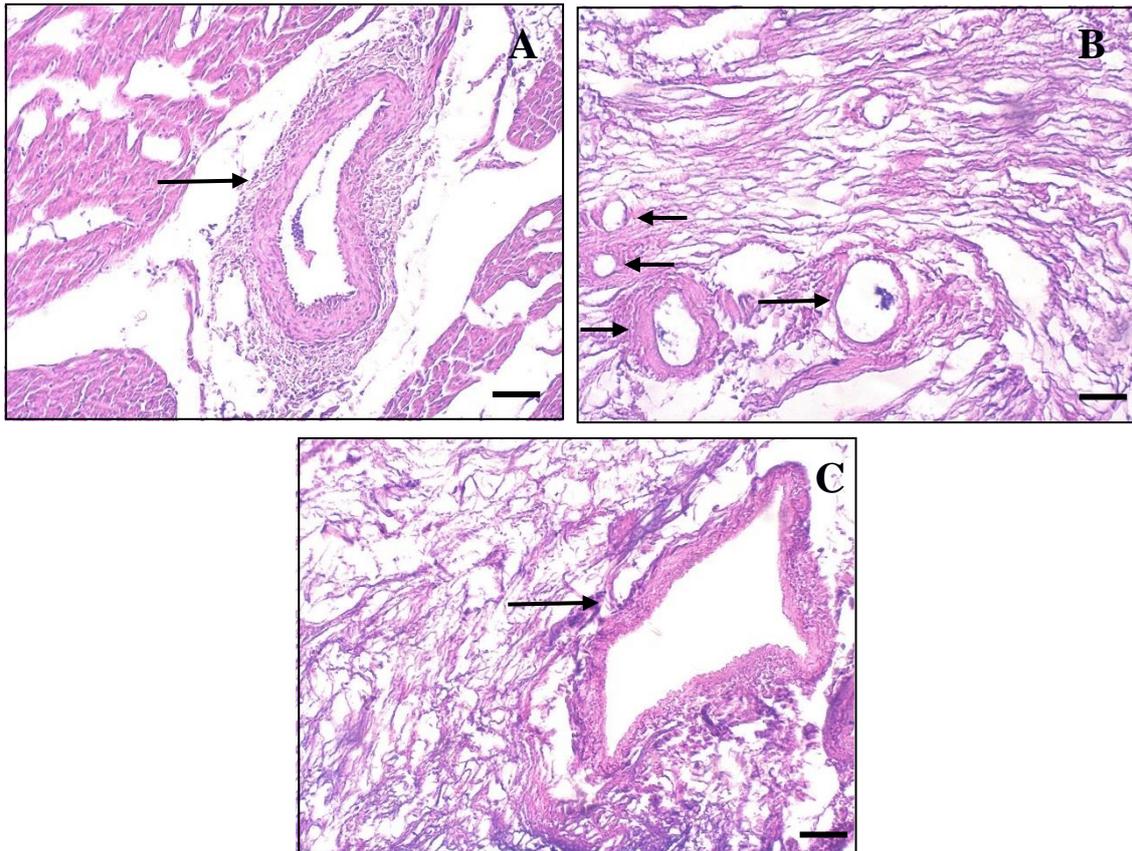


FIGURA 5.10. Fotomicrografias de vasos sanguíneos presentes no ventrículo esquerdo dos corações controle e perfundidos, corados com hematoxilina e eosina. (A) Vaso sanguíneo no coração controle (seta) apresentaram espessa camada de células. (B e C) Vasos sanguíneos preservados nos corações tratados (setas) com método de perfusão sem o eletrodo (B) e com o eletrodo (C) apresentaram ausência de células e manutenção de sua forma. Aumento: 100X. Barra de escala: 50 μ m

Análises de microscopia ótica confirmaram ainda que a aorta foi decelularizada com todos os métodos de decelularização testados neste trabalho. As aortas dos corações controle apresentaram camadas de células musculares e lâmina elástica na túnica média (FIG. 5.11A). Em contrapartida, as aortas dos corações tratados com os métodos de imersão com agitação (FIG. 5.11B) e perfusão (FIG 5.11C) não apresentaram núcleos celulares, evidenciando a preservação da lâmina elástica, o que explica sua alta resistência durante o processo de decelularização em todos os testes.

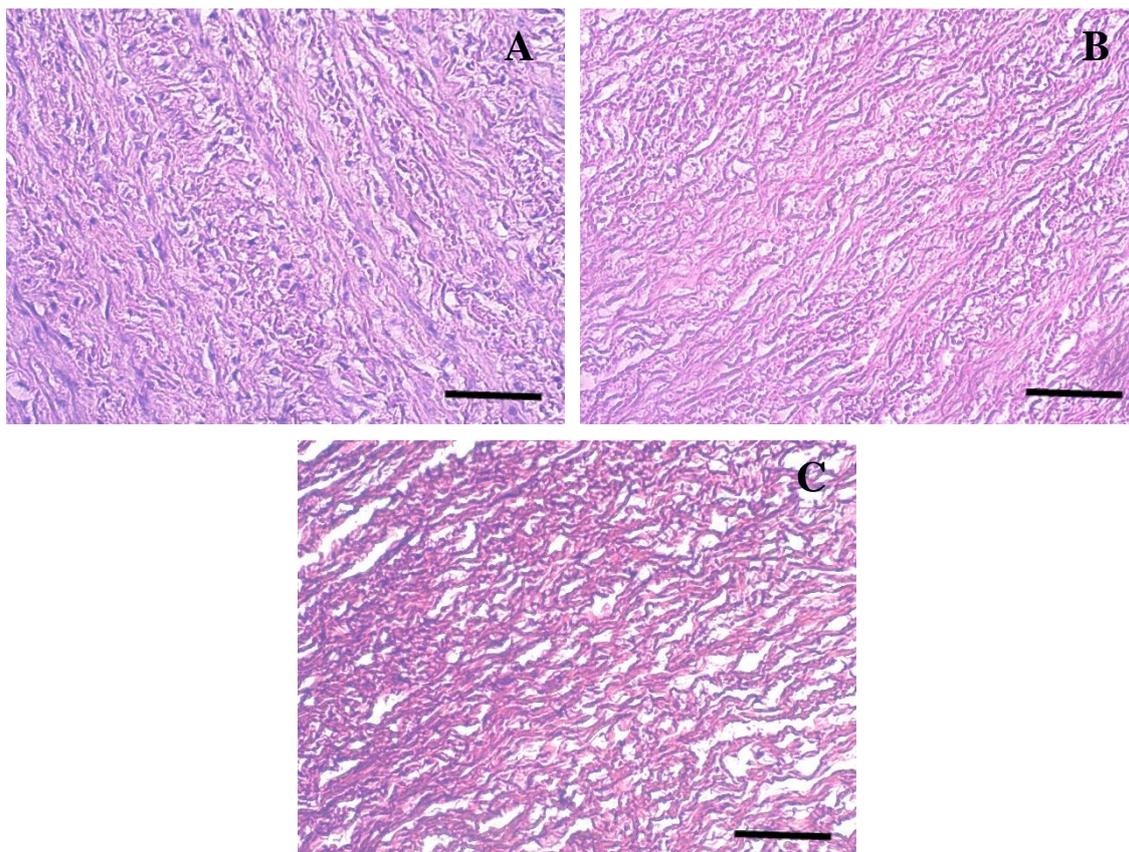


FIGURA 5.11. Fotomicrografias da aorta dos corações controle e tratados corados com hematoxilina e eosina. (A) Túnica média da aorta do coração controle evidenciou as camadas de células musculares juntamente com as fibras elásticas. (B) Túnica média da aorta do coração tratado com o método de imersão com agitação. (C) Túnica média da aorta do coração tratado com o método de perfusão. Ambas (B e C), apresentaram ausência de células e manutenção das fibras elásticas. Aumento: 200X. Barra de escala: 50 μ m

5.5.1.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura confirmou os resultados observados macroscopicamente e por meio de microscopia ótica. Os ventrículos esquerdos dos corações controle (FIG. 5.12A) apresentaram, tanto no miocárdio, quanto no endocárdio, fibras musculares orientadas em diferentes sentidos, bem como, estruturas da matriz extracelular. No epicárdio, observou-se, mesotélio preservado (FIG. 5.13A e B). Nos corações tratados com o método de imersão com agitação, o ventrículo esquerdo apresentou o mesmo aspecto observado no órgão controle (FIG 5.12B), exceto no epicárdio, onde confirmou-se a ausência de células mesoteliais e preservação da lâmina basal rica em fibras da matriz extracelular (FIG. 5.13C e D).

Nos ventrículos dos órgãos tratados com o método de perfusão, foi possível verificar grande predomínio de matriz extracelular íntegra com fibras de colágeno

distribuídas de forma aleatória ou organizadas em grandes feixes de forma a estruturar uma rede de sustentação para as células juntamente com outras proteínas da matriz. A ausência de células é observada em todas as camadas do órgão e pode ser caracterizada pelos espaços vazios entre a matriz, sendo o endocárdio ilustrado pela FIG. 5.12D e o epicárdio ilustrado pela FIG. 5.13E e F. Corações tratados com o eletrodo, tanto no método de imersão com agitação (FIG. 5.12C) quanto no método de perfusão (FIG. 5.12D e E) apresentaram as mesmas características daqueles tratados sem o eletrodo, portanto, não foi possível determinar se a inclusão do eletrodo influenciou na eficiência do processo, uma vez que não houve diferenças entre os resultados.

A manutenção da integridade da matriz extracelular é muito importante, pois as fibras de colágeno, elastina e proteoglicanas são elementos críticos para o perfil biomecânico do corpo, principalmente no sistema cardiovascular (FOMOVSKY; THOMOPOULOS; HOLMES, 2010). Além disso, ela será essencial para induzir a diferenciação e a proliferação de células endoteliais e musculares com propriedade contrátil (OTT et al., 2008).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmam a maior eficiência do método de perfusão para a remoção de células de órgãos inteiros em comparação com o método de imersão com agitação. Algumas imagens, porém, mostram nos corações perfundidos, estruturas fibrilares que não permitiram concluir se são feixes de fibras de colágeno ou restos de proteínas contráteis, actina e miosina, o que pode indicar que, por mais que não haja células inteiras, ainda há restos celulares na matriz. O mesmo foi observado por Methe et al. (2014), que confirmaram as observações por meio de microscopia eletrônica de transmissão, e por Daly et al. (2012), em um estudo de decelularização de pulmão. Este último mostrou que peptídeos de proteínas como actina, tubulina e miosina persistem na matriz extracelular, após o processo. Ao contrário, Ott et al. (2008) e Eitan et al. (2010) mostraram que a actina estava ausente em matrizes decelularizadas de corações, o que indica, que o método de decelularização influencia na remoção destas proteínas, já que cada um destes autores utilizou métodos químicos diferentes. Este resultado deve ser melhor investigado, pois, a retenção de qualquer resto celular pode ser imunogênica.

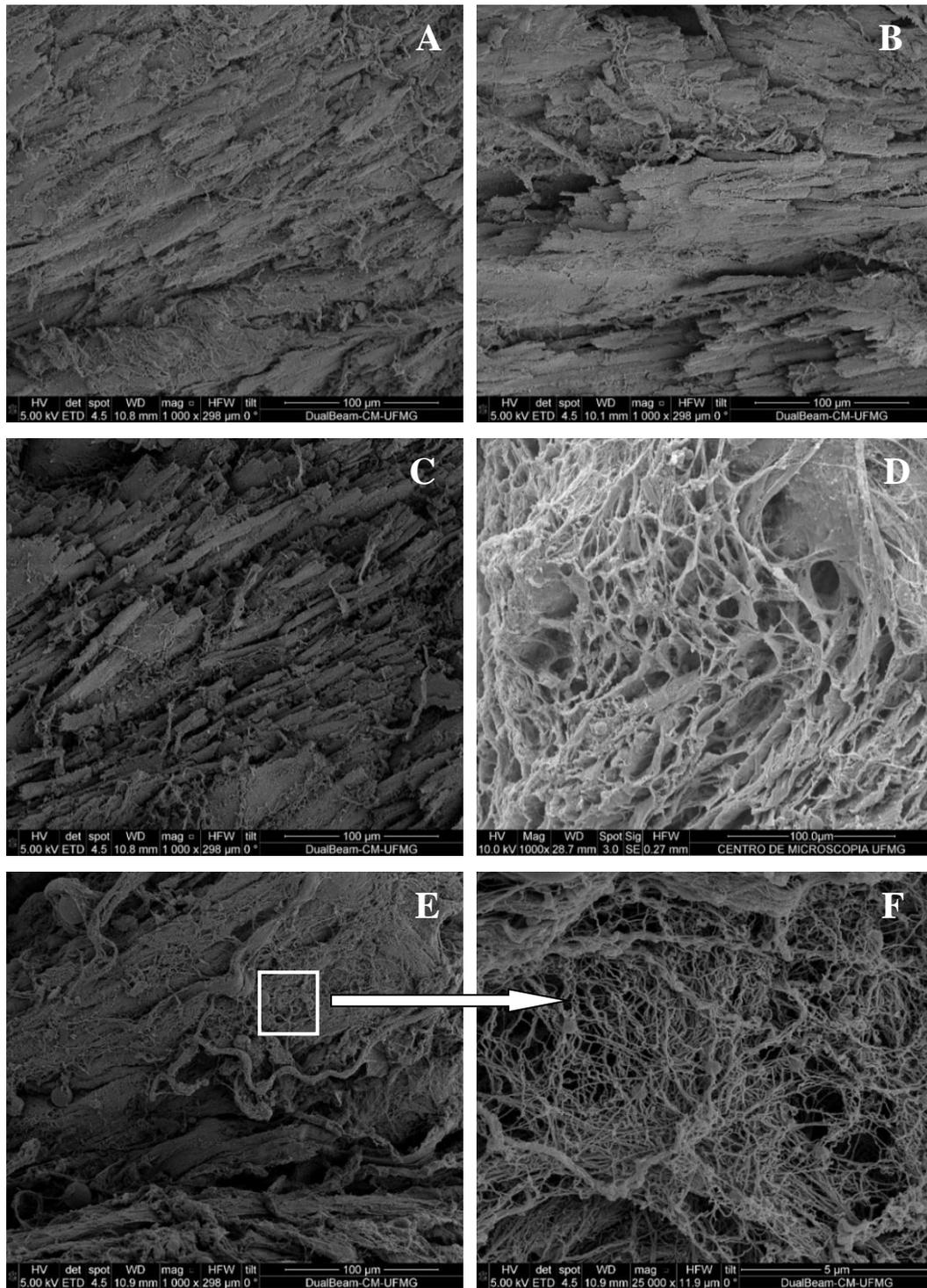


FIGURA 5.12. Eletromicrografias do ventrículo esquerdo de corações controle e tratados. (A) Miocárdio dos corações controle exibiram células musculares orientadas em diferentes sentidos, envolvidas por matriz extracelular; (B e C) Miocárdio dos corações tratados por imersão com agitação sem o eletrodo (B) e com o eletrodo (C) apresentaram o mesmo perfil apresentado pelo controle; (D e E) Endocárdio dos corações tratados com perfusão sem o eletrodo (D) e com o eletrodo (E) apresentaram matriz extracelular preservada com diferentes tipos de fibras formando uma rede de poros com ausência de células. Aumento: 1000X. Barra de escala: 100µm. (F) Em maior aumento, área destacada da figura (E), apresentando fibras da matriz extracelular conservadas. Aumento: 25.000. Barra de escala: 5µm.

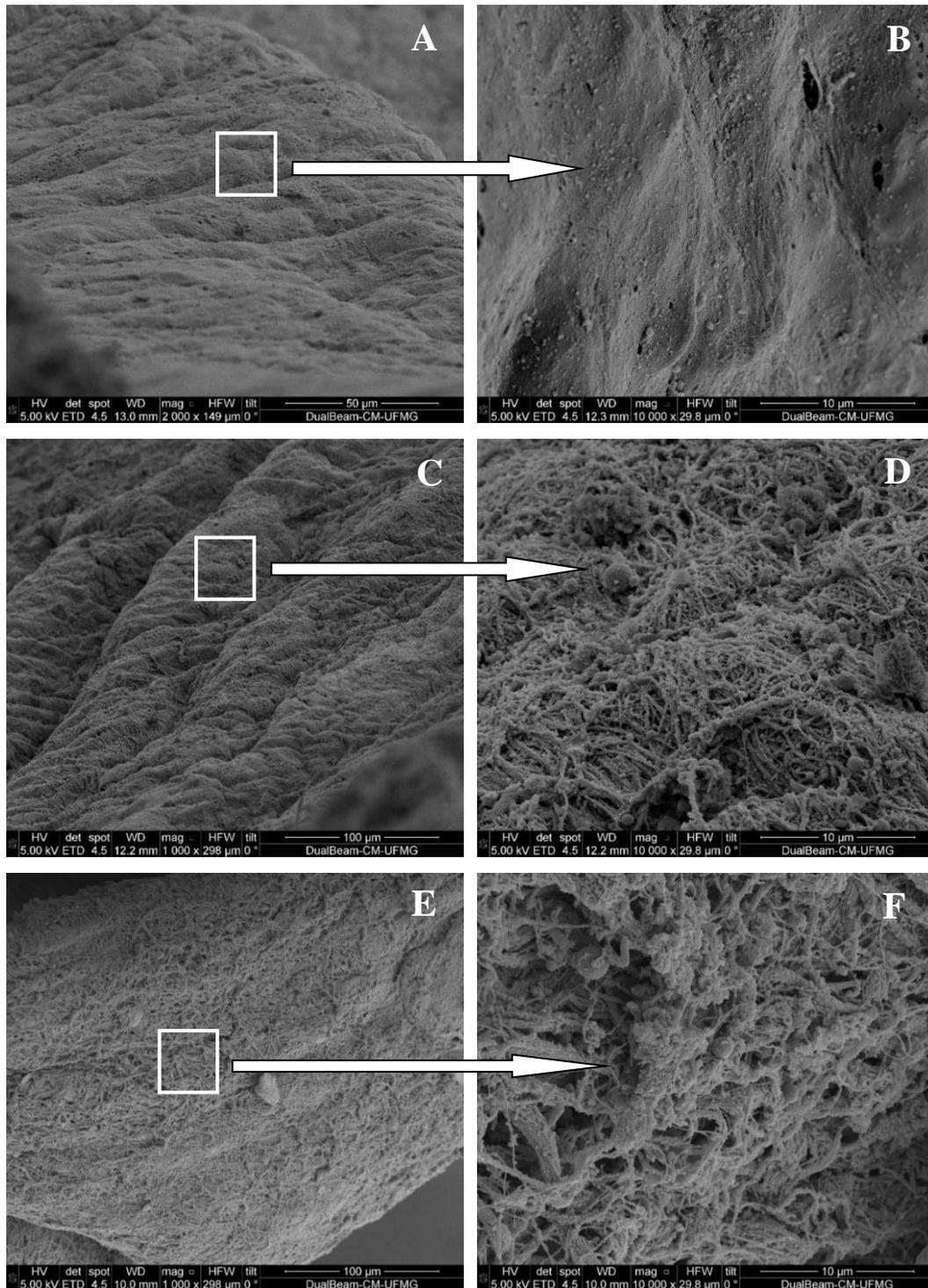


FIGURA 5.13. Eletromicrografia de corações controle e tratados (epicárdio). (A) Aumento 2000X. Barra de escala: 50μm (C e E) Aumento 1000X. Barra de escala: 100μm. (B, D e F) Aumento 10000X. Barra de escala: 10μm. As áreas destacadas com um quadrado estão em maior aumento na figura indicada pela seta. (A e B) Epicárdio dos corações controle apresentaram mesotélio preservado. Por outro lado, nos corações tratados com os métodos de imersão com agitação (C e D) e perfusão (E e F) apresentaram epicárdio com células mesoteliais ausentes e preservação da lâmina basal.

Assim como nos resultados de microscopia ótica, a microscopia eletrônica evidenciou a preservação de vasos sanguíneos de diferentes calibres na matriz dos órgãos perfundidos. Enquanto no controle a camada de células musculares e endoteliais ainda está presente (FIG. 5.14A), nos vasos sanguíneos de corações tratados apenas as fibras de tecido conjuntivo são observadas tanto externa (FIG. 5.14B e C) quanto internamente (FIG. 5.14D). Além da preservação da matriz, os vasos sanguíneos ainda permanecem com sua forma conservada.

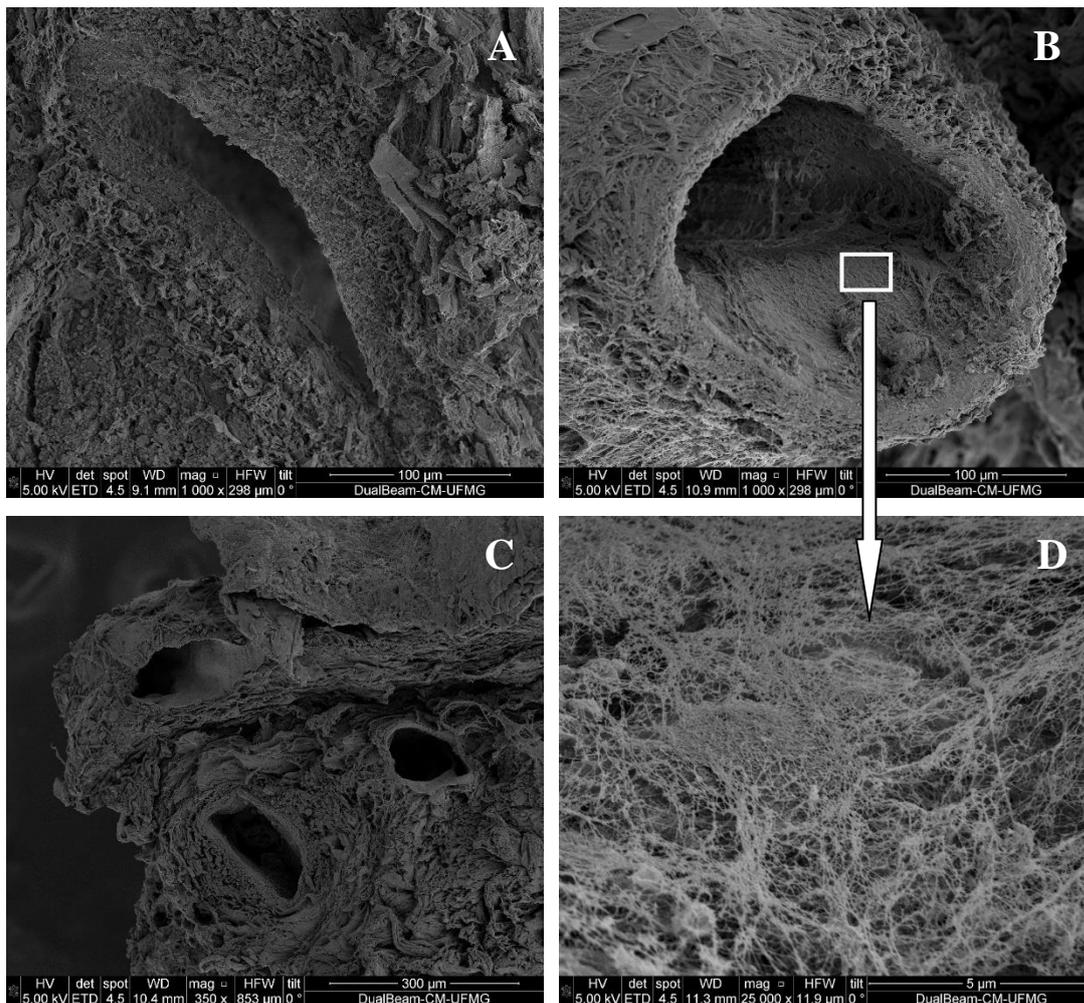


FIGURA 5.14. Eletromicrografias de vasos sanguíneos presentes no ventrículo esquerdo dos corações controle e perfundidos. (A) Corações controle apresentaram vasos sanguíneos com estrutura celular e conjuntiva conservadas. (B) Corações tratados com perfusão exibiram vasos sanguíneos com fibras do tecido conjuntivo preservadas, mantendo sua forma, porém com células ausentes. A região do interior do vaso, destacada, pode ser visualizada em maior aumento na figura indicada pela seta. Aumento: 1000X. Barra de escala: 100 μ m; (C) Vasos sanguíneos de diferentes calibres e espessuras conservados na matriz de órgãos perfundidos; Aumento: 350X. Barra de escala: 300 μ m; (D) Matriz extracelular preservada no interior dos vasos sanguíneos com ausência de células endoteliais. Aumento: 25000X. Barra de escala: 5 μ m.

5.5.2. Teste mecânico – Teste do balão de látex

Não havia na literatura, um volume ideal para a realização desse ensaio utilizando corações de galinha, por essa razão, diferentes volumes foram utilizados para realizar a medição (detalhados na seção 4.6.3). Todos os volumes testados no experimento foram comparados, independente dos protocolos de decelularização utilizados, com o objetivo de verificar a influência de diferentes volumes na resposta da pressão. Ao se comparar a resposta das pressões, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando se realizou pequenos aumentos no volume (por exemplo, quando se compara 0,5 mL com 1,0 mL ou 1,5 mL com 2,0 mL ou 2,0 mL com 2,5 mL). Uma diferença significativa ($p < 0,05$) somente foi observada quando houve grandes diferenças entre os intervalos dos volumes ministrados (a exemplo, entre 0,5 mL e 1,5 mL ou 1,5 mL e 2,5 mL ou 1,5 mL e 3,0 mL), o que indica que para se obter uma melhor leitura da estabilidade mecânica dos processos, é necessário ministrar volumes maiores, atentando para não comprometer a integridade do órgão ou do experimento.

Quando se compararam os diferentes métodos de decelularização frente aos volumes testados, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados com perfusão ou imersão com agitação independente do uso de eletrodo, sugerindo que a inclusão desse não influenciou na alteração da estabilidade mecânica do órgão testado. Por outro lado, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e aqueles tratados com perfusão em todos os volumes testados. Ao se realizar a análise pareada, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) nos grupos analisados e tal diferença variou dependendo do volume utilizado no ensaio (a exemplo, entre controle e imersão com agitação a diferença é observada a partir de 1,5 mL ou comparando-se imersão com agitação e perfusão a diferença é observada a partir de 1,0 mL). As análises pareadas bem como as demais análises estatísticas encontram-se descritas no ANEXO C.

Houve diferença ($p < 0,05$) nas medições entre os corações do grupo controle e os tratados com ou sem eletrodo, o que sugere uma alteração na estabilidade mecânica do órgão após o tratamento. Os órgãos tratados apresentaram menor resistência ao aumento de volume, sendo, aqueles tratados com perfusão com ou sem eletrodo, menos resistentes à extensão da parede do ventrículo esquerdo. O GRA. (5.1) mostra a relação entre o volume de água injetado em corações controle e tratados, e os valores médios de

pressão instantânea medidos pelo manômetro. A tabela com os valores de medição para este teste encontra-se no ANEXO D.

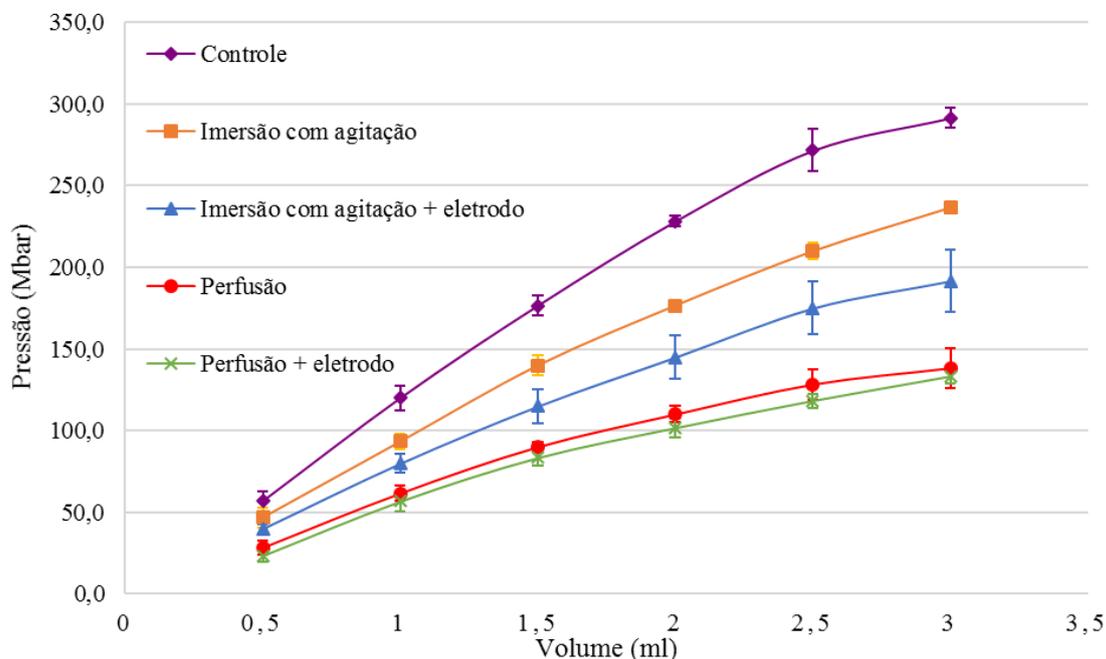


GRÁFICO 5.1. Teste do balão de látex. A estabilidade mecânica dos corações tratados foi alterada quando comparada aos corações controle. Todos os valores foram expressos como média e os erros calculados pelo desvio padrão (erro padrão da média).

A estabilidade pode ser definida como a habilidade de um sistema em retornar para a sua posição de equilíbrio após uma pequena perturbação ou de resistir a esta perturbação (GARDNER-MORSE; STOKES, 2001). O teste do balão de látex foi realizado como indicador da estabilidade mecânica da matriz extracelular, após a decelularização. Considerou-se este método como o mais apropriado para avaliar a resposta mecânica do coração como um todo, uma vez que mimetiza a distensão da parede do ventrículo esquerdo, durante o batimento cardíaco. Métodos de análise de tensão-deformação são restritos a uma região e são influenciados pela orientação das fibras naquele determinado local e pela forma como foi aplicada a carga (OTT et al., 2008; WANG et al., 2010; WITZENBURG et al., 2012).

A alteração da estabilidade mecânica dos corações tratados era esperada, considerando as observações macroscópicas e microscópicas dos órgãos decelularizados, entretanto, esses resultados foram opostos àqueles reportados por Weymann et al. (2011) e Weymann et al. (2014) que mostraram não haver diferenças entre a estabilidade

mecânica de corações controle e perfundidos e concluíram que a matriz extracelular não foi danificada no processo.

Além disso, os resultados do teste do balão de látex ainda sugerem que houve uma redução da rigidez dos corações à medida que eles foram expandidos, principalmente daqueles tratados com o método de perfusão, o que corrobora com o que foi relatado por Eitan et al. (2010) que mediu a rigidez com secções de corações de porco. No entanto, a maioria dos autores que mediram as propriedades da matriz extracelular por testes mecânicos realizados com seções de coração de rato (OTT et al., 2008; WITZENBURG et al. 2012) ou porco (MERNA et al., 2013), reportaram um pequeno aumento da rigidez no tecido decelularizado. Entretanto, as diferenças metodológicas tornam difícil a comparação entre os estudos já que os corações testados nos trabalhos citados foram provenientes de animais, cujo tamanho e espessura da parede do ventrículo esquerdo são bem diferentes quando comparados ao coração de galinha, o que influenciou diretamente na medição (EITAN et al., 2010; OTT et al., 2008; WITZENBURG et al., 2012).

Sendo assim, a alteração da estabilidade mecânica e redução na rigidez dos corações sugerida pelos resultados deste teste, pode ter ocorrido devido às mudanças estruturais do tecido, influenciando assim, a resposta mecânica do órgão. Basicamente, estas modificações poderiam ser atribuídas a três fatores específicos: comportamento mecânico do colágeno da matriz extracelular, remoção das células ou dano à matriz extracelular.

O colágeno presente em grande quantidade na matriz extracelular, apresenta pouca resistência à distensão inicial e um enrijecimento em resposta às distensões subsequentes (LIAO et al., 2005) o que aumentaria a rigidez do órgão. Para que este padrão de enrijecimento fosse visualizado na curva de pressão x volume seriam necessárias mais medições. A remoção das células musculares do tecido pode contribuir para essa alteração, considerando que a matriz extracelular apresentou fibras preservadas. Neste caso, o padrão de rigidez, recupera-se após a recelularização, conforme mostrado por Wang et al. (2010). Em contrapartida, a matriz extracelular pode ter tido sua composição proteica modificada pelo tratamento, porém, seriam necessários estudos quantitativos e qualitativos de proteínas remanescentes de matriz extracelular para avaliar se sua composição foi alterada.

5.5.3. Análise de biologia molecular – Quantificação de RNA

O RNA medido apresentou, em relação ao controle, uma redução de 96,8% nos corações tratados com o método de imersão com agitação e 95,4% naqueles tratados com perfusão, conforme sumarizado na TAB. 5.1. A tabela completa com todos os valores medidos estará disponível no ANEXO B.

TABELA 5.1
Quantificação de RNA nos corações controle e tratados.

Amostra	Quantidade de RNA ng/mg de tecido seco	Média de RNA ng/mg de tecido seco	Porcentagem de RNA retido no tecido (%)	Porcentagem de redução de RNA (%)
Controle 1	13.824,1	14.361,5	-	-
Controle 2	14.899			
Imersão com agitação 1	236,5	452,4	3,2	96,8
Imersão com agitação 2	668,4			
Perfusão 1	639,7	666,5	4,6	95,4
Perfusão 2	693,3			

Resultados semelhantes aos observados neste trabalho, foram encontrados na literatura para DNA e RNA. Ao quantificarem DNA em matrizes cardíacas, Ott et al. (2008) obteve mais de 96% de redução, Carvalho et al. (2012) mostrou 99% de redução, Remlinger; Wearden; Gilbert (2012) obteve uma redução média de 87%, Wainwright et al. (2010) mostrou 92% de redução e Weymann et al. (2011) obteve uma redução de 82% deste ácido nucleico. O mesmo foi observado em trabalhos que também quantificaram RNA como mostrado por Consolo et al. (2016) que obteve 98,5% de redução de DNA e 95% de redução de RNA após decelularização de bexiga.

Considerando que o RNA é encontrado em grandes quantidades na célula quando ela está em processo expressão gênica (ROSELINO, 2008), pode-se afirmar que o mesmo é um indicativo de viabilidade celular. Assim, os resultados de quantificação de RNA sugerem que o processo de decelularização afetou o tecido do coração tratado com o método de imersão com agitação, provocando morte celular, já que houve uma grande redução do conteúdo de RNA. Esta modificação do tecido, também foi visualizada na

microscopia ótica. Em contrapartida, os resultados da perfusão, tendo em vista os resultados obtidos com as análises microscópicas, que mostraram ausência de células, indicam que grande parte das células foi removida do tecido, porém ainda houve manutenção de células viáveis no tecido, não apenas restos celulares. Estes dados evidenciam que, o método de perfusão é o mais eficiente para remoção do conteúdo celular de órgãos inteiros, porém o protocolo utilizado neste trabalho também não foi eficiente para remover completamente as células e restos celulares associados à matriz, o que não é desejável já que estes componentes podem ser imunogênicos (NAGATA; HANAYAMA; KAWANE, 2010, ZHENG et al., 2005).

5.6. Resumo dos resultados

Os diferentes métodos mecânicos testados foram comparados e os resultados obtidos, bem como os pontos positivos e negativos de cada um deles foram organizados de forma resumida no ANEXO E.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- As modificações feitas no protocolo estabelecido por Weymann et al. (2011) foram mais eficientes, já que, quando tratados com perfusão, os corações apresentaram melhores resultados histológicos e de biologia molecular se comparados aos resultados reportados por estes autores.
- O método de imersão com agitação não foi eficiente para decelularizar o coração inteiro.
- O método de perfusão foi o mais eficiente para decelularização do coração de galinha inteiro.
- A adição de eletrodos aos métodos de imersão com agitação e perfusão não influenciou na velocidade ou eficiência do processo de decelularização.
- Os corações tratados com o método de imersão com agitação foram decelularizados externamente, porém, o tecido muscular interno foi mantido, enquanto, naqueles tratados com perfusão, a decelularização ocorreu de forma homogênea em todas as camadas do órgão, preservando a estrutura da matriz extracelular.
- A estabilidade mecânica do coração foi alterada pelos métodos de decelularização. Os órgãos tratados com perfusão apresentaram maior alteração das propriedades mecânicas em comparação com o controle e com aqueles tratados com imersão e agitação.
- Os métodos de imersão com agitação e perfusão não foram eficientes para remover completamente o conteúdo celular da matriz, já que, ambas amostras, apresentaram uma pequena quantidade de RNA remanescente.

- A combinação entre os métodos químicos e mecânicos foi importante no processo de decelularização. A perfusão é o método mais adequado para a decelularização de órgãos inteiros, densos e complexos, enquanto, o método de imersão com agitação seria mais adequado para tecidos delgados. O uso da força elétrica é promissor e pode contribuir para o aumento da remoção dos restos celulares.
- O movimento do fluido e a interação do mesmo com as superfícies do órgão foram os principais fatores, que influenciaram a eficiência dos métodos mecânicos. Logo, o conhecimento acerca dos parâmetros que favorecem os processos de decelularização, sejam eles químicos ou mecânicos, é de grande importância para o estabelecimento de um protocolo específico conforme características singulares de cada órgão.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de trabalhos futuros. De acordo com o que foi mostrado, sugere-se:

- Avaliar mais detalhadamente a interação dos eletrodos com o processo de decelularização por meio da caracterização do resíduo depositado no eletrodo positivo e realizar análises quantitativas para determinar, com mais precisão, a influência dos mesmos neste processo.
- Comparar os resultados dos testes com eletrodo utilizando-se diferentes tensões, na tentativa de aumentar as forças elétricas de atração e com isso a eficiência na remoção dos restos celulares.
- Testar o método de imersão com agitação incluindo chicanas no recipiente, com o objetivo de provocar turbulência no fluido e assim, aumentar a eficiência do processo.
- Incluir a ultrasonicação nos métodos de decelularização testados, como uma alternativa à inclusão de outras substâncias químicas, no intuito de estabelecer um protocolo ideal que remova completamente as células e restos celulares.
- Analisar detalhadamente a morfologia e o tamanho da rede de poros da matriz extracelular no sentido de guiar trabalhos futuros de recelularização.
- Recelularizar as matrizes celulares obtidas.
- Fazer os experimentos em temperaturas acima de 37°C para obter uma curva de temperatura ideal.
- Analisar a eficiência do processo de decelularização através de microscopia eletrônica de transmissão e microtomografias.

ABSTRACT

Tissue engineering is often used to construct biological substitutes for damaged organs or tissues. One approach utilizes decellularized native scaffolds for growth of cells is the extracellular matrix, which directly influences the processes of cellular adhesion, proliferation and differentiation. The decellularization process removes the cells from the tissue or organ, while preserving their structure and extracellular matrix components, maintaining geometry and mechanical properties. Different methods can be associated to improve decellularization. The simultaneous use of chemical and mechanical methods can result in more efficient protocols. The objective of this study was to evaluate the performance of different mechanical methods involved in heart decellularization. The mechanical methods were perfusion and immersion with agitation, with or without electrodes. These methods have been combined with phosphate buffered saline and sodium dodecyl sulfate washes. To evaluate the efficiency of the methods in cells removal and maintaining the integrity of the organ extracellular matrix, microscopic analyzes, quantification of RNA and mechanical tests with latex balloon have been used. The results showed that the perfusion method was the most efficient to heart decellularization, because it was not possible to observe cell nuclei in the extracellular matrix and a great reduction in the RNA was observed. Additionally, the extracellular matrix was preserved. Using immersion with agitation, although reaching a significant reduction in RNA, decellularization occurred only externally. Both treatments altered the mechanical stability of the organ. The addition of electrodes did not affect process efficiency or speed, but they interact with the organic components removed from the organ. During the decellularization process some residues were adhered to the positive electrodes as blood clots. No other studies were found reporting the use of electrostatic as a method to improve the efficiency of cellular debris removal. Therefore, the use of electrostatics can be promising if will change some test parameters, like the voltage. Perfusion is the most appropriate method to decellularize a whole, dense and complex organ, while immersion with agitation is better for thinner tissues. Further knowledge about the parameters that influence the decellularization process, chemical or mechanical, is very important to establish a specific protocol for different organs according to their characteristics.

Keywords: extracellular matrix, decellularization, mechanical methods, perfusion, immersion with agitation, electrode.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABUHAB, A. Análise de dados de pacientes internados por insuficiência cardíaca descompensada – impacto sobre desfechos clínicos e custos / Abrão Abuhab. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cardiologia. Orientador: Fernando Bacal. São Paulo, 2012. 136p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5131/tde-30072012-080321/pt-br.php>. Acesso em 14/04/15 às 10:40.
2. AKHYARI, P., AUBIN H., GWANMESIA P., BARTH M., HOFFMANN S., HUELSMANN J., PREUSS K., LICHTENBERG A. The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2011, 17(9): 915-26.
3. AKHYARI, P., KAMIYA, H., GWANMESIA, P., AUBIN, H., TSCHIRSCHKE, R., HOFFMANN, S., KARCK, M., LICHTENBERG, A. In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 2010, 38 539—546.
4. ARDITO R.V., CRUZ R.N., SILVA E.M., SARDINHA F.M., ARDITO S.Q. Uma breve história do coração artificial. *Reblampa*, 2005, 18(1): 5-13.
5. ARENAS-HERRERA J.E., KO I.K., ATALA A., YOO J.J. Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed. Mater*, 2013, 8 (1):014106.
6. ATALA A., BAUER S.B., SOKER S., YOO J.J., RETIK A.B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006; 367(9518):1241-6.
7. BADYLAK S.F., FREYTES D.O., GILBERT T.W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(1): 1-13.

8. BADYLAK S.F., GILBERT T.W. Immune Response to Biologic Scaffold Materials Semin. Immunol., 2008, 20(2): 109–116.
9. BAIOCCHINI A., MONTALDO C., CONIGLIARO A., GRIMALDI A., CORREANI V., MURA F., CICCOSANTI F., ROTIROTI N., BRENN A., MONTALBANO M., D'OFFIZI G., CAPOBIANCHI M.R., ALESSANDRO R., PIACENTINI M., SCHININÀ M.E., MARAS B., DEL NONNO F., TRIPODI M., MANCONE C. Extracellular Matrix Molecular Remodeling in Human Liver Fibrosis Evolution. PLoS One, 2016; 11(3): e0151736.
10. BAPTISTA P.M. Siddiqui M.M., Lozier G., Rodriguez S.R., Atala A., Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid Hepatology, 2010, 53(2): 604–17.
11. BOCCHI E.A., MARCONDES-BRAGA F.G., BACAL F., FERRAZ A.S., ALBUQUERQUE D., RODRIGUES D., et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012. Arq Bras Cardiol 2012; 98(1 supl. 1): 1-33.
12. BOCCHI E.A, BRAGA F.G., FERREIRA S.M., ROHDE L.E., OLIVEIRA W.A., ALMEIDA D.R., MOREIRA M. da C., BESTETTI R.B., BORDIGNON S., AZEVEDO C., TINOCO E.M., ROCHA R.M., ISSA V.S., FERRAZ A., CRUZ F.D., GUIMARÃES G.V., MONTERA V. do S.S., ALBUQUERQUE D.C., BACAL F., SOUZA G.E., ROSSI NETO J.M., CLAUSELL N.O., MARTINS S.M., SICILIANO A., SOUZA NETO J.D, MOREIRA L.F., TEIXEIRA R.A., MOURA L.Z., BECKDA-SILVA L., RASSI S., AZEKA E., HOROWITZ E., RAMIRES F., SIMÕES M.V., CASTRO R.B., SALEMI V.M., VILLACORTA JUNIOR H., VILA J.H., SIMÕES R., ALBANESI F., MONTERA M.W.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure. Arq Bras Cardiol. 2009; 93(1 Suppl 1):3-70.
13. BORGES G.M., CAMPOS M.B., SILVA L.G.C. Transição da estrutura etária no Brasil: oportunidades e desafios para a sociedade nas próximas décadas. *In*: Estudos e análises: Mudança Demográfica no Brasil no Início do Século XXI. Subsídios para as projeções da população. IBGE. v. 3, 2015. Disponível em:

<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv93322.pdf>. Acessado em: 05/07/2016 às 16:00.

14. BRISTOW M.R., LOWES B.D. Management of Heart Failure *In*: Braunwald E. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 7^a ed., WB Saunders, Philadelphia, 2004.
15. CARVALHO, J.L., DE CARVALHO, P.H., GOMES, D.A., GOES, A.M. Characterization of Decellularized Heart Matrices as Biomaterials for Regular and Whole Organ Tissue Engineering and Initial In-vitro Recellularization with Ips Cells. *J Tissue Sci. Eng.*, 2012, Suppl 11:002.
16. CASTRO BRÁS, L.E., RAMIREZ, T.A., DELEON-PENNELL, K.Y., CHIAO, Y.A., MA, Y., DAI, Q., HALADE, G.V., HAKALA, K., WEINTRAUB, S.T., LINDSEY, M.L. Texas 3-Step decellularization protocol: Looking at the cardiac extracellular matrix. *Journal of proteomics*, 2013, 86: 43 – 52
17. CASTRO L. A. S., Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura / Luis Antônio Suita de Castro - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos 93, 2001, 37p.
18. CEBOTARI S., TUDORACHE I., CIUBOTARU A., BOETHIG D., SARIKOUCH S., GOERLER A., LICHTENBERG A., CHEPTANARU E., BARNACIUC S., CAZACU A., MALIGA O., REPIN O., MANIUC L., BREYMAN T., HAVERICH A. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. *Circulation*. 2011, 124:115–123.
19. CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.*, 1987, 162: 156-159.

20. CONGER J.L., INMAN R.W., TAMEZ D., FRAZIER O.H., RADOVANCEVIC B. Infection and thrombosis in total artificial heart technology: past and future challenges—a historical review. *Asaio J.*, 2000, 46 (6): S22-7.
21. CONSOLO F., BRIZZOLA S., TREMOLADA G., GRIECO V., RIVA F., ACOCELLA F., FIORE G. B., SONCINI M. A dynamic distention protocol for whole-organ bladder decellularization: histological and biomechanical characterization of the acellular matrix. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2016, 10: E101–E112.
22. COOPER D.K., GOOD A.H., KOREN E., ORIOL R., MALCOLM A.J., IPPOLITO R.M., NEETHLING F.A., YE Y., ROMANO E., ZUHDI N. Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: Relevance to discordant xenografting in man. *Transpl. Immunol.*, 1993, 1:198–205.
23. CORTIELLA J., NILES J., CANTU A., BRETTLER A., PHAM A., VARGAS G., WINSTON S., WANG J., WALLS S., NICHOLS J.E. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Eng. Part A*, 2010, 16(8) 2565–80.
24. COSTELL M., CARMONA R., GUSTAFSSON E., GONZALEZ-IRIARTE M., FASSLER R., MUNOZ-CHAPULI R. Hyperplastic conotruncal endocardial cushions and transposition of great arteries in perlecan-null mice. *Circ. Res.*, 2002, 91:158-164.
25. CRAPO, P.M., GILBERT, T.W., BADYLAK, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011, 32:3233–3243.
26. da COSTA F D, COSTA A C, PRESTES R. DOMANSKI A.C., BALBI E.M., FERREIRA A.D., LOPES S.V. The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *Ann Thorac Surg.* 2010, 90:1854–1860.
27. DALY, A.B., WALLIS, J.M., BORG, Z.D., BONVILLAIN, R.W., DENG, B., BALLIF, B.A., JAWORSKI, D.M., ALLEN, G.B., WEISS, D.J. Initial Binding and

Recellularization of Decellularized Mouse Lung Scaffolds with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng. Part A*, 2012, 18(1-2): 1-16.

28. DOHMEN P.M. Clinical results of implanted tissue engineered heart valves. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2012, 4:225–231.

29. DOHMEN P.M., KIVELITZ D., HOTZ H., KONERTZ W. Ross operation with a tissue engineered heart valve. *Ann Thorac Surg.* 2002, 74:1438–1442

30. EITAN, Y., SARIG, U., DAHAN, N., MACHLUF, M. Acellular Cardiac Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Engineering: In Vitro Cell Support, Remodeling, and Biocompatibility. *Tissue Eng Part C*, 2010, 16(4): 671-683

31. FIORELLI A.I., OLIVEIRA JUNIOR J.L., COELHO G.H.B., ROCHA D.C. Mechanical circulatory support: why and when. *Rev. Med. (São Paulo)*, 2008, 87(1):1-15.

32. FOMOVSKY, G.M., THOMOPOULOS, S., HOLMES, J.W. Contribution of Extracellular Matrix to the Mechanical Properties of the Heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2010, 48(3): 490–496.

33. FREED L.E., VUNJAK-NOVAKOVIC G., BIRON R.J, EAGLES D.B., LESNOY D.C., BARLOW S.K., LANGER R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (NY)*, 1994, 12(7): 689–93.

34. FREYTES D.O., STONER R.M., BADYLAK S.F. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2008, 84(2):408-14.

35. GALILI U. The alpha-gal epitope(Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie.* 2001, 83:557–563.

36. GALVEZ-MONTÓN, C., PRAT-VIDAL, C., ROURA, S., SOLER-BOTIJA, C., BAYES-GENIS, A. Cardiac Tissue Engineering and the Bioartificial Heart. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2013, 66(5):391–399.
37. GARDNER-MORSE M.G., STOKES I.A.F. Trunk stiffness increase with steady-state effort. *Journal of Biomechanics*. 2001; 34: 457-463.
38. GILBERT T.W, FREUND J.M., BADYLAK S.F. Quantification of DNA in biologic scaffold materials *J. Surg. Res.*, 2009, 152 135–9.
39. GILBERT, T.W. Strategies for Tissues and Organs decellularization. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113: 22172222.
40. GILBERT, T.W., SELLARO, T.L., BADYLAK, S.F. 2006 Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27:3675–3683.
41. GUYETTE J.P., CHAREST J.M., MILLS R.W., JANK B.J., MOSER P.T., GILPIN S.E., GERSHLAK J.R., OKAMOTO T., GONZALEZ G., MILAN D.J., GAUDETTE G.R., OTT H.C. Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. *Circ Res*. 2016; 118(1):56-72.
42. GUO S.Z., REN X.J., WU B., JIANG T. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility. *Spinal Cord*. 2010, 48(7):576-81.
43. HE M., CALLANAN A. Comparison of Methods for Whole-Organ Decellularization in Tissue Engineering of Bioartificial Organs. *Tissue Eng. Part B*, 2013, 19(3):194-208.
44. HOGNESS, J. R, VANANTWERP M. The Artificial Heart: Prototypes, Policies, and Patients; Committee to Evaluate the Artificial Heart Program of the National Heart, Lung, and Blood Institute; Division of Health Care Services. 1991. 312p. Disponível em: <http://www.nap.edu/catalog/1820.html>. Acessado em 14/04/2015 às 13:20.

45. HUNT S.A., ABRAHAM W.T., CHIN M.H., FELDMAN A.M., FRANCIS G.S., GANIATS T.G., JESSUP M., KONSTAM M.A., MANCINI D.M., MICHL K., OATES J.A., RAHKO P.S., SILVER M.A., STEVENSON L.W., YANCY C.W. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009, 53(15):e1-e90.
46. JESSUP M. Mechanical cardiac-support devices: dreams and devilish details. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 345:1490–1493.
47. KARDONG, K.V. (tradução HOENEN, S.M.M.). *Vertebrados Anatomia Comparada, Função e Evolução (5ª edição)*. Roca, São Paulo, 2011, 928 p.
48. KARP, G. *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments (6th Ed.)*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002, 785 p.
49. KAULLY, T., KAUFMAN-FRANCIS, K., LESMAN A., LEVENBERG, S. Vascularization—the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2009, 15: 159–69.
50. KEANE T.J, LONDONO R., TURNER N.J., BADYLAK S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 2012, 33(6):1771-81.
51. KĘDZIERSKA, K., SINDREWICZ, K., SPORNIAK-TUTAK, K., BOBER, J., STAŃCZYK-DUNAJ, M., DOŁĘGOWSKA, B., ROBERT KALISZCZAK R., SIENKO J., KABAT-KOPERSKA J., GOŁEMBIEWSKA E., CIECHANOWSKI, K. Effect of Immunosuppressive Therapy on Proteinogram in Rats. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2016, 22:1987–1998.

52. KUNA V.K., ROSALES A., HISDAL J., OSNES E.K., SUNDHAGEN J.O., BÄCKDAHL H., SUMITRAN-HOLGERSSON S., JØRGENSEN J.J. Successful tissue engineering of competent allogeneic venous valves. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2015; 3(4):421-430.e1.
53. LANGER R., VACANTI J.P. *Tissue Engineering. Science*, 1993, 260(5110): 920-926.
54. LEVITSKY J., SALOMON D.R., ABECASSIS M., LANGFELDER P., HORVATH S., FRIEDEWALD J., WANG E., KURIAN S.M., MONDALA T., GIL S., MCDADE R., BALLARD K., GALLON L. Clinical and plasma proteomic markers correlating with chronic kidney disease after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2011;11(9):1972–78.
55. LIAO J., YANG L., GRASHOW J., SACKS M.S. Molecular orientation of collagen in intact planar connective tissues under biaxial stretch. *Acta Biomaterialia*, 2005, 1(1):45–54.
56. LIU R., GAO J., YANG Y., ZENG W. Preparation of Rat Whole-kidney Acellular Matrix via Peristaltic Pump. *Urol J.* 2015; 12(6):2457-61.
57. LOCKHART M., WIRRIE E., PHELPS A., WESSELS A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, 2011, 91: 535-550.
58. MACCHIARINI P., JUNGEBLUTH P., GO T., ASNAGHI M.A., REES L.E., COGAN T.A., DODSON A., MARTORELL J., BELLINI S., PARNIGOTTO P.P., DICKINSON S.C., HOLLANDER A.P., MANTERO S., CONCONI M.T., BIRCHALL M.A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, 2008, 372(9655): 2023–2030.
59. MASON, C., DUNNILL P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen. Med.*, 2008, 3(1): 1-5.

60. MERNA, N., ROBERTSON, C., LA, A., GEORGE, S.C. Optical Imaging Predicts Mechanical Properties during Decellularization of Cardiac Tissue. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2013, 19(10): 802-809.
61. METHE, K., BACKDAHL, H., JOHANSSON, B. R., NAYAKAWDE, N., DELLGREN, G., SUMITRAN-HOLGERSSON. S. An Alternative Approach to Decellularize Whole Porcine Heart. *BioResearch Open Access*. 2014, 3(6): 327-338.
62. MOMTAHAN N., SUKAVANESHVAR S., ROEDER B.L., COOK A.D. *Tissue Eng. Part B: Reviews*, 2015, 21(1): 115-132.
63. MURPHY S.V., ATALA A. Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. *Bioessays*. 2013, 35(3): 163-72.
64. NAGATA S, HANAYAMA R, KAWANE K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*. 2010, 140(5): 619-30.
65. NELSON C.M., BISSEL M.J. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006, 22: 287-309.
66. NORTON G.R., TSOTETSI J., TRIFUNOVIC B., HARTFORD C., CANDY G.P., WOODIWISS A.J. Myocardial stiffness is attributed to alterations in crosslinked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 1997, 96: 1991–1998.
67. OBERWALLNER, B., BRODARAC, A., CHOI, Y-H., SARIC, T., ANIĆ, P., MORAWIETZ, P., STAMM C. Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2014, 102 (9): 3263-72.
68. O'BRIEN M.F., GOLDSTEIN S., WALSH S., BLACK K.S., ELKINS R., CLARKE D. The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue

heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999, 11:194–200.

69. ORÉFICE R., PEREIRA M., MANSUR H. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações.* Ed. Cultura Médica, 2006. 538p.

70. OTT H.C. CLIPPINGER B., CONRAD C., SCHUETZ C., POMERANTSEVA I., IKONOMOU L., KOTTON D., VACANTI J.P. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Med.*, 2010, 16(8): 927–33.

71. OTT, H.C., MATTHIESEN, T.S., GOH, S., BLACK, L.D., KREN, S.M., NETOFF, T. I., TAYLOR, D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 2008, 14:213-221.

72. OZEKI M., NARITA Y., KAGAMI H., OHMIYA N., ITOH A., HIROOKA Y., NIWA Y., UEDA M., GOTO H. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2006, 79(4):771-8.

73. PETERSEN T.H., CALLE E.A., ZHAO L., LEE E.J., GUI L., RAREDON M.B., GAVRILOV K., YI T., ZHUANG Z.W., BREUER C., HERZOG E., NIKLASON L.E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 2010, 329(5991):538–41.

74. PILLAI C.K., SHARMA C.P. Review paper: absorbable polymeric surgical sutures: chemistry, production, properties, biodegradability, and performance. *J. Biomater. Appl.*, 2010, 25(\$): 291–366.

75. PROKOP A. Bioartificial organs in the twenty-first century: nanobiological devices. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2001, 944:472-90.

76. QUAINI E., PAVIE A., CHIECO S., MAMBRITO B. The Concerted Action “Heart” European registry on clinical application of mechanical circulatory support systems: bridge to transplant. The Registry Scientific Committee. *Eur. J, Cardiothorac, Surg*, 1997; 11(1): 182-8.

77. QUILLFELDT J. A. Origem dos potenciais elétricos das células nervosas. 2005. 53p. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/mnemoforos/arquivos/potenciais2005.pdf>. Acessado em: 04/04/16 às 16:30.
78. RAJABI-ZELETI, S., JALILI-FIROOZINEZHAD, S., AZARNIA, M., KHAYYATAN, F., VAHDAT, S., NIKEGHBALIAN, S., KHADEMHOSEINI, A., BAHARVAND, H., AGHDAMI, N. The behavior of cardiac progenitor cells on macroporous pericardium derived scaffolds. *Biomaterials*, 2014, 35: 970-982.
79. REGISTRO BRASILEIRO DE TRANSPLANTES – Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Ano XX - Nº 4. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2007-2014). Jan- Dez 2014.
80. REING J.E., BROWN B.N., DALY K.A., FREUND J.M., GILBERT T.W., HSIONG S.X., HUBER A., KULLAS K.E., TOTTEY S., WOLF M.T., BADYLAK S.F. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010, 31(33):8626-33.
81. REMLINGER, N.T., WEARDEN, P.D., GILBERT, T.W. Procedure for Decellularization of Porcine Heart by Retrograde Coronary Perfusion. *J. Vis. Exp.*, 2012, 6(70): e50059.
82. REN X., OTT H. C. On the road to bioartificial organs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2014, 466(10): 1847-1857.
83. ROBERTSON, M.J., DRIES-DEVLIN, J.L., KREN, S.M., BURCHFIELD, J.S., TAYLOR D.A. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS One*, 2014, 9(2):e90406.
84. ROSELINO A.M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. *An. Bras. Dermatol.*, 2008, 83(3):187-203.

85. ROSS E.A. WILLIAMS M.J., HAMAZAKI T., TERADA N., CLAPP W.L., ADIN C., ELLISON G.W., JORGENSEN M., BATICH C.D. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2009, 20(11):2338–47.
86. SAMPAIO I.B.M., *Estatística aplicada à experimentação animal*, 2ª ed., FEPMVZ, Belo Horizonte, 2002.
87. SÁNCHEZ P.L, FERNÁNDEZ-SANTOS M.E., COSTANZA S., CLIMENT A.M., MOSCOSO I., GONZALEZ-NICOLAS M.A., SANZ-RUIZ R., RODRÍGUEZ H., KREN S.M., GARRIDO G., ESCALANTE J.L., BERMEJO J., ELIZAGA J., MENARGUEZ J., YOTTI R., PÉREZ DEL VILLAR C., ESPINOSA M.A., GUILLEM M.S., WILLERSON J.T., BERNAD A., MATESANZ R., TAYLOR D.A., FERNÁNDEZ-AVILÉS F. Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts. *Biomaterials*, 2015, 61:279-89.
88. SANCHEZ, P.L., FERNANDEZ-SANTOS M.E., COSTANZA S.; RODRÍGUEZ-ABELLA H., KREN S.; GARRIDO G.; ESCALANTE J.L., MATESANZ R., TAYLOR D., FRANCISCO F.A. Characterization and biocompatibility of perfusion-decellularized human heart matrix: toward bioengineering perfusable human heart grafts. *J. Am. Coll. of Cardiol.*, 2012, 59(13s1):E857.
89. SARIG, U., MACHLUF, M. Engineering cell platforms for myocardial regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2011, 11:1055– 77.
90. SEBBEN A., CAMPOS L.A., SCHWARTZ C.A., SILVA H.R., NASCIMENTO L.B., SILVA L.H.R. *Anatomia comparativa de vertebrados: atlas fotográfico*. LE UnB, Brasília, 2015, 149p. Disponível em: <http://leunb.bce.unb.br/handle/123456789/35>. Acessado em: 07/07/2016 às 16:10.
91. SMIT, F.E., DOHMEN P.M. Bio-Artificial Heart as Ultimate Treatment of End Stage Heart Failure. *Med. Sci. Monit. Basic Res*, 2014; 20: 161-163.

92. SONG J.J., OTT H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17 (8): 424-432.
93. SOTO-GUTIERREZ A., YAGI H., UYGUN B.E., NAVARRO-ALVAREZ N., UYGUN K., KOBAYASHI N., YANG Y.G., YARMUSH M.L. Cell Delivery: From Cell Transplantation to Organ Engineering. *Cell Transplant*, 2010, 19(6): 655–665.
94. TAYLOR D.A, ROBERTSON M.J. The Basics of Cell Therapy to Treat Cardiovascular Disease: One Cell Does Not Fit All. *Rev Esp Cardiol*. 2009, 62(09):1032-44.
95. TIMBY, B.K., SMITH, N.E. (tradução IKEDA M.) *Enfermagem médico-cirúrgica (8ª edição)*. Manole, Barueri, 2005, 1256 p.
96. TOOLE B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2001; 12: 79-87
97. UYGUN B.E. SOTO-GUTIERREZ A., YAGI H., IZAMIS M.L., GUZZARDI M.A., SHULMAN C., MILWID J., KOBAYASHI N., TILLES A., BERTHIAUME F., HERTL M., NAHMIAS Y., YARMUSH M.L., UYGUN K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature Med*, 2010, 16(7):814–20.
98. WAINWRIGHT, J.M., CZAJKA C.A., PATEL, U.B., FREYTES, D.O., TOBITA, K., GILBERT T.W., BADYLAK S.F. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2010, 16(3): 525–532.
99. WANG, B., BORAZJANI, A., TAHAI, M., CURRY, A. L. DE J., SIMIONESCU, D. T., GUAN, J. TO, F., ELDER, S. H., LIAO, J. Fabrication of Cardiac Patch with Decellularized Porcine Myocardial Scaffold and Bone Marrow Mononuclear Cells. *J. Biomed. Mater. Res A.*, 2010, 94(4): 1100–1110.

100. WEBER K.T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1989, 13(7):1637–52.
101. WEYMANN A., PATIL N.P., SABASHNIKOV A., JUNGEBLUTH P., KORKMAZ S., LI S., VERES G., SOOS P., ISHTOK R., CHAIMOW N., PÄTZOLD I., CZERNY N., SCHIES C., SCHMACK B., POPOV A.F., SIMON A.R., KARCK M., SZABO G. Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead. *PLoS One*. 2014, 9(11):e111591.
102. WEYMANN, A., LOGANATHAN, S., TAKAHASHI H., SCHIES C., CLAUS B., HIRSCHBERG K., SOÓS P., KORKMAZ S., SCHMACK B., KARCK M., SZABÓ G., Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model. *Circ. J.*, 2011, 75: 852–60.
103. WITZENBURG C., RAGHUPATHY R., KREN S.M., TAYLOR D.A., BAROCAS V.H. Mechanical Changes in the Rat Right Ventricle with Decellularization. *J. Biomech.*, 2012, 45(5): 842–849.
104. WONG M.L., GRIFFITHS, L.G. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal vs. decellularization. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(5):1806-16.
105. WU Y.M., JOSEPH B., BERISHVILI E., KUMARAN V., GUPTA S. Hepatocyte transplantation and drug-induced perturbations in liver cell compartments. *Hepatology*, 2008, 47(1):279–287.
106. XU H., WAN H., SANDOR M., QI S., ERVIN F., HARPER J.R., SILVERMAN R.P., MCQUILLAN D.J. Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair. *Tissue Eng. Part A*. 2008, 14(12):2009-19.
107. YANG B., ZHANG Y., ZHOU L., SUN Z., ZHENG J., CHEN Y., DAI Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular

bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods*, 2010, 16(5):1201-11.

108. YU, B.T., LI, W.T., SONG, B.Q., WU, W.L. Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, 17: 2179-2184.

109. ZHENG M.H., CHEN J., KIRILAK Y., WILLERS C., XU J., WOOD D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2005, 73:61-7.

ANEXO A

TABELA 1

Valores das massas dos corações, medidos antes (massa inicial) e depois (massa final) dos tratamentos, para cálculo da porcentagem de redução de massa.

Métodos testados	Data	Experimento	Massa Inicial (g)	Média da Massa Inicial (g)	Massa final (g)	Média da Massa Final (g)	Redução (g)	Redução (%)
Agitação	27/10/2015	1	10,22	9,54	7,27	7,34	2,20	23,0
	31/10/2015	2	10,18		8,68			
	02/11/2015	3	8,22		6,08			
Agitação + eletrodo	05/11/2015	1	8,64	7,45	7,23	6,25	1,20	16,1
	10/11/2015	2	6,94		5,81			
	26/11/2015	3	6,76		5,71			
Perfusão	27/10/2015	1	9,70	9,35	5,50	6,02	3,33	35,6
	31/10/2015	2	8,20		5,42			
	02/11/2015	3	10,14		7,14			
Perfusão + eletrodo	05/11/2015	1	8,30	8,70	5,16	5,57	3,13	36,0
	07/11/2015	2	8,56		4,46			
	20/11/2015	3	9,25		7,09			

ANEXO B

TABELA 2
Quantificação de RNA (valores da medição)

Amostra	Tratamento	Quantidade de tecido (mg)	Quantidade de RNA ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Quantidade de RNA ng/mg de tecido	Média	Porcentagem de RNA retido (%)	Porcentagem de redução (%)
Controle 1	Trizol	20	2764,8	69,1	35,5	2,0	2,0	13824,1	14361,5	100,0%	-
Controle 2	Trizol	20	2979,8	74,5	38,6	1,9	1,9	14899,0			
Imersão com agitação 1	Trizol	20	47,3	1,2	0,7	1,6	0,5	236,5	452,4	3,2%	96,8
Imersão com agitação 2	Trizol	20	133,7	3,3	1,9	1,7	1,1	668,4			
Perfusão 1	Trizol	15	96,0	2,4	1,4	1,7	0,7	639,7	666,5	4,6%	95,4
Perfusão 2	Trizol	15	104,0	2,6	1,5	1,8	1,0	693,3			

ANEXO C

QUADRO 1

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes volumes utilizados no experimento independente do protocolo.

Pareamento	Significância (valores de P)
0,5 mL vs 1 mL	$P > 0,05$
0,5 mL vs 1,5 mL	$P < 0,001$
0,5 mL vs 2 mL	$P < 0,001$
0,5 mL vs 2,5 mL	$P < 0,001$
0,5 mL vs 3 mL	$P < 0,001$
1 mL vs 1,5 mL	$P > 0,05$
1 mL vs 2 mL	$P < 0,001$
1 mL vs 2,5 mL	$P < 0,001$
1 mL vs 3 mL	$P < 0,001$
1,5 mL vs 2 mL	$P > 0,05$
1,5 mL vs 2,5 mL	$P < 0,01$
1,5 mL vs 3 mL	$P < 0,001$
2 mL vs 2,5 mL	$P > 0,05$
2 mL vs 3 mL	$P > 0,05$
2,5 mL vs 3 mL	$P > 0,05$

QUADRO 2

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 0,5 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P > 0,05
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
controle vs perfusão	P < 0,05
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,01
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P > 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

QUADRO 3

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 1,0 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P > 0,05
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P < 0,01
controle vs perfusão	P < 0,001
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P < 0,05
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P < 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P > 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

QUADRO 4

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 1,5 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P < 0,05
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P < 0,001
controle vs perfusão	P < 0,001
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P < 0,01
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P > 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

QUADRO 5

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 2,0 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P < 0,01
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P < 0,001
controle vs perfusão	P < 0,001
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P < 0,001
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P < 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

QUADRO 6

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 2,5 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P < 0,05
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P < 0,001
controle vs perfusão	P < 0,001
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P < 0,01
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P < 0,01
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P < 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

QUADRO 7

Análise pareada (teste *t*) das diferenças observadas na análise de variância entre os diferentes métodos utilizados para decelularização e o controle, no volume de 3,0 mL.

Pareamento	Significância (valores de P)
controle vs imersão com agitação	P < 0,05
controle vs imersão com agitação + eletrodo	P < 0,001
controle vs perfusão	P < 0,001
controle vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação vs imersão com agitação + eletrodo	P > 0,05
imersão com agitação vs perfusão	P < 0,001
imersão com agitação vs perfusão + eletrodo	P < 0,001
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão	P > 0,05
imersão com agitação + eletrodo vs perfusão + eletrodo	P < 0,05
perfusão vs perfusão + eletrodo	P > 0,05

ANEXO D

TABELA 3

Valores de pressão medidos em resposta ao aumento volumétrico do balão de látex inserido no ventrículo esquerdo de corações controle e tratados.

Teste do balão de látex - pressão (mbar) x volume (mL)						
Métodos testadas	0,5 mL	1 mL	1,5 mL	2 mL	2,5 mL	3 mL
Controle	65	135	185	225	250	280
	45	110	165	235	295	300
	60	115	180	225	270	295
Imersão com agitação	35	85	130	175	215	235
	55	95	150	180	215	235
	50	100	140	175	200	240
Imersão com Agitação + eletrodo	45	70	95	120	150	170
	40	90	120	150	170	175
	35	80	130	165	205	230
Perfusão	20	55	85	100	110	115
	35	70	95	115	135	145
	30	60	90	115	140	155
Perfusão + eletrodo	20	45	75	90	110	125
	30	60	85	105	125	140
	20	65	90	110	120	135

ANEXO E

QUADRO 1

Quadro resumo dos métodos e resultados obtidos nos experimentos de imersão com agitação

Métodos Mecânicos	Resultados Macroscópicos	Resultados microscópicos, mecânicos e moleculares	Pontos positivos	Pontos negativos
<p><u>Imersão com agitação</u> Imersão do órgão em um béquer contendo as soluções de decelularização que são agitadas através de um agitador magnético com temperatura de 37°C.</p>	<p>- Coração com fina camada externa, mais clara; manutenção do tecido muscular nos ventrículos e interior pouco alterado em relação ao estado inicial.</p>	<p>- Presença de células musculares desorganizadas no miocárdio e decelularização apenas no epicárdio. - Menor resistência ao aumento de volume no ventrículo esquerdo. - Redução de 96,8% na quantidade de RNA (células viáveis).</p>	<p>- Adequado para tecidos mais delgados.</p>	<p>- Manutenção da maioria do tecido muscular nos ventrículos. - Não foi capaz de alcançar as camadas mais internas do órgão. - Altera a estabilidade mecânica do órgão;</p>
<p><u>Imersão com agitação + eletrodos</u> Inclusão de eletrodos no sistema de imersão e agitação. Eletrodos positivo e negativo ligados a uma fonte de energia sob tensão de $3,3V \pm 0,1V$.</p>	<p>- Aderência de material no eletrodo positivo. - Coração apresentou a mesma característica daquele tratado sem os eletrodos</p>	<p>- A adição do eletrodo não resultou em diferenças significativas em relação ao tratamento sem o eletrodo.</p>	<p>- Houve interação entre as cargas elétricas e o material em suspensão; - Este método é uma alternativa ao uso de produtos químicos e enzimas, reduzindo a possibilidade de retenção de resíduos na matriz.</p>	<p>- Maiores tensões podem ser mais eficientes. - Manutenção da maioria do tecido muscular nos ventrículos. - Não foi capaz de alcançar as camadas mais internas do órgão. - Altera a estabilidade mecânica do órgão.</p>

QUADRO 2

Quadro resumo dos métodos e resultados obtidos nos experimentos de perfusão

Métodos Mecânicos	Resultados Macroscópicos	Resultados microscópicos, mecânicos e moleculares	Pontos positivos	Pontos negativos
<p><u>Perfusão</u> A aorta foi canulada. As soluções foram bombeadas por uma bomba peristáltica. A pressão e a temperatura foram controladas por um manômetro analógico e um banho ultratermostático, respectivamente. A pressão variou ao longo do processo e a temperatura foi constante de 37°C.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Coração com textura flácida e cor esbranquiçada externa e internamente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausência de células. - Decelularização homogênea. - Manutenção da rede de poros da matriz extracelular. - Manutenção do arcabouço dos vasos sanguíneos. - Menor resistência ao aumento de volume no ventrículo esquerdo. - Redução de 95,4% na quantidade de RNA (células viáveis). 	<ul style="list-style-type: none"> - Remoção de grande parte das células; - Manutenção do arcabouço dos vasos sanguíneos permite o alcance das soluções de decelularização a todo o órgão e favorece a angiogênese; 	<ul style="list-style-type: none"> - Possível retenção de proteínas contráteis aderidas à matriz. - Alteração das propriedades mecânicas.
<p><u>Perfusão + eletrodos</u> Inclusão de eletrodos no sistema de perfusão. Eletrodos positivo e negativo ligados a uma fonte de energia sob tensão de $3,3V \pm 0,1V$.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Aderência de material no eletrodo positivo. - Coração apresentou a mesma característica daquele tratado sem os eletrodos 	<ul style="list-style-type: none"> - A adição do eletrodo não resultou em diferenças microscópicas em relação ao tratamento sem o eletrodo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Houve interação entre as cargas elétricas e o material em suspensão; - Este método é uma alternativa ao uso de produtos químicos e enzimas, reduzindo a possibilidade de retenção de resíduos na matriz. 	<ul style="list-style-type: none"> - Maiores tensões podem ser mais eficientes. - Possível retenção de proteínas contráteis aderidas à matriz. - Alteração das propriedades mecânicas.

