

Ministério da Saúde

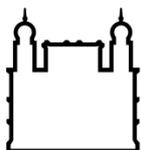
**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biociências e Biotecnologia**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DO PERICÁRDIO  
BOVINO APÓS PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO BRANDA PARA USO EM  
BIOPRÓTESES VALVARES**

**MARINA AUGUSTO HEUSCHKEL**

**CURITIBA**  
**2017**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biociências e Biotecnologia

MARINA AUGUSTO HEUSCHKEL

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DO PERICÁRDIO  
BOVINO APÓS PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO BRANDA PARA USO EM  
BIOPRÓTESES VALVARES

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

**Orientador:** Dr. Marco Augusto Stimamiglio  
**Coorientador:** Dr. Alejandro Correa Dominguez

CURITIBA/PARANÁ

*Munay – amor;  
Llankay – trabalho;  
Yachay – sabedoria.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Josiane e Paulo, por sempre confiarem e me apoiarem em todos os momentos, eu sou eternamente grata por todos os esforços que fizeram por mim. Obrigada pelo fato de mesmo tendo que abrir mão da sua filha, sempre me incentivarem e por me mostrarem que por onde eu esteja sempre terei o apoio e amor incondicional de vocês! Obrigada por darem asas aos meus sonhos e principalmente por me orientarem a voar.

Agradeço aos meus orientadores Dr. Marco Augusto Stimamiglio e Dr. Alejandro Correa Dominguez por me aceitarem em seu grupo de pesquisa sem me conhecer. Por toda a confiança depositada durante esse período, conselhos e principalmente por serem fontes de inspiração como grandes pesquisadores e também pessoas.

Agradeço ao Lucas, meu sempre namorado, que incansavelmente esteve ao meu lado me incentivando e torcendo por cada momento conquistado, dentro e fora do laboratório. Obrigada por ser o meu companheiro de todas as horas, pela sua compreensão e paciência pela minha ausência em muitos momentos.

Agradeço também a Dra. Patrícia Shigunov por abrir as portas do laboratório com tanto carinho e ao Dr. Bruno Dallagiovana por me permitir fazer parte do grupo, sempre com importantes sugestões e discussões para o trabalho.

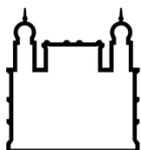
Agradeço ao Núcleo de Enxertos Cardiovasculares da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Dr. João Gabriel Roderjan, Dra. Paula Hansen Suss e Dra. Andressa Vaz Schittini por todo o apoio dado ao trabalho e por sempre estarem dispostos a contribuir com tanta determinação e entusiasmo.

Agradeço a todos do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco; Dra. Alessandra, Crisciele, Ariane, Cintia, Maria Julia, Anny, Addeli, Bernardo, Thamile, Isabela, Isabelle, Bruna Marcon, Bruna Falavinha, Ana Paula, Alan e Jhonatan, por todo o companheirismo, conselhos, conversas, cafés e risadas. E em especial, a minha super companheira de projeto, Amanda Leitolis, por compartilhar tantos experimentos, sofrimentos e vitórias.

Agradeço a equipe da Plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas, pela ajuda com a preparação e análise das amostras.

Agradeço ao pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas, que forneceram as condições físicas e materiais para realização deste trabalho. Em especial à Secretária Acadêmica Raquel de Souza Birbeire, pelo constante auxílio e sorriso.

Agradeço ao Ministério da Saúde pelo auxílio de fomento nesse projeto.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

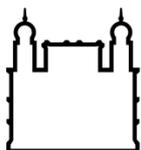
### AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E DE BIOCOMPATIBILIDADE DO PERICÁRDIO BOVINO APÓS PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO BRANDA PARA USO EM BIOPRÓTESES VALVARES

#### RESUMO

MARINA AUGUSTO HEUSCHKEL

Valvulopatias são doenças que afetam a funcionalidade das válvulas cardíacas e o tratamento cirúrgico é realizado por meio da utilização de substitutos valvares. Dentre estes, as biopróteses convencionais apresentam limitações relacionadas a ruptura e a calcificação. Nesse contexto, visando o desenvolvimento de biopróteses valvares que superem estas limitações, o estudo busca avaliar a integridade estrutural e a biocompatibilidade do pericárdio bovino (PB) após processo de descclularização branda com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%. A eficácia da descclularização dos PBs foi avaliada por meio da extração do DNA genômico seguido por quantificação e eletroforese em gel de agarose, coloração de Hematoxilina/Eosina (H&E) e marcação nuclear com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Ensaio de imunofluorescência foram realizados para a visualização das proteínas da matriz extracelular (MEC) e do xenoantígeno imunogênico galactose-alfa-1,3-galactose (alfa-gal). A biocompatibilidade do tecido foi avaliada através do seu cultivo com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (aCTMs) humano. Assim, o processo de descclularização tecidual promoveu redução média de 77% da quantidade de DNA das amostras. Núcleos celulares não foram visíveis nas colorações de H&E e DAPI, apesar da presença de bandas de DNA maiores que 200 pb no gel de agarose. O conteúdo e a disposição dos colágenos I, III, IV, decorina e elastina não foram alterados com a descclularização. Porém, laminina e lumican apresentaram marcação reduzida no tecido descclularizado, assim como a proteína de citoesqueleto vimentina. Foi observado por microscopia eletrônica de varredura um afrouxamento das fibras da face fibrosa do tecido descclularizado em comparação ao tecido fresco. Além disso, os PBs descclularizados apresentaram-se negativos para o antígeno alfa-gal e não-citotóxicos *in vitro*. Por fim, a análise de biocompatibilidade demonstrou a aderência das aCTMs ao tecido descclularizado após 24 h em cultivo e um arcabouço tecidual repopulado após 7 dias em cultura. Em conjunto estas características indicam que a descclularização branda do PB com solução de SDS 0,1% permite a obtenção de um arcabouço tecidual adequado para o repovoamento celular e para o desenvolvimento de biopróteses valvares.

Palavras-chave: Bioprótese valvares, Descclularização, Pericárdio Bovino, Matriz Extracelular



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

### HISTOLOGICAL AND BIOCOMPABILITY EVALUATION OF THE BOVINE PERICARDIUM AFTER SOFT DECELLULARIZATION PROCESS FOR THE USE IN VALVE BIOPROTHESIS

#### ABSTRACT

MARINA AUGUSTO HEUSCHKEL

Valvulopathies are diseases that affect the functionality of the heart valves and the surgical treatment is performed through the use of valvar substitutes. Among these, conventional bioprosthesis present limitations related to its rupture and calcification. In this context, aiming the development of a valvular bioprosthesis that overcome these limitations, the purpose of this study is to evaluate the structural integrity and biocompatibility of the bovine pericardium (BP) after a soft decellularization process with a sodium dodecyl sulfate solution (SDS) 0.1%. The efficacy of BP decellularization was accessed by extracting genomic DNA followed by agarose gel electrophoresis, Hematoxylin/Eosin staining (H&E) and nuclear labeling with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Immunofluorescence was performed in order to visualize the proteins of the extracellular matrix (ECM) and the immunogenic xenoantigen galactose- $\alpha$ -1,3-galactose ( $\alpha$ -gal), found on the membrane of mammalian cells except humans and higher primates. The biocompatibility of the tissue was evaluated by its culture with Mesenchymal Stem Cells derived from human adipose tissue (MSC). Thus, decellularization process promoted a mean reduction of 77% of the amount of DNA in the samples. Cell nuclei were not visible in H&E and DAPI staining, despite the presence of DNA bands larger than 200 bp in the agarose gel. The content and arrangement of collagens I, III, IV, decorin and elastin were not altered with the decellularization. However, laminin and lumican exhibited reduced tissue labeling after decellularization, as well as the cytoskeleton protein vimentin. Scanning electron microscopy showed a loosening of the fibers on the fibrous face of the decellularized tissue compared to the fresh one. In addition, the decellularized BPs were negative for the  $\alpha$ -gal antigen and non-cytotoxic *in vitro*. Finally, the biocompatibility analysis demonstrated an adhesion of the MSCs to the decellularized tissue after 24 h in culture and a tissue scaffold repopulated after 7 days. Together, these characteristics indicate that the soft BP decellularization with SDS 0,1% solution allows the acquirement of a suitable scaffold for cell repopulation and for the development of valvular bioprosthesis

Key words: Valvular bioprosthesis, Decellularization, Bovine pericardium, Extracellular matrix

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Coração humano .....	14
Figura 1.2. Anatomia da válvula tricúspide .....	15
Figura 1.3: Foto e corte histológico ilustrativo da estrutura das válvulas semilunares .....	16
Figura 1.4: Prevalência das valvulopatias de acordo com a idade .....	18
Figura 1.5: Distribuição das etiologias de acordo com o tipo de valvulopatia .....	19
Figura 1.6: Tipos de válvulas cardíacas mecânicas .....	20
Figura 1.7: Tipos de válvulas cardíacas biológicas constituídas por heteroenxerto .....	22
Figura 1.8: Camadas do pericárdio bovino .....	27
Figura 1.9. Principais mecanismos responsáveis pela calcificação das válvulas cardíacas .....	29
Figura 5.1: Quantificação de DNA genômico extraído de PB fresco ou descelularizado.....	46
Figura 5.2: Eletroforese de DNA .....	47
Figura 5.3: Confirmação da descelularização com marcação nuclear através das colorações de H&E e DAPI .....	48
Figura 5.4: Caracterização da matriz extracelular por imunofluorescência .....	52
Figura 5.5: Microscopia eletrônica de varredura para o pericárdio fresco e descelularizado .....	54
Figura 5.6: Microscopia eletrônica de varredura do pericárdio bovino descelularizado .....	55
Figura 5.7: Detecção do antígeno alfa-gal utilizando lectina BSI-B4 .....	56
Figura 5.8: Detecção do antígeno alfa-gal utilizando o anticorpo M86 .....	57
Figura 5.9: Citotoxicidade do pericárdio bovino descelularizado no ensaio de contato direto .....	60
Figura 5.10: Citotoxicidade do pericárdio bovino descelularizado no ensaio de captação do vermelho neutro .....	61
Figura 5.11: Cultivo do pericárdio bovino descelularizado com aCTMs .....	63

## LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1: Anticorpos de proteínas de matriz extracelular utilizados para as imunofluorescências .....	39
TABELA 5.1: Quantificação do conteúdo de DNA genômico para diferentes amostras de tecido de pericárdio bovino nativo .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alfa-gal	- Galactose-alfa-1,3-galactose
BSA	- Albumina sérica bovina
Cat.	- Número do catálogo
CO <sub>2</sub>	- Gás carbônico ou dióxido de carbono
aCTM	- Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
DAPI	- 4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	- “Dulbecco’s modified eagle medium”
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
D-PBS	- “Dulbecco’s phosphate buffered saline”; tampão fosfato salino com cloreto de magnésio e cloreto de cálcio
EA	- Estenose Aórtica
EB	- Estenose da válvula bicúspide
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ELAM	- “Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1” – molécula de adesão de leucócito endotelial
FDA	- “Food and Drug Administration”
FITC	- Isotiocinato de fluoresceína
GA	- Glutaraldeído
GAGs	- Glicosaminoglicanos
H&E	- Hematoxilina e Eosina
ICAM-1	- Molécula de adesão intercelular 1
ICAM-2	- Molécula de adesão intercelular 2
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
ISO	- “International Organization of Standardization” – Organização Internacional de Padronização
MEC	- Matriz extracelular
RA	- Regurgitamento da válvula aórtica
RB	- Regurgitamento da válvula bicúspide
PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	- Tampão fosfato salino
PS	- Penicilina / Estreptomicina
SDS	- Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino  
TCR - Taxa de crescimento relativo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
min	- minuto(s)
h	- hora(s)
ng	- nanograma
mg	- miligrama
pb	- pares de base
$\mu\text{g/ml}$	- micrograma por mililitro
U/ml	- unidades por mililitro
$\text{mm}^3$	- milímetro cúbico
$\text{cm}^2$	- centímetro quadrado
g	- grama
mL	- mililitro
$^{\circ}\text{C}$	- graus celsius
$\mu\text{m}$	- micrômetro
$\text{mg/ml}$	- miligrama por mililitro
x g	- multiplicação pela aceleração gravitacional
pH	- potencial hidrogeniônico
M	- molar ou mol/L
$\mu\text{l}$	- microlitro
$\mu\text{g}$	- micrograma
mM	- milimolar
nm	- nanômetro
Rpm	- rotações por minuto
mm	- milímetro
S	- segundo (s)
P	- significância
n	- número

## SUMÁRIO

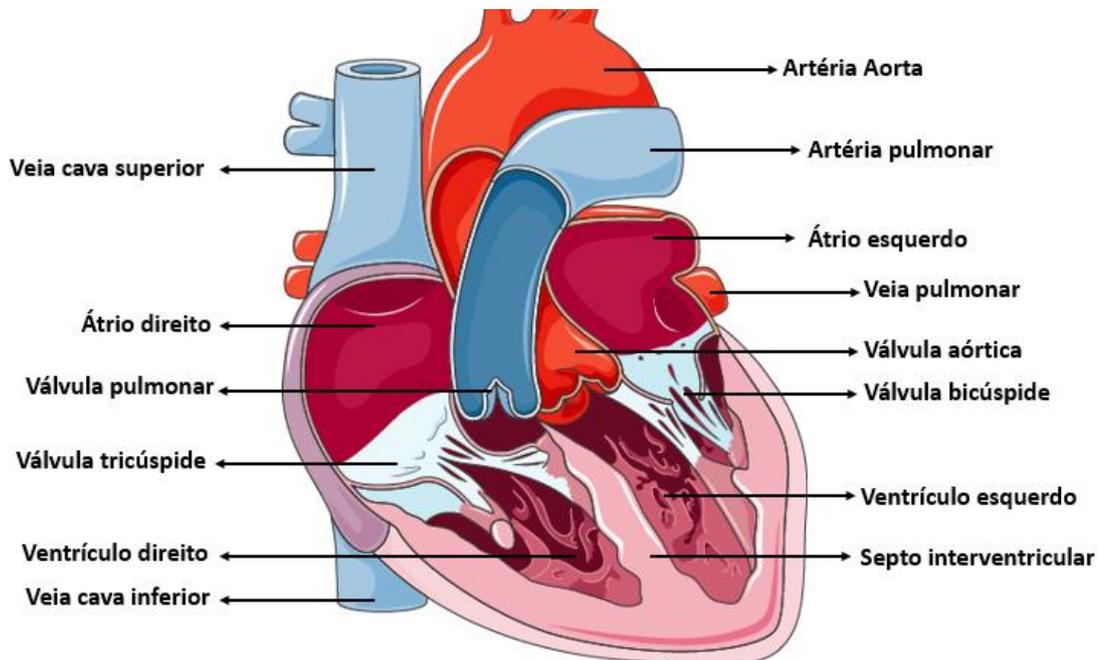
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 O CORAÇÃO HUMANO.....	14
1.2 AS VÁLVULAS CARDÍACAS.....	15
1.3 VALVULOPATIAS.....	17
1.4 PRÓTESES CARDÍACAS.....	19
1.4.1 Próteses valvares mecânicas.....	20
1.4.2 Próteses valvares biológicas.....	21
1.5 MATRIZ EXTRACELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS.....	23
1.5.1 Estrutura e função da matriz extracelular.....	23
1.5.2 O uso da matriz extracelular e de células-tronco na engenharia de tecidos.....	25
1.6 O USO DO PERICÁRDIO BOVINO NAS PRÓTESES VALVARES.....	26
1.8 CALCIFICAÇÃO TECIDUAL.....	28
1.9 DESCELULARIZAÇÃO TECIDUAL.....	29
1.10 RESPOSTA IMUNE AOS TECIDOS DESCELULARIZADOS.....	31
1.10.1 Resposta imune a arcabouços biológicos.....	31
1.10.2 Presença de DNA após descclularização tecidual.....	33
1.10.3 A importância do epítipo alfa-gal.....	33
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	37

4.2 COLETA DO PERICÁRDIO DE CORAÇÕES BOVINOS E DESCELULARIZAÇÃO .....	37
4.3 ANÁLISE DE DNA RESIDUAL.....	38
4.4 IMUNOFLORESCÊNCIA .....	39
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	40
4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO.....	41
4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR EXTRATO – ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO.....	41
4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO .....	43
4.9 ENSAIO DE BIOCOMPATIBILIDADE .....	43
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 QUANTIFICAÇÃO DO DNA RESIDUAL.....	45
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS TECIDOS DESCELULARIZADO E NATIVO.....	49
5.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO ANTÍGENO ALFA-GAL.....	54
5.4 CITOTOXIDADE .....	58
5.5 BIOCOMPATIBILIDADE .....	61
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>75</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CORAÇÃO HUMANO

O coração é um órgão muscular que bombeia sangue rico em oxigênio para todo o corpo, permitindo que os outros órgãos trabalhem eficientemente. Ele apresenta quatro câmaras internas. Do lado esquerdo encontram-se o ventrículo e o átrio esquerdo e entre eles a válvula mitral ou bicúspide. Da mesma maneira, do lado direito está a válvula tricúspide separando o ventrículo e o átrio direito, como ilustrado na FIGURA 1.1 (SILVERTHORN, 2010).



**Figura 1.1. Coração humano.** A imagem ilustra a posição das válvulas cardíacas.  
FONTE: Adaptado de <http://smart.servier.com/>

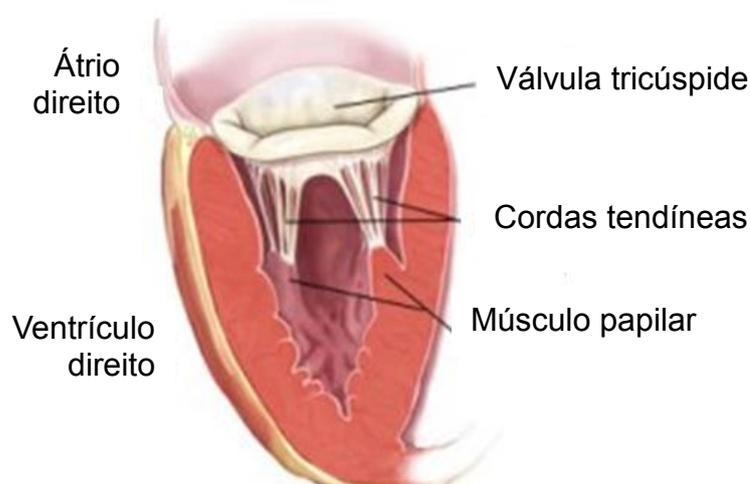
A cada contração do coração, o sangue desoxigenado retornando do corpo preenche o átrio direito, permitindo que a válvula tricúspide se abra e o sangue flua para o ventrículo direito para mais tarde ser bombeado para os pulmões pela artéria pulmonar através da válvula pulmonar. Uma vez que o sangue é reoxigenado nos pulmões ele é direcionado ao átrio esquerdo e bombeado através da válvula bicúspide para o ventrículo esquerdo. O ventrículo esquerdo então contrai forçando o sangue a passar pela válvula aórtica na artéria aórtica, iniciando um novo ciclo (SILVERTHORN, 2010).

Em condições fisiológicas normais, as quatro válvulas cardíacas funcionam como estruturas mecânicas que asseguram que o sangue circule unidirecionalmente

(SILVERTHORN, 2010). O desempenho adequado das válvulas requer que todos os seus componentes estejam estruturalmente intactos e trabalhando em sincronia, estabelecendo a resistência mecânica necessária para suportar a pressão exercida pelo fluxo sanguíneo na válvula (SHOEN, 2005).

## 1.2 AS VÁLVULAS CARDÍACAS

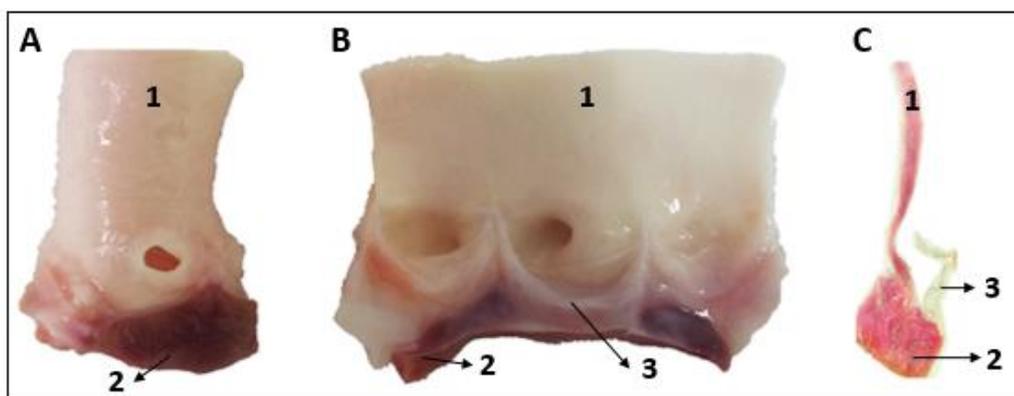
As válvulas cardíacas podem ser classificadas como atrioventriculares (tricúspide e bicúspide) ou semilunares (pulmonar e aórtica). As atrioventriculares estão posicionadas sobre um anel fibroso de maneira que durante a sístole possam impedir o retorno do sangue dos ventrículos para os átrios. Elas são constituídas por cúspides de tamanho e extensão variáveis, presas por cordas tendíneas aos músculos papilares (ANDERSON, 2000), como indicado na FIGURA 1.2.



**Figura 1.2. Anatomia da válvula tricúspide.**

FONTE: Adaptado de CARPENTIER, 1969.

As válvulas semilunares, por sua vez, impedem o retorno de sangue das artérias aorta e pulmonar para os ventrículos durante a diástole (relaxamento da musculatura ventricular). Ao contrário das válvulas atrioventriculares, estas não possuem um anel de suporte. As estruturas centrais da válvula aórtica são os três folhetos aórticos, os quais estão aderidos às paredes do tronco aórtico (região proximal da artéria aorta), ou conduto (ANDERSON, 2000), como mostrado na FIGURA 1.3.



**Figura 1.3. Foto e corte histológico ilustrativos da estrutura das válvulas semilunares.** A imagem evidencia as estruturas de uma válvula cardíaca: conduto (1), miocárdio (2) e cúspides (3). A) Válvula aórtica dissecada. B) Válvula aórtica com corte longitudinal. C) Corte histológico da válvula aórtica.

A estrutura da cúspide de uma válvula cardíaca consiste em matriz extracelular (MEC) recoberta por uma monocamada de células endoteliais em ambos os lados e células intersticiais. Os componentes da MEC valvar incluem: colágeno fibrilar, fibras elásticas e proteoglicanos, os quais distinguem as diferentes camadas da cúspide e correspondem a 60%, 10% e 30%, respectivamente (LATIF *et al.*, 2005, KUNZELMAN *et al.*, 1993).

O colágeno é o componente mais abundante da MEC da válvula cardíaca e está presente nos tipos I, III e V, formando as características fibras onduladas de dispersão paralela do tecido. Bioquimicamente, uma válvula saudável contém 74% de colágeno do tipo I, 24% do tipo III e 2% de colágeno V (COLE *et al.*, 1984). Entrelaçada às fibras de colágeno está a elastina, que funciona como uma mola, colocando pressão na camada ventricular para que o colágeno volte a sua posição original depois que o movimento da cúspide foi finalizado (LATIF *et al.*, 2005). Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos que se ligam covalentemente a resíduos de serina de uma proteína core, resultando em moléculas chamadas proteoglicanos. Tais componentes da MEC podem interagir com o colágeno colaborando com a elasticidade do tecido, resistindo a essa que pode ser diretamente relacionada a capacidade de resistência à pressão (LATIF *et al.*, 2005). Da mesma maneira, já foi reportado que a sua perda pode resultar na rigidez da MEC, diminuição da espessura e capacidade de reidratação da cúspide que implicará diretamente na sua susceptibilidade à falha (VYAVAHARE *et al.*, 1998, LOVEKAMP *et al.*, 2006).

### 1.3 VALVULOPATIAS

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortes no mundo, com uma estimativa de 17,7 milhões de óbitos por ano, o que significa cerca de 31% do total de mortes (WHO, 2015). Dentro desse conjunto de doenças estão as valvulopatias, as quais afetam a funcionalidade das válvulas cardíacas e podem ser categorizadas basicamente em: regurgitamento, estenose e atresia.

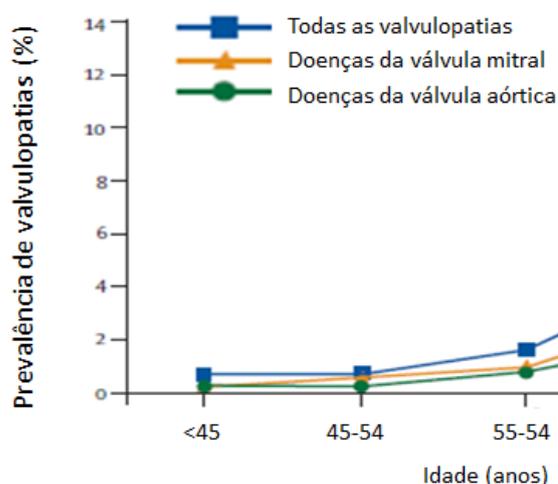
O regurgitamento acontece quando a válvula não se fecha forte o suficiente e o sangue retorna à câmara anterior. Uma estrutura anormal da válvula ou o seu enfraquecimento pode causar o problema. No entanto, a patologia também pode ocorrer como um efeito secundário de infecções ou pressão arterial alta (NIH, 2015).

O enrijecimento ou aumento da espessura da válvula cardíaca faz com que a estenose ocorra. Isso impede que a válvula se abra completamente e, como consequência, uma quantidade insuficiente de sangue é capaz de passar pela estrutura. O resultado, no caso da válvula aórtica, por exemplo, é um aumento na pressão do ventrículo esquerdo durante o ciclo cardíaco, o que tem como efeito compensatório a hipertrofia do ventrículo esquerdo que aumenta ainda mais a demanda dos componentes cardíacos. Algumas válvulas podem apresentar tanto regurgitamento quanto estenose. Por fim, a atresia ocorre se uma válvula cardíaca não possuir qualquer tipo de abertura para o sangue passar (NIH, 2015).

Algumas pessoas nascem com valvulopatias e outras adquirem no decorrer da vida. Se a doença valvular se desenvolver antes do nascimento, ela é chamada de congênita e geralmente envolve a válvula pulmonar ou aórtica. Já as valvulopatias adquiridas, ou seja, aquelas que se manifestam em outras fases da vida, estão relacionadas à válvula aórtica ou bicúspide. Muitos dos indivíduos afetados não apresentam sintomas, porém, para outros, se a doença não for tratada adequadamente, pode levar a insuficiência ou ataque cardíaco, coágulos sanguíneos ou morte por parada cardíaca súbita (NIH, 2015).

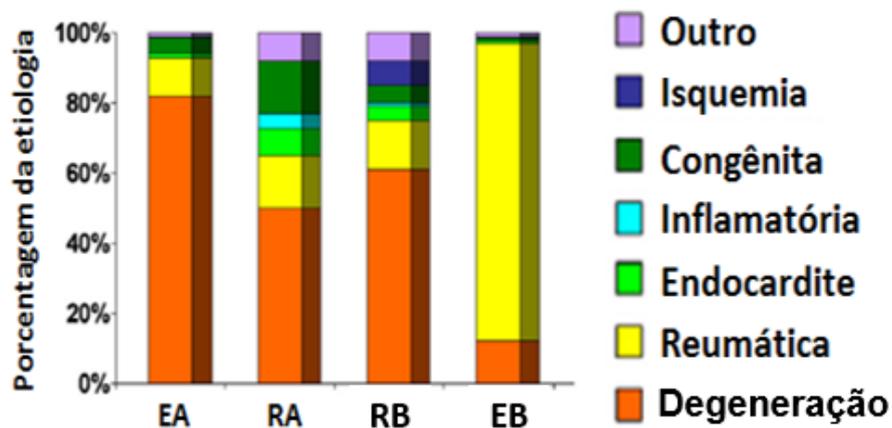
Apesar da prevalência de tais doenças ser baixa, se comparada às doenças coronárias, a necessidade de um longo período de acompanhamento e o próprio custo do tratamento faz com que o seu impacto econômico nos sistemas de saúde seja bastante elevado (COFFEY *et al.*, 2015). Além disso, a significativa associação entre valvulopatias e idade, combinada ao rápido envelhecimento da população ao redor do mundo, faz com que as valvulopatias sejam descritas como a “próxima epidemia cardíaca” (D’ARCY *et al.*, 2011).

A estimativa da prevalência geral de tais doenças em países industrializados é baseada em um estudo populacional realizado nos Estados Unidos, o qual incluiu 11.911 indivíduos submetidos ao exame ecocardiográfico. Assim, a prevalência de doenças valvares foi estimada em 2,5%, sem diferença entre gêneros. Também foi constatado que a prevalência aumentou com a idade; <2% antes dos 65 anos – 13,2% depois dos 75 anos, conforme demonstrado na FIGURA 1.4 (NKOMO *et al.*, 2006). Além disso, no último relatório de estatísticas relacionadas a doenças cardíacas da Associação Americana do Coração estimou-se que tais doenças tenham causado 22.144 mortes nos Estados Unidos (GO *et al.*, 2013).



**Figura 1.4. Prevalência das valvulopatias de acordo com a idade.** Segundo o gráfico é possível observar de maneira geral o aumento da prevalência das valvulopatias de acordo com o avanço da idade.  
 FONTE: Adaptado de NKOMO *et al.*, 2006.

De acordo com IUNG *et al* (2003), dentre as causas de valvulopatias, a estenose aórtica (EA) foi a causa mais frequente (43%), seguida de regurgitamento da válvula bicúspide (RB) (32%), regurgitamento aórtico (RA) (13%) e estenose da válvula bicúspide (EB) (12%). Por sua vez, dentre as etiologias dessas complicações, a degeneração foi a causa mais frequente, exceto para a EB, conforme ilustrado na FIGURA 1.5.



**Figura 1.5. Distribuição das etiologias de acordo com o tipo de valvulopatia.** (EA) estenose aórtica; (RA) regurgitamento aórtico; (RB) regurgitamento da válvula bicúspide; (EB) estenose da válvula bicúspide.

FONTE: Adaptado de IUNG *et al.*, 2003.

Em contraste, existe uma grande diferença na epidemiologia das doenças valvares nos países em desenvolvimento, o que está principalmente relacionado à sua etiologia. Nesses países, a doença reumática do coração permanece como a principal causa da doença, contrapondo-se às causas degenerativas, visto que a expectativa de vida é geralmente menor para essas populações. Em um estudo conduzido na África do Sul, por exemplo, ela foi responsável por 72% das valvulopatias entre 2006-2007 (SLIWA *et al.*, 2010). A predominância da doença reumática cardíaca é consequência da incidência da febre reumática aguda nesses países, estimada entre 5-50 por 100.000 pessoas por ano (TIBAZARWA *et al.*, 2008).

A epidemiologia das valvulopatias possui efeito direto no gerenciamento de pacientes. De maneira geral, o tratamento dessas doenças varia desde medicações, na maioria das vezes paliativas, a intervenções cirúrgicas que permitem substituir o tecido danificado através de enxertos ou transplantes (LAM & WU, 2012). Assim, o aumento contemporâneo da incidência das doenças valvares é atestado por grandes bancos de dados cirúrgicos, que relatam aumento da porcentagem de cirurgia de substituição valvar durante a última década na Europa, Estados Unidos e Canadá (IUNG & VEHANIAN, 2014).

#### 1.4 PRÓTESES CARDÍACAS

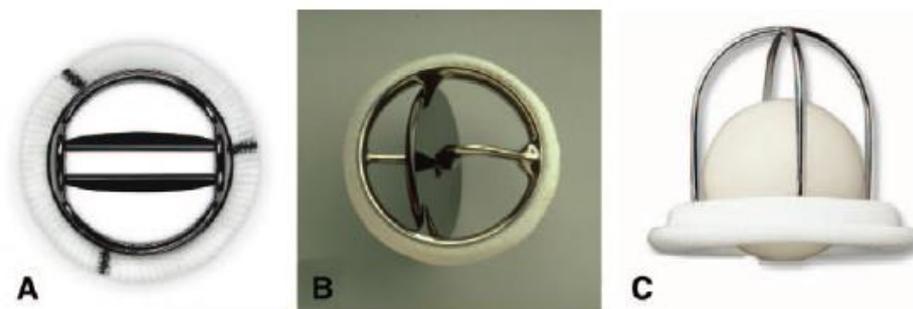
Uma das alternativas de tratamento para as doenças valvares cardíacas é a substituição das mesmas. Atualmente existem disponíveis no mercado diferentes tipos de próteses valvares, com tamanhos variados e fabricadas a partir de diversos

tipos de materiais. Basicamente, elas podem ser divididas em: válvulas mecânicas; sintetizadas a partir de material sintético; ou válvulas biológicas, manufaturadas com tecido de origem animal como o tecido porcino, bovino ou humano proveniente de cadáveres. Aproximadamente 90.000 substitutos valvares são implantados nos Estados Unidos e estima-se que cerca de 2,8 milhões no mundo a cada ano, sendo a proporção entre implantes mecânicos e biológicos bastante similar (PIBAROT & DUMESNIL, 2009).

Independentemente do tipo de válvula escolhida, o substituto ideal deve ser semelhante à válvula nativa, permitindo o fluxo contínuo de sangue quando aberta, mas evitando o fluxo contrário (regurgitação) quando fechada. A válvula de substituição também não deve causar fluxo sanguíneo turbulento, promover hemólise ou ativar a cascata de coagulação. Além disso, necessita ser biocompatível, com superfícies não trombogênicas, de fácil implantação e boa durabilidade para o tempo de vida do paciente, uma vez que é fundamental evitar repetidas operações devido à falha do dispositivo. Finalmente, a válvula ideal não deve afetar o dia-a-dia do paciente, evitando o uso de terapias de anticoagulantes (SCHOEN & LEVY, 1999).

#### 1.4.1 Próteses valvares mecânicas

Como descrito no primeiro relato histórico, os primeiros implantes utilizados foram os mecânicos, na década de 50. Dr. Charles Hungnagel, em 1952, foi o pioneiro ao utilizar esse tipo de abordagem clínica, com a utilização de uma válvula de bola de acrílico implantada na artéria aorta do paciente (FIGURA 1.6-C).



**Figura 1.6. Tipos de válvulas cardíacas mecânicas.** A- Válvula de folheto duplo, B- Válvula de disco, C- Válvula de gaiola.  
FONTE: Adaptado de PIBAROT & DUMESNIL, 2009.

Nos anos 60, o avanço no design mecânico das válvulas e a introdução do carbono pirolítico trouxeram ao mercado o conceito da válvula de disco como substituto da válvula de gaiola (FIGURA 1.6-B). Tal válvula possui um disco circular único, que regula o fluxo. Finalmente, o último tipo de válvula a ser desenvolvido e ainda utilizado, é a de folheto duplo, no final dos anos 60. Elas são formadas por um duplo folheto que forma ângulos com o fluxo sanguíneo de maneira independente (FIGURA 1.6-A). Isso faz com que elas sejam as estruturas com o fluxo hemodinâmico mais semelhante à válvula humana nativa (NEWELL, 2010).

A escolha do tipo de bioprótese a ser utilizada depende das condições do paciente e também da preferência do cirurgião. Apesar das válvulas mecânicas apresentarem boa durabilidade, elas ainda apresentam o risco de tromboembolismo e a necessidade de tratamento anticoagulante durante a vida do paciente. Além disso, no caso de crianças, tais biopróteses apresentam maiores taxas de calcificação e não acompanham o crescimento do paciente, sendo necessário fazer trocas valvares repetidas com o passar dos anos (SCHOEN & LEVY, 1999; PIBAROT & DUMESNIL, 2009).

#### 1.4.2 Próteses valvares biológicas

Poucos anos após os primeiros sucessos das válvulas mecânicas, as válvulas biológicas começaram a ser desenvolvidas, principalmente como uma alternativa ao uso de anticoagulantes. Em 1956, Dr. Murray, em Toronto, fez a primeira cirurgia de transplante de um homoenxerto (implante de um tecido de outro membro da mesma espécie) na aorta descendente de um paciente, o que possibilitou a utilização de homoenxertos como fonte de substituição valvar (MURTRA, 2002).

Mais tarde, a insuficiência de válvulas homólogas para todos os pacientes trouxe a pesquisa para uma linha de fontes alternativas, como os heteroenxertos. Em 1965, Carpentier e Duran implantaram a primeira válvula aórtica porcina, preservada inicialmente em mercúrio-cromo e depois em formalina. Poucos anos depois, em 1967, Marian Ionescu usou um suporte rígido de titânio para montar as válvulas porcinas e também válvulas confeccionadas com pericárdio, introduzindo o conceito de válvulas biológicas híbridas, ou seja, próteses cardíacas de tecido biológico montadas sobre um “stent” (MURTRA, 2002).

Apesar dos avanços, os primeiros resultados clínicos de homo e heteroenxertos em “stent” foram ruins. Os métodos inadequados de preservação, combinados ao

estresse excessivo devido à pressão gerada, fez com que os tecidos falhassem precocemente. Até que em 1968, Alan Carpentier adotou como fixador tecidual o glutaraldeído (GA), usado para tingir couro e aumentar a formação de ligações cruzadas entre cadeias de colágenos. Assim, os tecidos tiveram sua resistência aumentada devido a preservação das fibras de colágeno, além de redução da sua antigenicidade. A primeira válvula produzida a partir de pericárdio bovino (PB) fixada em GA foi desenvolvida por Ionescu no início da década de 70 (MURTRA, 2002). Por fim, o último avanço da bioengenharia tecidual foi a válvula transcater. O seu implante se dá por meio de um cateter cardíaco, o que reduz as complicações relacionadas ao acesso vascular de uma cirurgia normal. Apesar de promissora, essa técnica ainda se mantém sob investigação experimental (PIBAROT & DUMESNIL, 2009).

Sendo assim, atualmente estão aprovados pelo FDA três tipos de biopróteses valvares biológicas: válvulas de PB, válvulas porcinas (com ou sem “stent”) e também homoenxertos (FIGURA 1.7). Os seus benefícios incluem: trombogenicidade reduzida, inexistência de ruído produzido pela válvula em movimento e curto período de terapia anticoagulante. Apesar disso, válvulas de tecido ainda não são consideradas ideais visto que a sua durabilidade é de 15-20 anos e as falhas geralmente ocorrem devido à deterioração, desgaste dos folhetos ou calcificação (SAPIRSTEIN & SMITH, 2001).



**Figura 1.7. Tipos de válvulas cardíacas biológicas constituídas por heteroenxerto.** A) Válvula de pericárdio bovino com stent, B) Válvula porcina com stent, C) Válvula porcina sem stent.

FONTE: Adaptado de [www.lifeisnow.com](http://www.lifeisnow.com)

A fim de suprimir a resposta imune do corpo ao tecido estranho, as válvulas biológicas devem ser tratadas antes da implantação. O tratamento padrão usa GA como fixador, bloqueando sítios imunes responsivos e estabilizando o tecido. Embora este tratamento seja necessário, ele também demonstrou contribuir com a calcificação

da válvula, levando à sua falha. O design da válvula é outro fator importante, visto que a maioria das biopróteses está montada em “stents”, os quais possuem regiões sujeitas ao aumento de tensões, por exemplo, no ponto de suturas no anel, o que poderia favorecer ainda mais a calcificação e formação de trombos (SIDDIQUI *et al.*, 2009).

## 1.5 MATRIZ EXTRACELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS

### 1.5.1 Estrutura e função da matriz extracelular

A MEC é a rede de componentes não celulares altamente organizada presente em todos os órgãos e tecidos. O seu papel de meramente um suporte, ou “scaffold” físico, foi estendido a uma estrutura dinâmica que fornece sinais a células adjacentes determinando suas funções, incluindo a diferenciação, migração e proliferação celular (THEOCHARIS *et al.*, 2016, FRANTZ *et al.*, 2010). Proteínas da MEC interagem diretamente com os receptores de superfície celular e iniciam vias de transdução de sinais. Assim, a MEC é considerada uma estrutura não estática, constantemente sendo remodelada por um fino balanço entre a síntese de seus componentes e a sua degradação, através das metaloproteases (LATIF *et al.*, 2005). Dessa maneira, a ruptura da quantidade relativa das proteínas da MEC ou suas interações possui consequências importantes para o comportamento e destino das células dentro de um tecido (MOUW *et al.*, 2014).

Sua composição é basicamente água, proteínas e polissacarídeos, porém a proporção e distribuição de tais elementos pode variar muito entre um tecido e outro e até mesmo dentro de um mesmo tecido, sendo dessa maneira uma estrutura altamente heterogênea. É justamente essa heterogeneidade de moléculas a responsável pelas propriedades físicas e bioquímicas de um órgão, de forma que a MEC cria especificidades de resistência, elasticidade e tração de um tecido (FRANTZ *et al.*, 2010).

Os constituintes primários da MEC são as proteínas estruturais (como colágenos, fibronectina e elastina), proteínas especializadas (como fatores de crescimento, glicoproteínas) e proteoglicanos (DALEY *et al.*, 2008). Constituindo aproximadamente 30% do conteúdo da MEC, os colágenos são os componentes mais abundantes, com cerca de 30 proteínas distintas (ROZARIO & DeSIMONE, 2010; HEINO, 2007). Essas moléculas são secretadas principalmente pelos fibroblastos e

podem formar diversos tipos de alinhamentos fibróticos. Tais fibras são específicas dos colágenos I, II, III, V e XI e a sua estrutura tem grande impacto na tração e resistência dos tecidos. Ainda, associadas a formação de fibras, estão outras proteínas da MEC como a decorina e a fibromodulina (BADYLAK *et al*, 2009). Apesar de haver diversos tipos de colágeno dentro de um tecido, geralmente um é predominante. Por exemplo, colágeno I é o que prevalece nos tendões e pele, II é encontrado na cartilagem e córnea e III está presente principalmente nos vasos sanguíneos (BOSMAN & STAMENKOVIC, 2003).

Associado ao colágeno está a elastina. As fibras de elastina permitem que o tecido volte a conformação normal após um alongamento repentino. Fundamentalmente, o alongamento de elastina é limitado pela estreita associação com as fibrilas de colágeno. Outro importante componente da MEC é a glicoproteína fibronectina, a qual está localizada na membrana basal, com função intimamente envolvida na organização da matriz e também como mediador na ancoragem de células (FRANTZ *et al.*, 2010). Sua disposição é semelhante a do colágeno, além disso, está ligada a receptores de superfície celular, como as integrinas. Assim como a fibronectina, a glicoproteína laminina, também presente na membrana basal, tem a capacidade de se ligar as células facilitando a sua adesão. Além disso também tem um papel vital em diversos outros processos como diferenciação e migração celular (KULAR *et al*, 2014).

Os proteoglicanos são macromoléculas compostas por GAGs covalentemente ligados a um core proteico. Essas estruturas são capazes de interagir através das proteínas core ou GAGs das cadeias laterais com outras moléculas da MEC, atuando funcionalmente nas propriedades de sinalização celular, proliferação, migração, diferenciação, apoptose e adesão celular. A decorina, por exemplo, se liga as fibras de colágeno participando no seu alinhamento e também fibrinogênese (THEOCHARIS *et al*, 2016).

Dessa maneira, a MEC está intimamente ligada ao comportamento das células em sua superfície. Através de suas propriedades biofísicas, mecânicas e bioquímicas, específicas de cada tecido, capaz de regular o comportamento e o destino destas células, bem como do tecido como um todo. Portanto, compreender a estrutura da MEC é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos que regem as respostas biológicas ocorridas no tecido.

### 1.5.2 O uso da matriz extracelular e de células-tronco na engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é a área da biotecnologia que busca desenvolver/manipular moléculas, células, tecidos, ou órgãos para a produção de tecidos em laboratório. Um dos pontos principais que deve ser ressaltado inclui o tipo de célula e de substrato que será usado para “criar o tecido artificial”. Muitas estratégias utilizam arcabouços biológicos com a MEC preservada, a fim de facilitar a organização e diferenciação das células ali cultivadas para finalmente formar tecidos tridimensionais funcionais (DALEY *et al.*, 2008).

Assim, a MEC é uma fonte particularmente rica de sinais, atuando como suporte estrutural, com um reservatório de fatores de crescimento e sinais mecânicos. As estratégias clássicas de engenharia de tecidos visam recriar este ambiente da MEC de maneira a direcionar o comportamento celular no arcabouço de escolha, com o objetivo final de implantação no local de lesões ou doenças para restaurar a função do tecido. Idealmente, um microambiente será formado por uma matriz que induz determinado comportamento celular e as células por sua vez, respondem remodelando o substrato, estabelecendo um ciclo de feedback dinâmico que modifica a MEC de acordo com as necessidades de mudança da célula, permitindo que as células do arcabouço possam ditar o processo de reparo (SANDELACRUZ & KAPLAN, 2009).

Além da MEC, outro ponto principal a ser considerado no desenvolvimento de um tecido artificial é a fonte das células que serão cultivadas sobre ele. Essas células irão preencher a MEC fazendo conexões intercelulares, integrando com tecidos nativos, mantendo a homeostase e suporte metabólico (ALREFAI *et al.*, 2015). Células diferenciadas foram e ainda são extensivamente utilizadas na reconstrução de tecidos, com taxas de sucesso bastante variadas. Porém, as células-tronco, e mais recentemente, as células-tronco adultas se tornaram a principal fonte de escolha nas estratégias de repopulação das matrizes.

As células-tronco são células com a capacidade de se autorrenovar e com potencial de diferenciação. A autorrenovação é a característica de se manter por meio de inúmeros ciclos de divisão celular, enquanto o potencial de diferenciação se refere a capacidade de se tornar células ou tecidos específicos de acordo com os estímulos recebidos. As células-tronco de mamíferos são categorizadas com base na fonte da qual são derivadas: células-tronco embrionárias, são aquelas derivadas de

blastocistos; células-tronco adultas, encontradas nos tecidos em etapas mais adiantadas do desenvolvimento embrionário e no adulto; e células-tronco pluripotentes induzidas, que são células-tronco pluripotentes artificialmente derivadas de uma célula somática adulta (LIU *et al.*, 2012).

Nesse contexto, as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (aCTMs) são uma opção bastante interessante para a repopulação da MEC de arcabouços biológicos. Essas células podem ser de origem autóloga, o que tem sido o foco central da pesquisa na área da bioengenharia, tendo em vista a redução do potencial de rejeição e também da modulação da reação inflamatória. Além disso, possuem a vantagem de obtenção em larga escala usando técnicas minimamente invasivas (ZUK *et al.*, 2001). Estudos também sugerem que a multipotência dessas células aliada a eficiência proliferativa podem promover a produção de colágeno e também diferenciação em células musculares lisas ou endoteliais (PARK *et al.*, 2008; TOBITA *et al.*, 2011; MATHAPATI *et al.*, 2014).

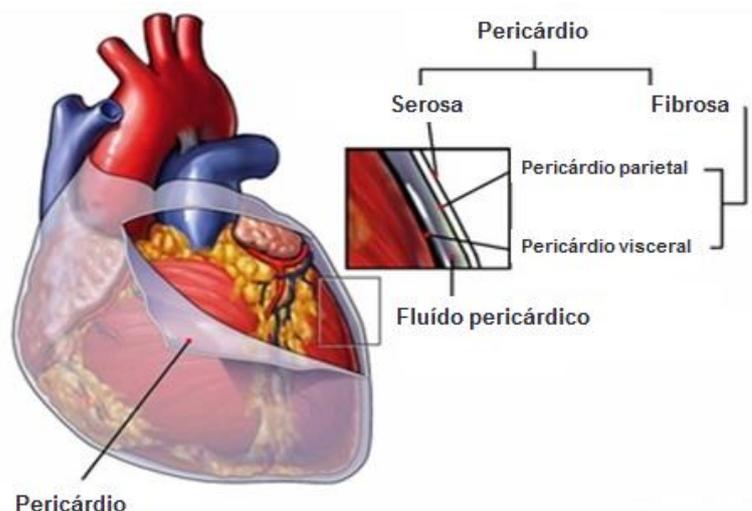
Além das células e do arcabouço biológico, uma quantidade suficiente de nutrientes e oxigênio para o material e células transplantadas é vital para a sobrevivência e manutenção do tecido. Além disso, sem uma oferta suficiente, apenas um pequeno número de células pré-semeadas no tecido sobreviveria ou migraria para o tecido circundante, ressaltando a importância da formação de uma rede vascular no sítio do material transplantado. Esse processo de geração de novos vasos é denominado neovascularização e pode ser considerado um dos principais desafios enfrentados pela engenharia de tecido no momento (HOSSEINKHANI *et al.*, 2013).

## 1.6 O USO DO PERICÁRDIO BOVINO NAS PRÓTESES VALVARES

Pericárdio é a membrana tecidual que envolve externamente o coração. Possui múltiplas funções, como a manutenção da posição anatômica do coração, prevenindo a sua dilatação e a adesão dos tecidos adjacentes ao órgão. Além disso, ele pode ser utilizado como uma fonte de biomaterial para uso em biopróteses, incluindo as próteses valvares (IAZZO, 2005).

O pericárdio é composto por duas faces: fibrosa e serosa. A face fibrosa é a que fica em contato com o epicárdio (camada mais externa de tecido conjuntivo cardíaco) e pode ser dividida em parietal e visceral. A face serosa é a face mais externa (FIGURA 1.8). Uma vez que o lado fibroso é sempre selecionado na manufatura das válvulas cardíacas para servir como face de contato com o fluxo

sanguíneo, é sistematicamente referida como “inflow”, por consequência, a camada serosa é referido como “outflow”. Entre essas duas camadas está a cavidade pericardial, a qual contém o líquido de lubrificação pericárdico. O tecido do PB é essencialmente constituído por tecido conjuntivo com células mesoteliais e é composto primariamente por colágeno I (aproximadamente 90%), elastina (5%), glicoproteínas e GAGs (GAUVIN *et al.*, 2013; IAZZO, 2005).



**Figura 1.8. Camadas do pericárdio bovino.** A imagem evidencia as duas faces do pericárdio: serosa e fibrosa.

FONTE: Adaptado de <https://socratic.org>

Cortes histológicos e microscopia eletrônica de varredura mostram que a face serosa é constituída por múltiplas camadas de fibras onduladas de colágeno orientadas paralelamente. Por outro lado, a face fibrosa contém fibras frouxamente orientadas, com maior proporção de vasos (arteríolas e capilares). Além disso, diferentes partes do tecido podem ter espessuras variadas ( $260 \pm 30$  mm), o que pode ser capaz de interferir diretamente nas suas propriedades mecânicas, sendo necessária uma seleção bastante rigorosa para o uso em biopróteses (GAUVIN *et al.*, 2013).

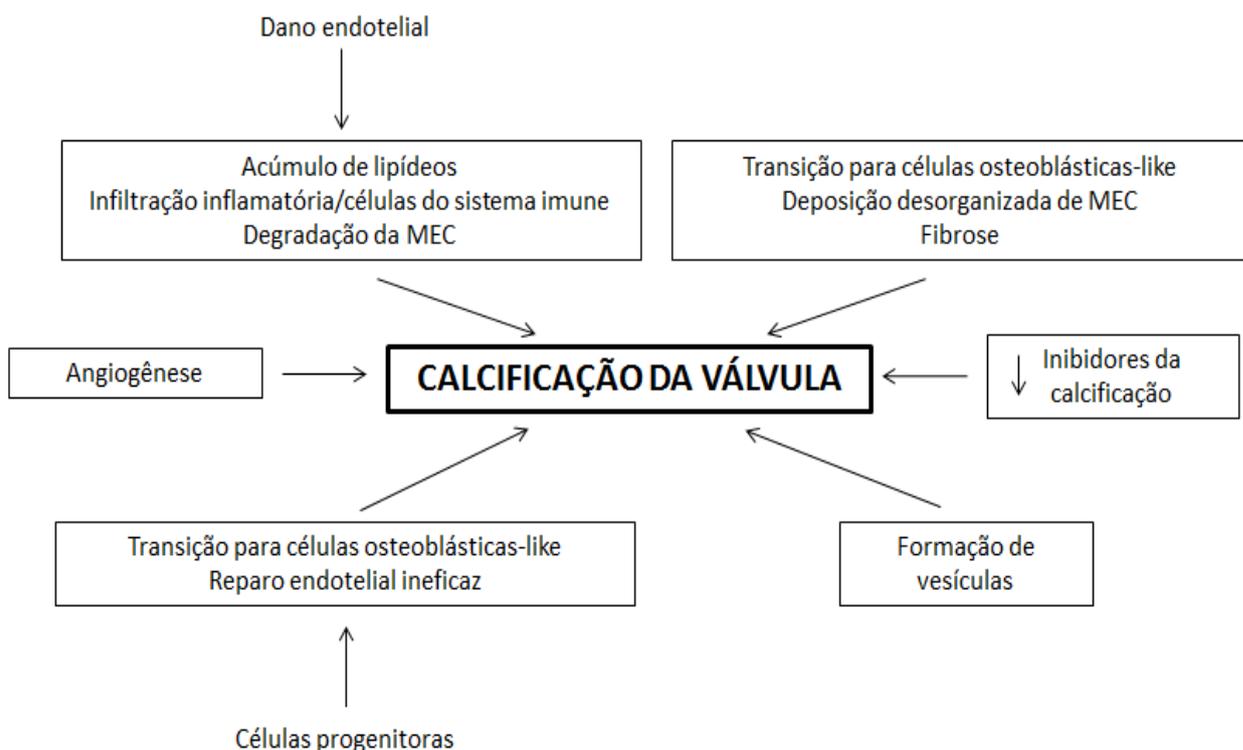
Tendo em vista as suas propriedades biológicas e mecânicas, o PB obtido de animais saudáveis representa uma ótima fonte de material para a implantologia cardiovascular. Desde a sua introdução em 1971 por Marian Ionescu como um constituinte de uma válvula cardíaca, o material se mantém como o “gold standard” para os cirurgiões (IONESCU *et al.*, 1977; GAUVIN *et al.*, 2013). Apesar da sua alta disponibilidade e biocompatibilidade, o PB é convencionalmente fixado com GA para uso em biopróteses, como forma de aumentar a sua estabilidade, reduzir antigenicidade e manter a esterilidade. No entanto, como mencionado anteriormente,

tecidos fixados com GA tendem a calcificar após um período longo de implantação, sendo este um dos maiores limitadores da longevidade de uma válvula cardíaca biológica (LEE *et al.*, 2012).

## 1.8 CALCIFICAÇÃO TECIDUAL

Por muitos anos a calcificação das próteses cardíacas foi reconhecida como uma deposição simples e passiva de complexos de fosfato de cálcio e hidroxiapatita nas válvulas danificadas. Porém, estudos atuais demonstram que se trata de um processo muito mais ativo que envolve válvulas, circulação, células e um vasto número de moléculas distintas. Muitos mecanismos propostos tentam explicar tal calcificação e também existem evidências de que na verdade múltiplos processos ocorram simultaneamente para que a patologia se instale (LEOPOLD, 2012).

Estudos sugerem que a transição de células intersticiais para células semelhantes a osteoblastos, formação de vesículas formadoras de nódulos de calcificação e acúmulo de lipídeos são os principais mediadores da calcificação (KAEDEN *et al.*, 2005; VENGRENYUK *et al.*, 2006). A esses processos tem se atribuído a infiltração de células inflamatórias do sistema imune e a redução da expressão gênica dos inibidores da calcificação, que em resposta promovem a angiogênese, fibrose e remodelamento da MEC (KAEDEN *et al.*, 2005). Além disso, processos pró-calcificatórios são contrabalanceados com inibidores circulantes da calcificação, sugerindo que a diminuição da expressão e atividade desses mediadores também pode contribuir para a calcificação cardiovascular patológica, como mostrado no esquema da FIGURA 1.9 (LEOPOLD, 2012).



**Figura 1.9. Principais mecanismos responsáveis pela calcificação das válvulas cardíacas.**

FONTE: Adaptado de LEOPOLD, 2012.

A calcificação acelerada está relacionada com pacientes recipientes jovens e com fixação com GA. Apesar da relação idade/calcificação já ser bem estabelecida, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Por outro lado, o GA utilizado como um pré-tratamento comum nas válvulas disponíveis comercialmente é também um potencializador da calcificação (SCHOEN & LEVY, 2005). Uma das teorias é que, devido ao fato do GA não estabilizar os GAGs, estes são perdidos após o armazenamento das válvulas e, por sua vez, a perda de GAGs resulta em áreas disponíveis para a nucleação do cálcio. No PB, a perda de GAGs resulta em calcificação, enquanto que a sua preservação promove a redução da mineralização da válvula (LOVEKAMP & VYAVAHARE, 2001).

### 1.9 DESCELULARIZAÇÃO TECIDUAL

A descelularização é uma técnica da engenharia de tecidos que consiste na remoção do material celular e nuclear, porém preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da MEC remanescente (GILBERT *et al.*, 2006;

CRAPO *et al.*, 2011). Na prática, isso significa maximizar a remoção do material celular e minimizar a perda da MEC.

O uso da MEC derivada de tecidos descelularizados é cada vez mais frequente nas estratégias da medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Já foi demonstrado que a MEC influencia na mitogênese e quimiotaxia celular, diferenciação e respostas de remodelamento tecidual. Porém, evidências indicam que o material celular residual tem uma influência negativa sobre a vantagem criada pelo arcabouço biológico no processo remodelador *in vivo*. Assim, os métodos de processamento do tecido, incluindo a descelularização, são determinantes críticos para o sucesso clínico (CRAPO *et al.*, 2011).

Muitos métodos foram desenvolvidos para a descelularização, dentre eles: tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos. O processamento físico utiliza agitação, sonicação, pressão, congelamento ou descongelamento para romper a membrana celular e libertar o conteúdo celular. Os tratamentos químicos, por sua vez, fazem uso de soluções básicas, ácidas, solventes orgânicos, agentes quelantes, soluções hipotônicas ou hipertônicas a fim de quebrar as conexões extracelulares. E por fim, os tratamentos enzimáticos usam proteases ou nucleases para clivar as ligações de peptídeos ou nucleotídeos, respectivamente. Todos esses métodos têm suas respectivas vantagens e limitações. Eles podem remover eficientemente os componentes celulares, tais como núcleos, actina e membrana celular, enquanto também podem induzir alguns efeitos adversos na composição biológica e nas propriedades biomecânicas do restante da MEC, visto que praticamente todos os métodos conhecidos de descelularização afetam o tecido, podendo acarretar em uma potencial perda e decomposição da estrutura de superfície. Geralmente, tais protocolos são adequadamente combinados para maximizar o efeito da descelularização (HOSHIBA *et al.*, 2010).

Entre os métodos mais comumente utilizados estão os detergentes iônicos, que são detergentes bastante fortes e capazes de romper a membrana celular completamente. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Triton-X estão entre os mais usados nos protocolos de descelularização, visto que dissolvem eficientemente as membranas e lipídeos da célula (KEANE *et al.*, 2015). Se comparado a outros detergentes, o SDS detém o maior rendimento na remoção de restos nucleares e proteínas do citoesqueleto, como a vimentina. Porém, o detergente tende a danificar a estrutura nativa do tecido e causar uma diminuição na concentração de GAGs e

perda de integridade do colágeno. No entanto, não parece que o SDS remova colágeno do tecido (GILBERT *et al.*, 2006).

Para minimizar os efeitos adversos sobre os constituintes da matriz remanescente do tecido descelularizado, protocolos que usam SDS idealmente aplicam múltiplas etapas de lavagens com baixa concentração e curto período de tempo de exposição. Também é importante salientar que o SDS pode ser difícil de ser removido completamente da matriz remanescente o que conseqüentemente pode afetar adversamente a citocompatibilidade da amostra (KEANE *et al.*, 2015). Assim, apesar da alta eficiência dos protocolos de descelularização utilizando SDS ainda é necessário um maior aperfeiçoamento das técnicas a fim de torná-las menos agressivas à MEC do tecido, de modo a manter suas características histológicas e de compatibilidade na interação célula-tecido.

## 1.10 RESPOSTA IMUNE AOS TECIDOS DESCELULARIZADOS

### 1.10.1 Resposta imune a arcabouços biológicos

Resultados de estudos pré-clínicos e clínicos com arcabouços biológicos variam muito, desde muito bem-sucedidos a casos de falha completa. A resposta imune a esses materiais, por sua vez, é principalmente atribuída a características como a espécie da fonte (por exemplo, humana, porcina ou bovina), o tecido do qual a MEC foi isolada (por exemplo, derme, intestino, pericárdio) e o nicho ao qual a prótese foi exposta após a implantação. Dessa forma, a descelularização, desinfecção e processo de fabricação podem influenciar diretamente na resposta imune modulada e no resultado funcional (KEANE *et al.*, 2012).

A resposta defensiva do corpo humano à invasão por moléculas causadoras de doenças é referida como a resposta imune. Em geral, sua principal função é resolver a infecção, restaurar os danos nos tecidos e restabelecer um estado de homeostase. A resposta ideal é rápida e destrutiva quando necessário, mas específica e auto-limitante. A resposta imune consiste de duas etapas: a resposta inata e a resposta adaptativa. A resposta inata refere-se ao mecanismo de defesa antígeno-inespecífico que um hospedeiro usa imediatamente ou dentro de várias horas após a exposição a um antígeno, como um patógeno ou a um biomaterial. Esta resposta destina-se ao reconhecimento e remoção do antígeno inibindo potenciais danos e induzindo um estado de inflamação. Quando a resposta imune inata é eficiente, o antígeno é

drenado para os linfonodos regionais e a resposta imune adaptativa é desencadeada. A imunidade adaptativa é específica ao antígeno, gerando respostas que são adaptadas à eliminação máxima de agentes patogênicos e células que exibem antígenos estranhos. Uma característica chave da imunidade adaptativa é o desenvolvimento da memória imunológica, em que os anticorpos específicos são gerados (NORTON & BABENSEE, 2009). Os biomateriais sintéticos são pensados para não iniciar uma resposta adaptativa, visto que não devem ser imunogênicos. No entanto, células e mecanismos envolvidos no início de uma resposta imune adaptativa foram encontrados em sítios dos implantes, sugerindo o envolvimento de uma resposta adaptativa na resposta imune a biomateriais (FRANZ et al., 2011).

Stein e colaboradores (1988) usaram microscopia eletrônica para estudar biopróteses porcinas e identificaram deposição de plaquetas em 67% delas e infiltrados de leucócitos (principalmente células mononucleares) em 82%. Os resultados deste estudo demonstraram que os leucócitos pareciam ter destruído as fibras de colágeno na válvula e tinham material cristalino presente nas suas superfícies, sugerindo que estavam agindo como um sítio de nidificação para a calcificação.

Wilhelmi e colaboradores (2003) realizaram análise imuno-histoquímica de biopróteses valvares fixadas em GA, aloenxertos de válvulas aórticas (homoenxertos) e explantes de válvulas aórticas de aloenxertos cardíacos cronicamente rejeitadas, comparando-os com válvulas aórticas normais como controles. Os tecidos foram corados para selectina (ELAM-1), integrina  $\alpha 1\beta 1$  (VLA-1), membros da família de supergenes das imunoglobulinas (ICAM-1 e -2, proteínas de cadeia pesada classe I), moléculas de adesão do complemento (CD34, CD44) e fator de von Willebrand. As proteínas ELAM-1, ICAM-1 e ICAM-2, CD34, CD44 e as proteínas de cadeia pesada classe I (todas importantes para processos inflamatórios) apresentaram maior expressão nas válvulas alogênicas e xenogênicas em comparação com as válvulas controle.

Estudos em animais também sugeriram que há uma resposta humoral às biopróteses implantadas. Human & Zilla (2001) descreveram em seu estudo um possível papel dos anticorpos específicos contra enxertos na calcificação. Dahm e colaboradores (1990), usando ensaios imuno-enzimáticos e de proliferação de linfócitos, forneceram evidências de que as válvulas pericárdicas bovinas tratadas com GA também provocam reações celulares e imunológicas humorais.

### 1.10.2 Presença de DNA após descclularização tecidual

A descclularização é considerada importante devido à potencial resposta imune adversa provocada por epítomos da membrana celular, DNA alogênico ou xenogênico e moléculas associadas a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (GILBERT *et al.*, 2009). No entanto, critérios quantitativos da descclularização não haviam sido descritos até que, em 2011, Crapo e colaboradores sugeriram que para um tecido ser considerado descclularizado ele deveria seguir os seguintes pontos: possuir quantidade de DNA de dupla fita menor que 50 ng por mg de peso seco de tecido; ter fragmentos de DNA menores que 200 pares de bases; e ausência de material nuclear visível nas colorações de DAPI ou H&E.

A presença de DNA xenogênico no arcabouço biológico já foi sugerido por outros autores como a causa da resposta inflamatória em pacientes (ZHENG *et al.*, 2005). De fato, muitas próteses biológicas comerciais contêm quantidades bastante variáveis de DNA remanescente. No entanto, elas tipicamente apresentam fragmentos de DNA menores do que 300 pares de bases (GILBERT *et al.*, 2009). Entretanto, é improvável que este tamanho de DNA seja capaz de remodelar a resposta imune (GILBERT *et al.*, 2009, NAGATA *et al.*, 2010).

Além disso, um estudo de Hülsmann e colaboradores indica a necessidade de inclusão de outros parâmetros além do conteúdo de DNA para determinação de remoção do material celular (2012). Como por exemplo, a inclusão de observações quantitativas de alterações do teor e distribuição de proteínas e fragmentos celulares, que são principalmente apresentados por restos da membrana celular, como o caso de epítomo alfa-gal (HÜLSMANN *et al.*, 2012).

### 1.10.3 A importância do epítomo alfa-gal

Até pouco tempo as reações imunes adversas aos substitutos valvares (fixados em GA), xenogênicos ou alogênicos, foram atribuídas aos componentes celulares das válvulas cardíacas. No entanto, válvulas cardíacas bioprotéticas expressam diferentes epítomos próprios das espécies (bovino, porcino ou equino), cuja eliminação ou inativação é obrigatória para atender aos requisitos de uma melhoria necessária na aplicação clínica. Um desses epítomos é o epítomo alfa-gal.

O epítipo alfa-gal ( $\text{Gal}\alpha 1\text{-}3\text{Gal}\beta 1\text{-(}3\text{)4GlcNAc-R}$ ) é abundantemente sintetizado em espécies mamíferas através da glicosilação pela enzima  $\alpha 1,3\text{galactosiltransferase}$  ( $\alpha 1,3\text{GT}$ ). O xenoantígeno já foi encontrado na membrana celular associado a glicolípídeos e glicoproteínas e também em glicoproteínas secretadas, incluindo o fibrinogênio (GALILI *et al.*, 1987). Em seres humanos e primatas superiores, esse epítipo está ausente devido a ausência do gene que transcreve a  $\alpha 1,3\text{GT}$ , o qual foi inativado em tais espécies (GALILI *et al.*, 1985). Aproximadamente 1% das imunoglobulinas circulantes humanas são específicas para este antígeno, devido a contínua estimulação do sistema imune pela flora gastrointestinal (RIEBEN *et al.*, 2000). Na prática, o xenoantígeno alfa-gal se torna a maior barreira que previne o transplante de tecidos de origem animal.

Em primatas, por exemplo, o antígeno foi capaz de desencadear, dentro de algumas horas, a ativação do sistema de complemento e rejeição hiperaguda de transplante de um heteroenxerto porcino (GALILI, 2001). No entanto, a quantidade presente na MEC da submucosa intestinal porcina foi insuficiente para ativar o sistema de complemento em plasma humano (McPHERSON *et al.*, 2000). Para humanos, infelizmente, o procedimento de fixação com GA não é capaz de fornecer o seu completo mascaramento. Particularmente, a presença residual dos anticorpos direcionadas ao xenoantígeno alfa-gal aumenta significativamente a partir do décimo dia após a implantação de uma bioprótese cardíaca (KONAKCI *et al.*, 2005), atingindo um pico em cerca de 3 meses para os isotipos IgM e IgG (MANGOLD *et al.*, 2014). E como sugerido por Human & Zilla (2001), os anticorpos formados podem causar opsonização do tecido valvar com consequente iniciação de um recrutamento de macrófagos mediado por receptores Fc.

Dessa maneira, para aplicações futuras neste campo, portanto, parece importante que os novos arcabouços apareçam negativados para o antígeno alfa-gal em testes imunohistológicos. Além disso, apesar da descelularização da MEC representar um grande avanço no desenvolvimento das biopróteses, permanece a questão central da eficiência de reconstituição de uma válvula cardíaca usando tecido descelularizado capaz de manter a estrutura da MEC intacta e susceptível ao repovoamento celular.

## 2 HIPÓTESE

A biotecnologia juntamente com a engenharia de tecidos tem mudado as perspectivas na área das próteses cardíacas com o desenvolvimento de novas técnicas de descelularização. Apesar da descelularização da MEC representar um grande avanço no desenvolvimento das biopróteses valvares, ainda existem questões em aberto a respeito do potencial e da eficiência de reconstituição e imunogenicidade de uma válvula cardíaca de PB descelularizado.

Assim, a possibilidade de utilizar uma solução de descelularização eficiente, que remova os componentes celulares diminuindo a sua ação imunogênica, porém, ao mesmo tempo suave, de maneira a permitir que a complexa estrutura de fibras colágenas e elásticas sejam preservadas, poderia apresentar vantagens aos protocolos utilizados até o momento, principalmente com relação à necessidade de uso do fixador glutaraldeído. Atualmente o principal agente químico utilizado no processo de descelularização é o SDS. Boa parte dos trabalhos o aplica em concentrações de 1 a 10%. Dessa maneira, é comum tais protocolos associarem efeitos citotóxicos e mudanças estruturais adversas nos arca-bouços teciduais que vão além da remoção celular. Sendo assim, a utilização de uma solução de descelularização com SDS em menor concentração seria uma nova tentativa de otimização do protocolo, trazendo benefícios em relação a integridade tecidual e também ao repovoamento do arca-bouço, um dos principais desafios da engenharia de tecidos.

A hipótese desse trabalho é que o processo de descelularização do PB, utilizando um protocolo de descelularização branda com SDS 0,1%, seja eficaz na remoção de componentes celulares, preservando a integridade tecidual das fibras elásticas e colágenas, de maneira que o repovoamento da bioprótese com células-tronco mensênquimais humana seja possível e o uso do fixador glutaraldeído seja dispensável. Assim, visando o desenvolvimento de biopróteses valvares, este estudo avalia através de análises histológicas e de biocompatibilidade a descelularização branda do PB com SDS 0,1%.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação tecidual da integridade da MEC de PB submetido ao processo de descelularização branda com SDS 0,1% e sua biocompatibilidade com células-tronco mesenquimais humanas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do processo de descelularização do PB através da quantificação de DNA residual;
- Determinar a integridade tecidual do PB após descelularização através do monitoramento histológico das fibras colágenas e elásticas;
- Identificar e avaliar a disposição e integridade de proteínas da MEC no PB após o processo de descelularização;
- Avaliar a remoção do antígeno alfa-gal após o processo de descelularização;
- Testar a citotoxicidade do PB descelularizado de acordo com a ISO 10993/5;
- Testar a biocompatibilidade do PB descelularizado através do repovoamento celular do arcabouço utilizando células-tronco mesenquimais humana.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras de tecido cardíaco utilizadas neste trabalho são provenientes de animais de abate da espécie *Bos taurus*. Sua coleta foi realizada em frigorífico com regulamentação sanitária e ambiental. A Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, define que cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo podem ser utilizadas sem necessidade de parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

Por outro lado, neste trabalho também foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano. O tecido adiposo utilizado foi obtido de doadores submetidos a lipoaspiração da região abdominal na Clínica de Cirurgia Plástica Dr. Bettles, Curitiba/Paraná. O uso de tais células está contemplado em projeto aprovado pelo CEP/FIOCRUZ sob parecer de número 1.308.195 (Plataforma Brasil – CAAE 48374715.8.0000.5248), cujos objetivos/subprojetos incluem o presente trabalho.

### 4.2 COLETA DO PERICÁRDIO DE CORAÇÕES BOVINOS E DESCELULARIZAÇÃO

Os pericárdios foram obtidos da espécie *Bos taurus* provenientes do frigorífico FrigoKeller LTDA – Guarapuava-PR, credenciado pelo Ministério da Agricultura e com registro no Serviço de Inspeção Federal. As amostras foram obtidas de animais saudáveis, de ambos os sexos, com idade variando entre 6 e 8 meses. Após a coleta, os corações foram imersos em solução salina 0,9% e solução de antibiótico 1% e transportados até o Núcleo de Enxertos Cardiovasculares da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (NEC/PUCPR) onde foram submetidos a lavagens com solução salina tamponada e dissecados. Os pericárdios foram mantidos em solução de antibiótico (1mg/ml Streptomina + 1mg/ml de penicilina + 0,5mg/ml de Anfotericina em RPMI 1640) a 4°C.

Para a descclularização, foram utilizados 250 mL da solução de SDS 0,1% sob agitação constante a 185 rpm, em temperatura ambiente, por um período de 24 horas. Após, os pericárdios foram lavados com álcool 70% por 24 horas e com solução de cloreto de sódio 0,9% em agitação por um período de 10 dias, para assegurar a

remoção completa dos detergentes, conforme metodologia descrita na patente PI 0800603-2. Após a descelularização os tecidos foram mantidos a 4°C em solução de PBS com antibióticos (1mg/ml Streptomicina + 1mg/ml de penicilina + 0,5mg/ml de Anfotericina). O processo de fixação com glutaraldeído não foi praticado neste trabalho, pois este método de descelularização visa tornar o tecido biológico acelular, menos imunogênico e receptivo ao repovoamento com novas células.

#### 4.3 ANÁLISE DE DNA RESIDUAL

Para o controle de do processo de descelularização, os pericárdios bovinos descelularizado e nativo (n=9) foram primeiramente fixados em formalina tamponada a 10%, emblocados em parafina e cortados em micrótomo a 4 µm. Os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados com 1 µg/µL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) e H&E (Hematoxilina-Eosina) para análise de presença de material nuclear.

Além disso, uma porção das amostras foi liofilizada, até um peso constante, para extração do DNA. Utilizando o protocolo de extração por meio da precipitação com acetado de potássio (baseado no livro *Current Protocols in Molecular Biology – 2012 - Protocols for DNA isolation*, LIU & HARADA, 2012), 500 µl de tampão de extração (SDS 10%, TrisHCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0,5M e água milliQ) juntamente com 3µl de proteinase K (20mg/ml, Invitrogen, cat.: 25530049) e 10 µl de DNA spike de timo de bezerro (800 ng/µl, Sigma-Aldrich, cat.: 91080-16-9) foram adicionados aos tecidos pulverizados (20 ±0,5 mg) e incubados a 60°C sob agitação de 800 rpm overnight.

A seguir, adicionou-se as amostras 167 µl de acetato de potássio (60% acetato de potássio 5M, 11,5% ácido acético glacial, pH7,5), que foram incubadas no freezer a -20°C por 10 min. A seguir, os tecidos foram centrifugados a 11.200 xg a 4°C por 15 min. Recolheu-se 500 µl do sobrenadante e adicionou-se 400 µl de isopropanol para precipitação do DNA. Após uma nova centrifugação a 11.200 xg por 15 min a 4°C o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 70 µl de água milliQ. Uma vez purificadas, as alíquotas de DNA foram quantificadas por leitura de absorbância no espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000) em um comprimento de 260 nm. A quantidade de DNA foi expressa em µg/mg de tecido seco de amostra e o protocolo foi realizado em triplicatas técnicas. A porcentagem de recuperação do DNA é calculada com base na fórmula = (AMOSTRA COM SPIKE - AMOSTRA SEM SPIKE x 100) / 8000. Para

confirmar os resultados, também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% com as amostras de DNA extraídas dos pericárdios descelularizado e nativo.

#### 4.4 IMUNOFLORESCÊNCIA

Os mesmos blocos de parafina utilizados para a coloração H&E e DAPI foram usados para realizar os cortes de 4 µm utilizados para a imunofluorescência. Assim, as lâminas foram desparafinizadas e se necessário (conforme informações do fabricante do anticorpo) foi realizada a recuperação antigênica térmica com tampão de citrato de sódio (10mM de citrato de sódio diidratado, 0,05% Tween 20, pH 6,0) ou recuperação antigênica enzimática através da solução de tripsina 0,05%, conforme TABELA 4.1. Para a reação de recuperação antigênica térmica, após a desparafinização e lavagem de três vezes com PBS, o tampão de citrato de sódio foi adicionado ao container com as lâminas e colocado no microondas até a fervura. Após a fervura, contavam-se 10 minutos em potência baixa para então as lâminas resfriarem por aproximadamente 1 hora. Já para a recuperação enzimática, 500 µL de solução de tripsina 0,5% foram adicionados as lâminas, as quais foram incubadas por 10 minutos a 37° C. Mediante o término das recuperações antigênicas, os protocolos seguiam normalmente conforme descrito abaixo.

Tabela 4.1. Anticorpos contra proteínas de matriz extracelular e condições utilizadas para as imunofluorescências.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca, Número de Catálogo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Reativação antigênica</b>
Anti-colágeno I	Abcam, ab292	1:200	Térmica
Anti-colágeno III	Abcam, ab630	1:200	Térmica
Anti-colágeno IV	Abcam, ab6586	1:250	Térmica
Anti-decorina	Abcam, ab54728	1: 100	Térmica
Anti-laminina	Abcam, ab11575	1:50	Térmica e Enzimática
Anti-elastina	Abcam, ab21610	1:100	Térmica
Anti-lumicam	Abcam, ab168348	1:100	Térmica e Enzimática
Anti-vimentina	BD, 550513	1:200	Térmica

Assim, as amostras de pericárdio fresco ou descelularizado (n=6) foram bloqueadas com PBS 1% BSA por 60 min e então incubadas por mais 60 min com os

anticorpos primários. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS, incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Flúor 546 ou com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a Alexa Flúor 488 diluídos a 1:800 e 1:600 respectivamente, por 60 min a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após a incubação com os anticorpos secundários, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e foi realizada a marcação com DAPI 1 µg/ µL por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se então com três lavagens com PBS para eliminar resíduos de DAPI.

Para o antígeno alfa-gal o anticorpo utilizado foi o clone M86 (LifeSpan Bioscience, cat.: LS-C63415, 1:5) juntamente com o anticorpo secundário anti-IgM humano conjugado com PE (Moss, cat.: GTIM-001, 1:250) por 60 min. Além disso, o epítipo alfa-gal também foi marcado com Isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada a FITC (BSI-B4; Griffonia simplicifolia, Sigma). Para todas as condições foram realizados controles para os anticorpos secundários. Para tanto, ao invés dos anticorpos primários, os tecidos foram incubados com uma solução de PBS 1% BSA e em seguida as demais etapas foram realizadas.

As lâminas de imunofluorescência foram visualizadas utilizando o microscópio invertido DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) associado ao software de deconvolução AF6000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Todas as imagens foram feitas sob mesmo tempo de exposição e ajuste de contraste e brilho.

#### 4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os PB nativo e descelularizado (n=2) foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>, fixados em glutaraldeído 2,5% por 2 horas e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por mais 2 horas, ambos em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,2. Após duas lavagens no mesmo tampão de 5 minutos, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, 5 minutos em cada) e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO<sub>2</sub>. A seguir, foram montados em suportes metálicos, recobertos com ouro coloidal e observados ao microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6010PLUS-LA em voltagem de aceleração de 20 kV.

#### 4.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO

A citotoxicidade do pericárdio descelularizado foi analisada utilizando o ensaio de contato direto, conforme ISO 10993/5-2009, referente a análise de materiais biomédicos – testes para citotoxicidade *in vitro*. De acordo com a normativa, células BALB/c 3T3 (clone A31 – Banco de células do Rio de Janeiro – RJ, Brasil; passagem #102) em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina foram cultivadas por 72 horas a 37°C ( $2,2 \times 10^5$  células por poço) sobre fragmentos de aproximadamente 3cm<sup>2</sup> de pericárdios nativo e descelularizado aderidos em placas de 6 poços. Para a adesão dos pericárdios ao fundo das placas, foi necessário incubar os fragmentos por 2 horas na estufa a 37°C. Após esse período a solução de meio contendo células foi adicionada delicadamente sobre os fragmentos. Células BALB/c 3T3 na condição normal de cultivo e com adição de SDS (100 ng/µl) foram usadas como controles negativo e positivo respectivamente. Após a incubação, as células ao redor do tecido foram analisadas em microscópio de contraste de fase para avaliar seu crescimento em contato com o tecido, tendo como referência a classificação morfológica qualitativa proposta pela ISO 10993/5. Este experimento foi realizado em triplicata técnica e duplicata biológica.

#### 4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR EXTRATO – ENSAIO DE CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Outro método sugerido pela ISO 10993/5 para avaliar a citotoxicidade é o ensaio de captação do corante vermelho neutro. Tal protocolo permite avaliar o potencial citotóxico de uma substância por meio da incorporação do corante pelos lisossomos das células viáveis, servindo como uma medida quantitativa da viabilidade. Assim, o efeito tóxico de uma substância teste está correlacionado indiretamente com a coloração vermelha resultante das células. O ensaio é validado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) seguindo o guideline 129 (OECD, 2010).

Para realização do ensaio foram utilizadas células BALB/c 3T3 cultivadas no meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 4 mM de L-glutamina, sem antibióticos. Essas células foram plaqueadas em placa de 96 poços em uma

suspensão de  $2,5 \times 10^4$  células/ml de meio, sendo adicionado 100µl/poço. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Para avaliar o potencial citotóxico do PB através de seu extrato, 5g de tecido nativo e descelularizado foram maceradas e separadamente adicionadas a 5mL de meio DMEM (razão de 1g de tecido para cada 1mL de meio) para então serem incubadas a 37°C por 72 horas. Após esse período as soluções foram centrifugadas a 500 rpm e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. Esse material foi submetido a oito diluições seriadas de fator 2,15 em meio DMEM sem soro fetal bovino. As células cultivadas por 24 horas tiveram seu meio retirado e foi adicionada uma mistura de 50 µl de meio DMEM (suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-Glutamina) e 50 µl dos diferentes tratamentos contemplando ao final em cada poço as seguintes concentrações (500; 232,5; 108,1; 50,3; 23,4; 10,8; 5; 2,3 mg/mL) de cada extrato de amostra. Em cada placa foi incluída a condição de controle positivo, no qual a célula é exposta apenas ao meio de cultivo; o branco, que são poços sem célula, que possibilitam ajustar a absorbância na hora da leitura; e para cada experimento foi realizado um controle com SDS, que consiste em um padrão citotóxico bem caracterizado para o experimento de vermelho neutro. Após o tratamento as células foram mantidas em cultura por mais por mais 48 horas.

Após o tempo de tratamento as células foram lavadas com DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Salina), em seguida coradas com 25 mg/mL de vermelho neutro (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) diluído em DMEM (suplementado com 5% soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e incubadas durante 3 h a 37° C. A solução de vermelho neutro foi retirada e os poços foram novamente lavados com DPBS e o vermelho neutro que foi absorvido pelas células foi eluído com uma solução composta de 50% de etanol e 1% de ácido acético. As placas foram submetidas à agitação por período de 20 a 45 min para extrair o corante até formar uma solução homogênea. A densidade óptica das amostras foi medida em 540 nm em um leitor Multi-Mode Synergy H1 (Biotek®, Winooski, Vermont, USA). Os valores das absorbâncias foram convertidos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle e exportados para o programa GraphPad Prism 5 para serem analisados.

#### 4.8 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Para o teste de biocompatibilidade foram utilizadas aCTMs. Tais células se encontram congeladas no repositório de células do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco do Instituto Carlos Chagas e foram isoladas usando digestão enzimática como descrito por Rebelatto e colaboradores (2008). De maneira geral, 100 ml de tecido adiposo foi coletado através de lipoaspirado na Clínica de Cirurgia Plástica Dr. Bettes, Curitiba/Paraná. O tecido coletado foi então lavado com PBS estéril seguido de digestão enzimática com 1 mg/ml de colagenase tipo I (Invitrogen) por 30 minutos a 37 °C. A seguir, o tecido foi filtrado usando um filtro de membrana de 40 e depois 100 µm (BD FALCON, BD Biosciences Discovery Labware). A suspensão de células foi então centrifugada a 800 g por 10 minutos e os eritrócitos eliminados através de um tampão de lise de eritrócitos, pH 7.3. Por fim, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation), 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de streptomicina em garrafas ou placas conforme protocolo estabelecido em nosso laboratório. Os cultivos foram mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, havendo trocas periódicas do meio de cultivo a cada 3-4 dias. O repique celular foi realizado através de tratamento com tripsina / EDTA 0.25% (Invitrogen) para individualização celular quando o cultivo atingia 80% de confluência da monocamada.

A partir deste protocolo, as células foram então caracterizadas quanto ao seu perfil de expressão de antígenos de superfície através de citometria de fluxo (REBELATTO et al., 2008). Assim, foi avaliada a positividade para os marcadores CD105, CD90, CD73, CD166, CD29 e CD44, além da baixa expressão (menos de 2% de células positivas) para CD14, CD45 e CD31. As células também foram avaliadas quanto a sua capacidade de diferenciação, após indução específica, em adipócitos e osteoblastos.

#### 4.9 ENSAIO DE BIOCAMPATIBILIDADE

Para essa avaliação *in vitro* os pericárdios descelularizados (n=3) foram cortados em pedaços de aproximadamente 1cm<sup>3</sup> e incubados em solução de antibiótico (1mg/ml estreptomicina + 1mg/ml de penicilina + 0,5mg/ml de Anfotericina em PBS) por 24 horas. Após esse período, estes foram mantidos *overnight* a 4°C em

DMEM (suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-Glutamina, 1g/100ml penicilina e estreptomicina). Na sequência, os pericárdios foram colocados em poços da placa de cultivo Terasaki do sistema de gota pendente (Nunca Brand Products) em sextuplicatas, para a adição de 50.000 aCTMs (passagem #5) em meio DMEM suplementado. O sistema de cultivo em gota pendente permite que um lado do tecido fiquisse totalmente em contato com a solução de células, favorecendo a interação entre ambos.

Após 24 horas de cultivo, os tecidos eram transferidos para uma placa de 6 poços não aderente (Corning), de maneira a manter em suspensão os arca-bouços de pericárdio com as células. Ambos os cultivos foram mantidos a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, havendo trocas periódicas do meio de cultivo (a cada 2 dias). Passadas 24 horas e 7 dias de cultivo, os tecidos foram fixados em PFA 4% por 10 minutos, emblocados em composto O.C.T (Meio Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura-4583) e mantidos a - 80 °C. Por fim, os blocos foram cortados no criostato com espessura de 8 µm e posicionados em lâminas para então serem corados com DAPI a fim de verificar a presença de células no tecido. Tomou-se o cuidado, durante o emblocamento das amostras, que estas ficassem em posição vertical, a fim de que fossem realizados cortes transversais para verificar a penetração das células no tecido.

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram feitas utilizando o software Graphpad Prism (versão 5.0). Os dados foram expressos em média ± desvio padrão. Para as comparações entre grupos o teste t não pareado foi aplicado. Os valores considerados significativos foram aqueles com  $p \leq 0,05$ .

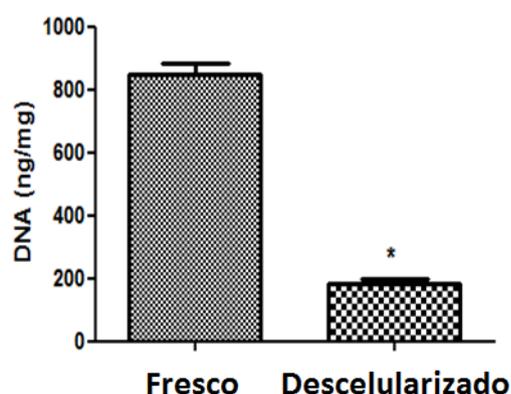
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUANTIFICAÇÃO DO DNA RESIDUAL

Com o desenvolvimento e obtenção da patente PI 0800603-2 para descclularização de homoenxertos valvares, o NEC/PUCPR obteve um protocolo para a descclularização branda de tecidos. Este mesmo grupo de pesquisa gerou resultados *in vivo* e clínicos com a aplicação de tecidos descclularizados de válvulas porcinas, humanas e PB fixado em GA, obtendo resultados bastante positivos que indicam maior resistência à degradação tecidual e calcificação dos enxertos (COSTA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2009; COLATUSSO *et al.*, 2011; COLATUSSO *et al.*, 2012).

Assim, com o objetivo de avaliar e confirmar este processo de descclularização em PB, a quantidade remanescente de DNA nas amostras foi mensurada. Tal etapa é de extrema importância, pois como já demonstrado por Zheng e colaboradores (2005), a permanência de núcleos ou fragmentos de DNA no tecido descclularizado é um dos fatores que pode gerar reações pró-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Tais reações inflamatórias podem ser causadas pela forte tendência do DNA em se manter aderido à MEC (GILBERT *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2005). Sendo assim, a certificação da descclularização tecidual busca evitar reações imunogênicas nos pacientes com tais tecidos implantados e também no cultivo com outras linhagens celulares.

Segundo Crapo e colaboradores (2011), um tecido pode ser considerado descclularizado quando atende três critérios básicos: apresentar menos de 50 ng de DNA por mg de tecido seco, fragmentos de DNA menores de 200 pb visualizados em gel de agarose e ausência de núcleo em cortes histológicos com coloração H&E ou DAPI. Sendo assim, foi possível observar que o processo de descclularização promoveu redução significativa na quantidade de DNA das amostras, se comparadas ao tecido nativo (FIGURA 5.1). O conteúdo de DNA mensurado nas amostras de tecido descclularizado e tecido nativo estão apresentados na TABELA 5.1. Apesar da diminuição e heterogeneidade entre as amostras, elas ainda apresentaram quantidades expressivas de DNA no tecido descclularizado, com média de  $198,7 \pm 94,33$  ng/mg. O protocolo de descclularização removeu entre 94 a 61% do conteúdo de DNA, em comparação ao tecido nativo. A média geral de descclularização tecidual foi de 77%. Além disso, foi atingida uma recuperação satisfatória do spike de DNA, com média acima de 70% (TABELA 5.1), estabelecendo a confiabilidade do protocolo de extração de DNA genômico utilizado.



**Figura 5.1. Quantificação de DNA genômico extraído de PB fresco ou descelularizado.** O método de extração através do acetato de potássio evidenciou redução média de 77% da quantidade de DNA das amostras após a descelularização (n=9). Com uma média de  $198,7 \pm 94,33$  ng/mg de DNA para os tecidos descelularizados e  $846,6 \pm 181$  ng/mg para os tecidos frescos.

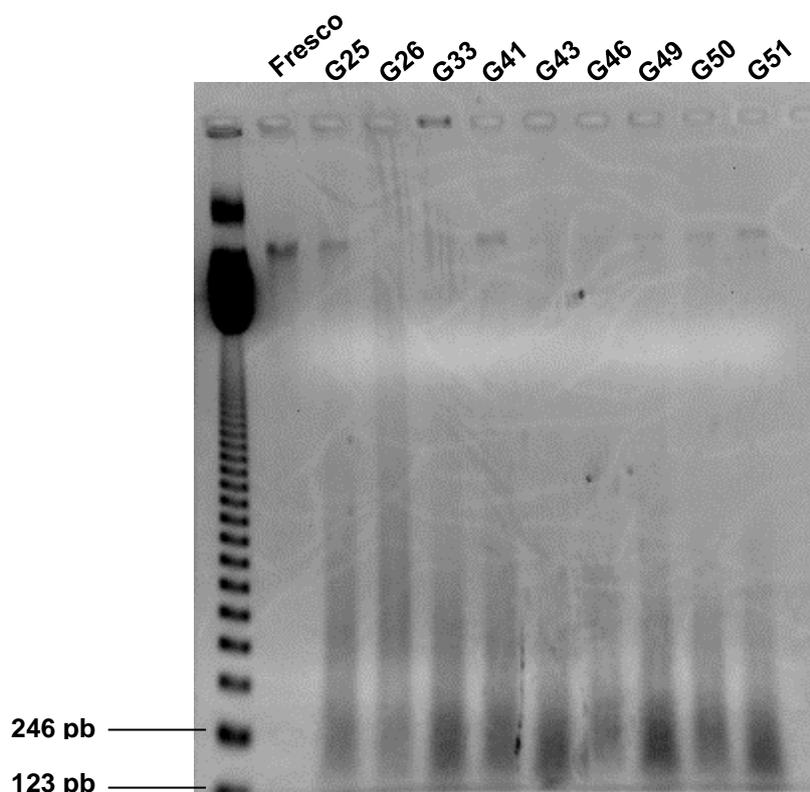
Tabela 5.2 Quantificação do conteúdo de DNA genômico para diferentes amostras de tecido de pericárdio bovino descelularizado e nativo (fresco).

Amostra	Fresco	Descelularizado	% de descelularização	% recuperação de spike
<b>G25</b>	911,5 ± 153,3	161,2 ± 55,9*	82,3	99,0
<b>G26</b>	763,0 ± 86,6	191,8 ± 29,9*	74,9	85,2
<b>G33</b>	1031 ± 34,9	162,8 ± 15,4*	84,2	73,0
<b>G41</b>	711,6 ± 227,5	255,3 ± 161,8*	74,5	73,1
<b>G43</b>	665,7 ± 188,9	169,9 ± 99,1*	64,1	55,3
<b>G46</b>	1124 ± 46,35	63,23 ± 8,1*	94,4	72,2
<b>G49</b>	905,6 ± 184,5	246,7 ± 128,6*	72,8	93,7
<b>G50</b>	686 ± 116,1	199 ± 100,6*	61,0	72,7
<b>G51</b>	821,1 ± 199,4	115,3 ± 58,43*	86,0	59,1
<b>Média</b>	846,6 ± 181,6	198,7 ± 94,33*	77,1	75,9

O DNA total é apresentado pela média das triplicatas de cada amostra em ng/mg ± desvio padrão. Os dados foram analisados por teste t que revelou uma significativa redução na quantidade de DNA para todas as amostras descelularizadas (\* p < 0.05).

Por outro lado, eletroforese em gel de agarose foi feita para confirmar a presença de DNA nas amostras, como mostrado na FIGURA 5.2. Foi possível observar a presença de bandas de DNA > 300 pb em todas as amostras de tecido descelularizado, ou na forma de uma banda íntegra, na altura da banda do tecido

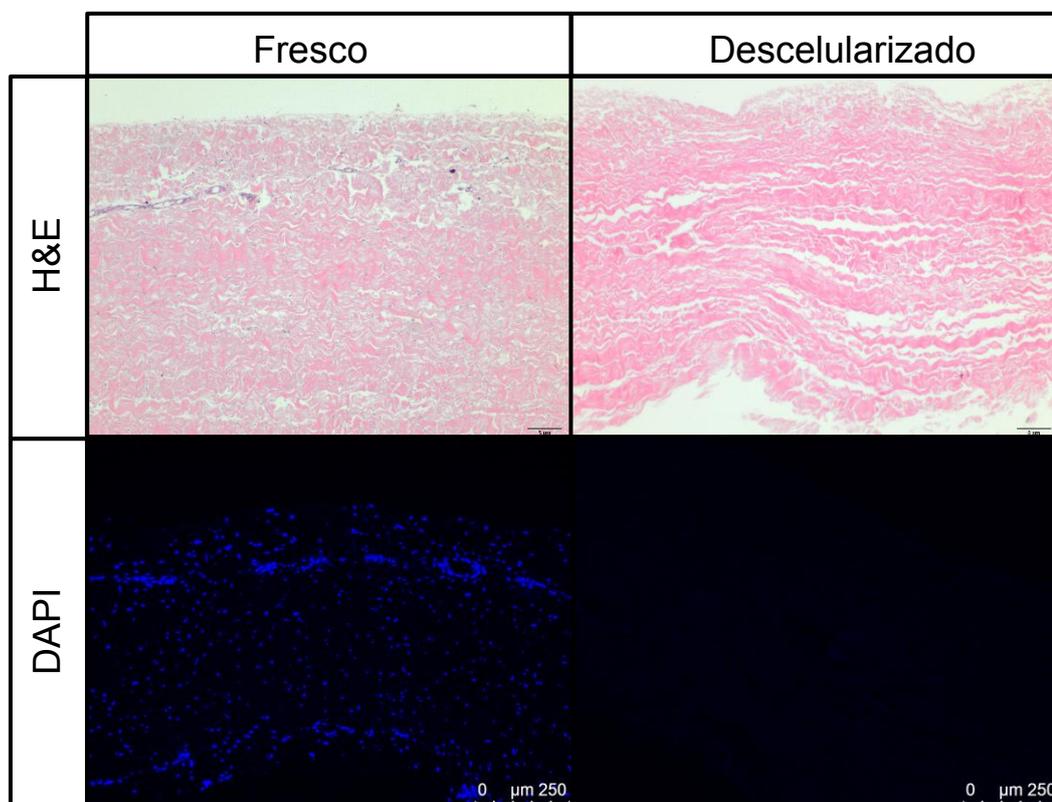
nativo, porém menos intensa, ou como um rastro de material genômico na parte mais inferior do gel. Isso sugere que, apesar de haver DNA no tecido, ele está presente em menores quantidades e também na forma mais degradada do que no tecido nativo. O rastro de DNA fica ainda mais evidente na faixa de 246 pb, onde ele é mais intenso do que no restante do gel, sugerindo que grande parte do DNA de fato foi degradado em pedaços menores com a descclularização. Assim, podemos afirmar que o processo de descclularização utilizando solução de SDS 0,1% resultou na diminuição da quantidade de DNA no tecido, porém com a permanência de pequenos fragmentos de DNA.



**Figura 5.2 Eletroforese de DNA. Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA extraído de amostras de tecido descclularizado (sem spike) em comparação ao tecido nativo (fresco sem spike).** Na eletroforese é possível observar bandas ou degradados de DNA em todas as amostras de tecido descclularizado. Marcador de DNA: 123 pb

Entretanto, os tecidos descclularizados mostraram-se acelulares nas colorações de H&E e DAPI (FIGURA 5.3), em comparação ao tecido nativo, o qual exibiu marcação nuclear positiva em toda a sua extensão. A ausência de marcação dos núcleos celulares nas marcações histológicas, apesar da presença de DNA na quantificação bioquímica e eletroforese, pode ser explicada pelo fato do corante DAPI se ligar apenas ao DNA íntegro, ou seja, de dupla-fita e, como já observado no gel de

agarose, é provável que o mesmo tenha sido degradado em fragmentos menores durante a descelularização, o que pode impossibilitar a marcação. Além disso, a quantidade de DNA remanescente pode ser considerada pequena para ser detectada nesse tipo de marcação histológica, uma vez que, quanto mais íntegro o núcleo, mais fácil é a sua detecção.



**Figura 5.3 Confirmação da descelularização com marcação nuclear através das colorações de H&E e DAPI.** Ambas as colorações mostraram a ausência de núcleos celulares no tecido descelularizado.

Apesar das válvulas cardíacas descelularizadas já serem implantadas em pacientes há muitos anos, faltam detalhes relacionados aos níveis de DNA presentes nesses enxertos. Esse é um tópico de grande importância, dado o potencial papel dos remanescentes celulares na calcificação dos substitutos valvares e o fato de a quantidade de DNA ser considerada um bom indicador do grau de remoção celular (CRAPO et al., 2011, SCHOEN & LEVY, 2005). No entanto, a maioria dos estudos mostra a eficácia dos protocolos de descelularização considerando apenas a ausência de núcleo celular com marcações de H&E e DAPI (REIDER *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2005; MATHAPATI *et al.*, 2014).

Em contrapartida, um estudo recente publicado por Keane e colaboradores (2012) questionou a ideia do potencial papel do DNA como gatilho da resposta imune

através da avaliação das consequências de uma descclularização ineficiente na resposta imune do hospedeiro. Seus dados sugeriram que tanto a descclularização ideal proposta por Crapo e colaboradores (2011) quanto outra de menor eficácia tiveram papéis similares no remodelamento imune *in vitro* e *in vivo*.

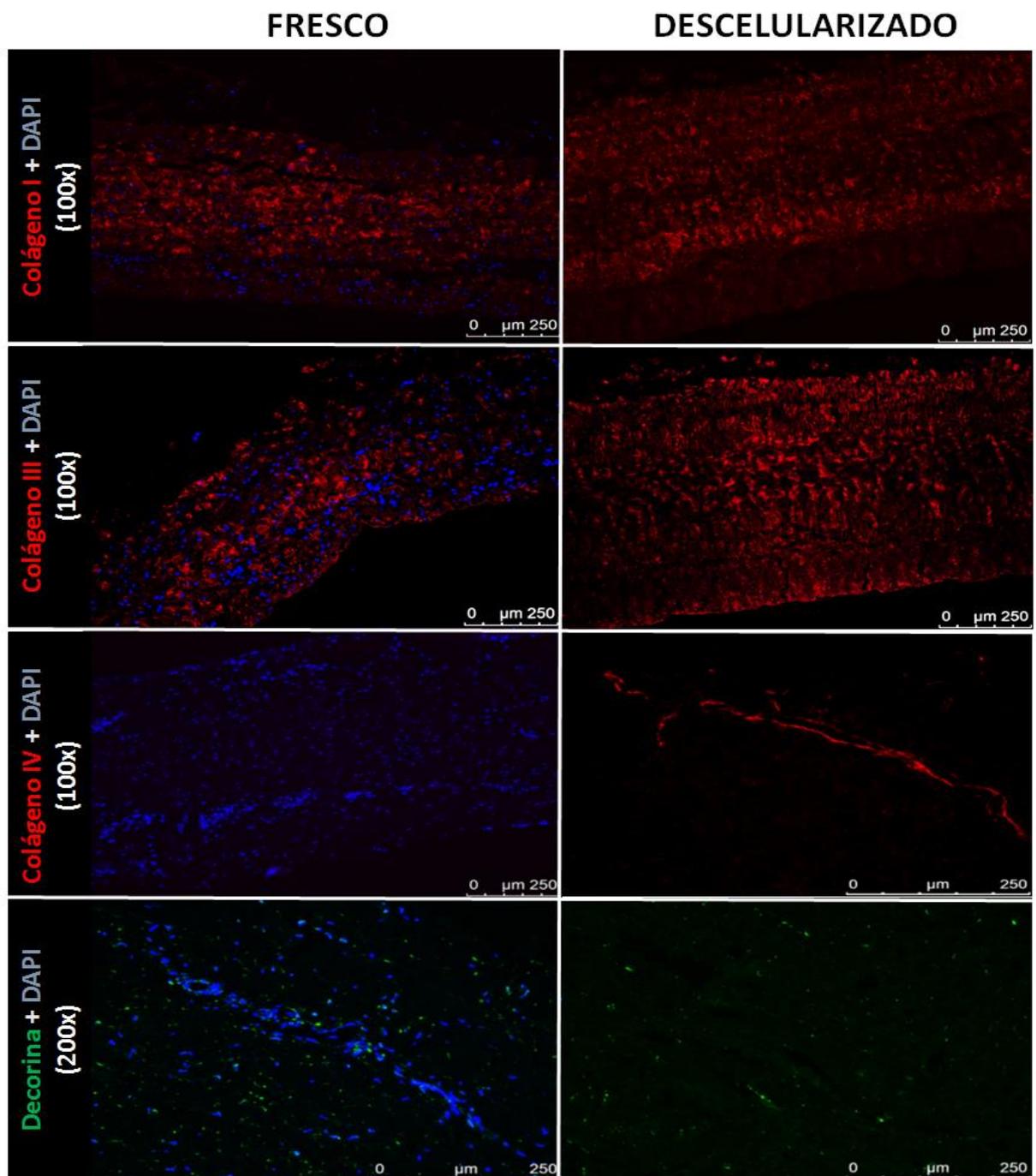
Além disso, os critérios de Crapo e colaboradores (2011) foram propostos para todos os tipos de tecidos descclularizados, sem considerar as especificidades de cada um, como: fonte da MEC; tipo de tecido no qual a matriz descclularizada será implantada; e resposta imune do hospedeiro. Utilizando a mesma solução de descclularização de SDS 0,1%, Costa e colaboradores (2009) analisaram por mais de 24 meses 44 pacientes que foram submetidos a cirurgia de Ross (autotransplante da válvula pulmonar na posição aórtica) com a válvula descclularizada. O acompanhamento de tais pacientes mostrou uma excelente taxa de sobrevivência bem como baixa incidência de reoperações. Além disso, com base em estudos prévios do grupo utilizando PB descclularizado com o mesmo protocolo, com implantação *in vivo* em ratos e ovinos, se acredita que a quantidade remanescente de DNA, mensurada em aproximadamente 200 ng/ul, possa ser considerada aceitável para os padrões de descclularização do PB (COLATUSSO *et al*, 2011; COLATUSSO *et al*, 2012).

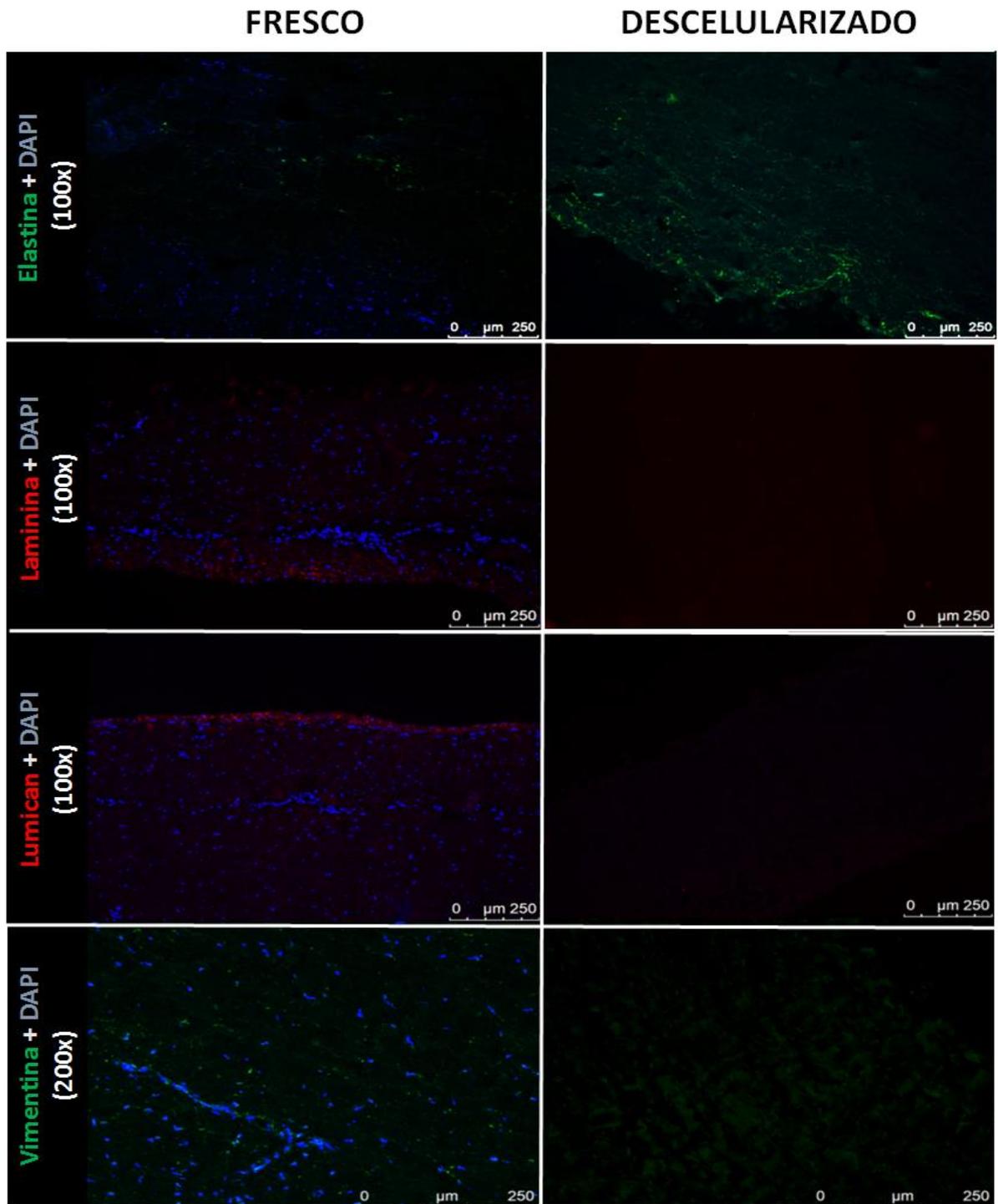
## 5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E DE IMUNOFUORESCÊNCIA DOS TECIDOS DESCCLULARIZADO E NATIVO

Espera-se que um bom arcabouço biológico mantenha a sua MEC descclularizada preservada, com conteúdo de fibras elásticas e colágenas comparável com o tecido nativo. Para avaliar tais parâmetros, a disposição e integridade de algumas proteínas de MEC (colágeno tipo I, III e IV, lumican, decorina, laminina e elastina) e a proteína de citoesqueleto vimentina foram avaliadas através da técnica de imunofluorescência. As imunomarcações foram realizadas antes (controle positivo) e após a descclularização. Apesar de haver na literatura uma descrição das proteínas presentes na MEC do PB, ainda não havia sido utilizado um painel abrangente de anticorpos que possibilitasse avaliar a variabilidade da sua distribuição após a descclularização como foi feito neste trabalho (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

Após o tratamento, observamos que o conteúdo e disposição dos colágenos I e III, os maiores constituintes da MEC, não foi alterado (FIGURA 5.4). Os colágenos I e III mantiveram a sua característica aparência ondulada, sendo o colágeno III mais

presente nas áreas mais externas do tecido, como mostrado em imagens representativas da FIGURA 5.4. Por sua vez, o colágeno IV foi observado apenas no tecido descelularizado. Nossa hipótese é que o SDS tenha desnaturado parcialmente tal proteína deixando mais evidente o seu epítipo para marcação. As proteínas decorina e elastina também mantiveram-se presentes e regularmente dispostas após a descelularização. Porém, laminina e lumican apresentaram marcação reduzida no tecido após a remoção das células nativas. A proteína de citoesqueleto vimentina, a qual se esperava ser removida juntamente com as células no tecido descelularizado, não apresentou marcação após descelularização (FIGURA 5.1).





**Figura 5.4. Caracterização da matriz extracelular por imunofluorescência.** Identificação das proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I, III e IV, lumican, decorina, laminina e elastina) e vimentina através de imunofluorescência. Amostras representativas de pericárdios bovinos nativos e descellularizados.

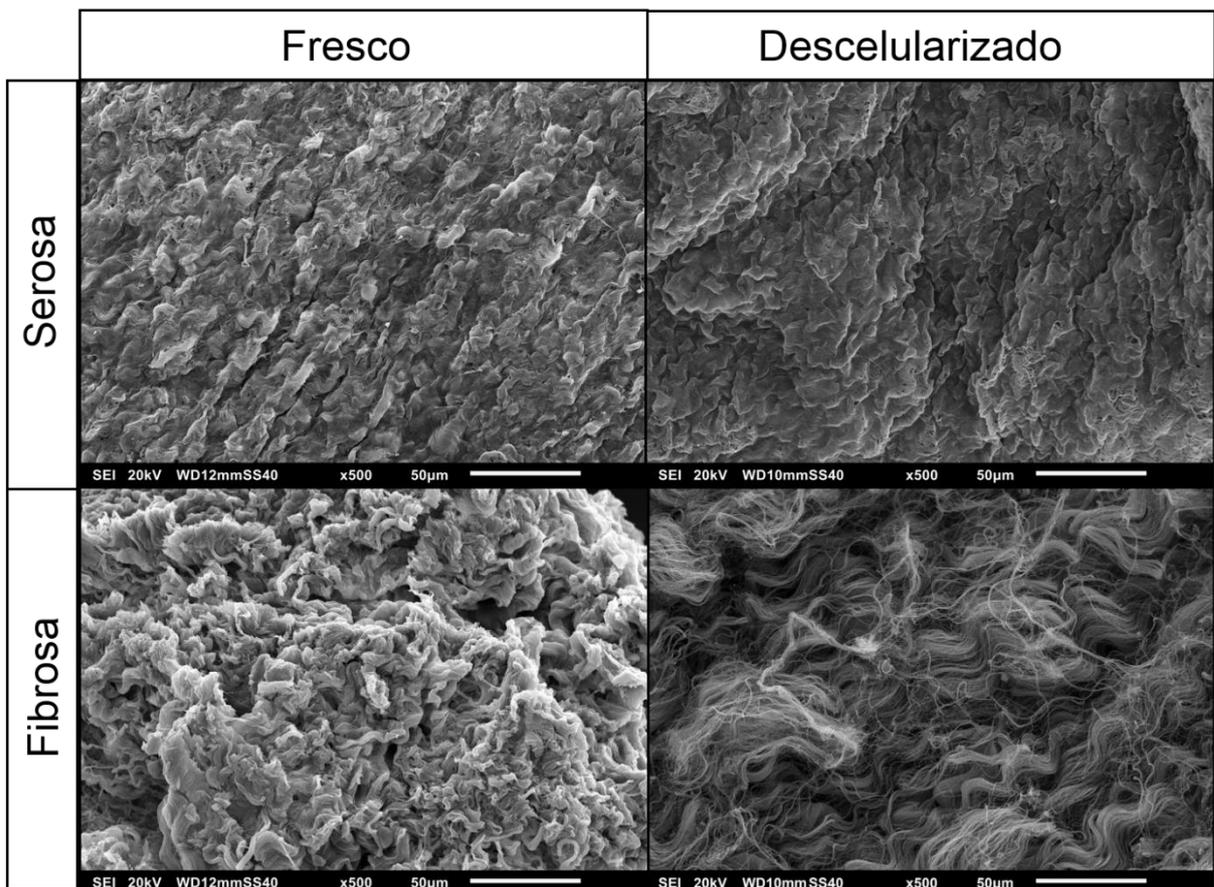
Embora pareça lógico que a descellularização, por definição, afete a estrutura e composição da MEC, a intenção do processo é a preservação das propriedades mecânicas e biológicas da MEC o quanto for possível. Alguns detergentes que

costumam facilitar a descelularização demonstraram também que podem interferir na estrutura do colágeno (BADYLAK et al., 2009). Por sua vez, foi comprovado que a ruptura ou fragmentação dessas fibras afeta o comportamento biomecânico do pericárdio descelularizado (AGUIARI et al., 2017). No entanto, a diminuição da marcação de colágeno nas imunofluorescências não foi observada em nosso estudo.

Mais do que isso, a imunofluorescência incluiu a análise de colágeno IV, comumente utilizado para marcar a membrana basal, que é considerada de grande importância na endotelização do tecido (HERBST et al, 1988). Sendo assim, a sua detecção, juntamente com o colágeno I, III e decorina indicam um impacto mínimo no tecido pós-descelularização, o que facilitaria a adesão e diferenciação celular. Portanto, acredita-se que esse tecido descelularizado tenha capacidade de ser reconhecido pelas células do hospedeiro e permitir o seu remodelamento *in vivo*.

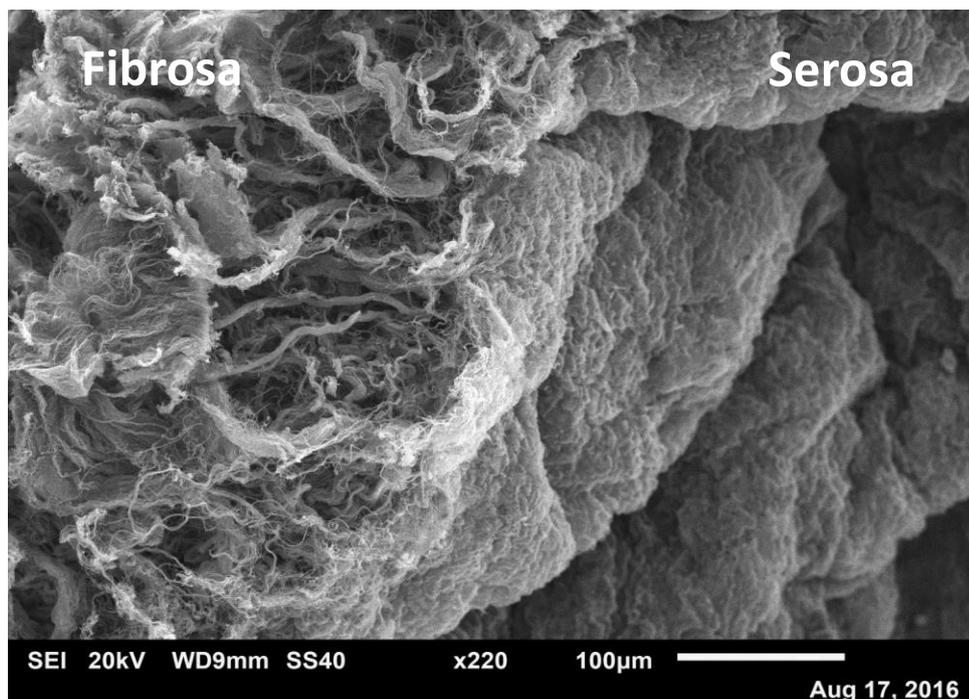
Corroborando com os dados de imunofluorescência, a coloração de H&E (FIGURA 5.3) também confirmou a preservação do tecido após a remoção dos componentes celulares. Como esperado, foi possível observar o afrouxamento das fibras do tecido descelularizado, o que pode ser resultado do espaço livre deixado pela remoção das células e material fibrilar. Os mesmos cortes de tecido também possibilitaram a clara visualização das duas faces do pericárdio bovino: serosa e fibrosa. O lado fibroso foi caracterizado principalmente pela pobre orientação das duas fibras de colágeno, com um aspecto mais frouxo e por outro lado, a superfície serosa apresenta-se mais lisa, com fibras de colágeno mais bem alinhadas (FIGURA 5.5).

A microscopia eletrônica de varredura foi outra técnica utilizada que possibilitou a visualização mais detalhada de tais superfícies, bem como o monitoramento da conservação tecidual após descelularização. Mais uma vez, foi confirmado o afrouxamento das fibras após a descelularização, o qual foi mais acentuado na face fibrosa do tecido, como mostrado nas imagens representativas da FIGURA 5.5. O lado seroso apresentou-se mais liso, com fibras de colágeno mais bem dispostas, morfologia está bastante similar ao tecido nativo



**Figura 5.5. Microscopia eletrônica de varredura para o pericárdio fresco e descelularizado.** A microscopia eletrônica de varredura evidenciou os dois lados do pericárdio bovino; seroso e fibroso, nos períodos pré e pós descelularização.

A diferença entre as faces do pericárdio bem como o seu devido posicionamento na confecção de uma válvula cardíaca (lado fibroso como o “inflow” e seroso como “outflow”) é de extrema importância e pode ser facilmente identificado a olho nu, microscopia ótica ou microscopia eletrônica de varredura (FIGURA 5.6). Pires e colaboradores (1999) relataram diferenças funcionais entre os lados seroso e fibroso do PB utilizado como remendo para fechamento arterial, assim como aumento do risco de calcificação do enxerto quando o lado seroso estava em contato com o fluxo sanguíneo, “inflow”. Além disso, Gauvin e colaboradores (2013) mostraram que a exposição do lado seroso ao lúmen vascular resulta em aumento da adesão plaquetária e trombogenicidade aguda em comparação com o lado fibroso.



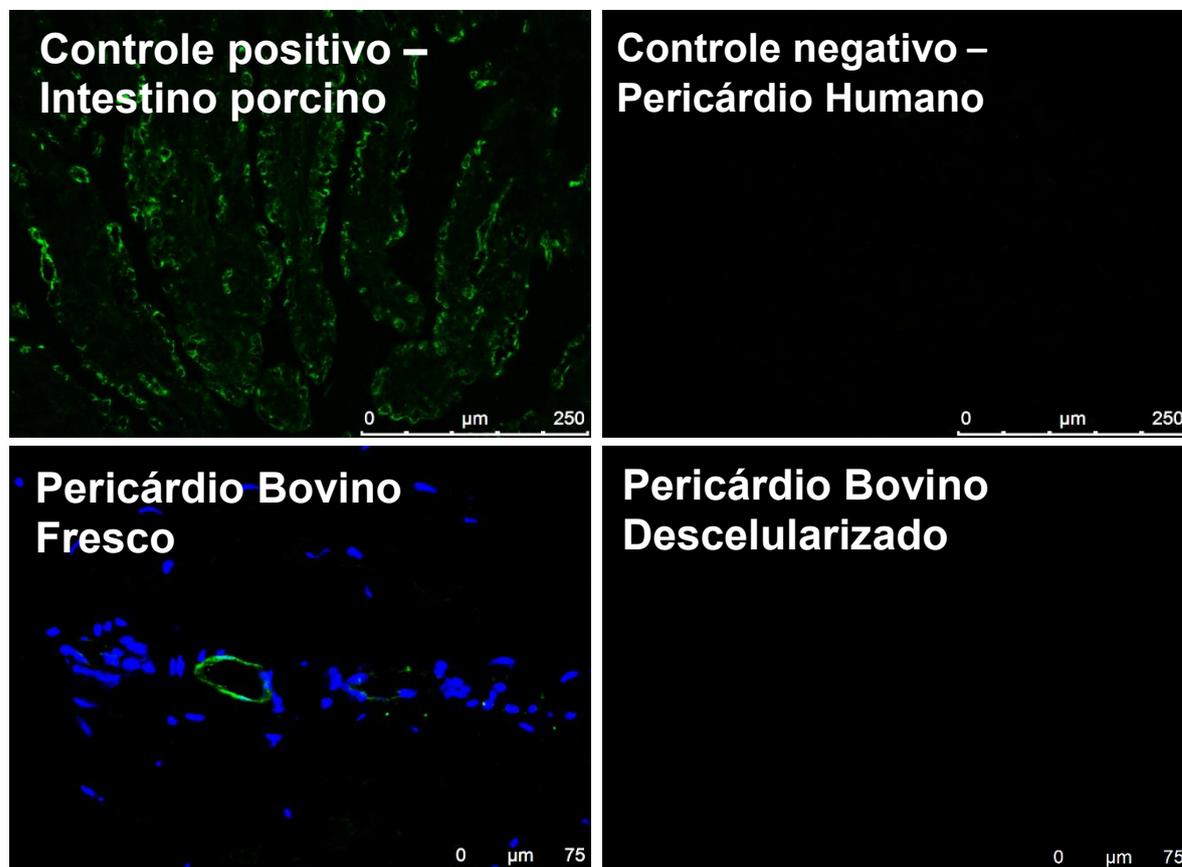
**Figura 5.6. Microscopia eletrônica de varredura do pericárdio bovino descelularizado.** A microscopia eletrônica de varredura evidenciou os dois lados do pericárdio bovino; lado fibroso (“inflow”) e seroso (“outflow”).

### 5.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO ANTÍGENO ALFA-GAL

A presença de DNA no tecido não é o único agente causador da xenoantigenicidade. Outro componente da MEC, o carboidrato galactose-alfa-1,3-galactose, também conhecido como alfa-gal, está bastante relacionado com a imunocompatibilidade dos biomateriais na prática clínica, sendo um dos principais responsáveis em iniciar uma rejeição imune. O epítipo alfa-gal é ubiquitinado em mamíferos não primatas e macacos do Velho Mundo, assim a exposição ao epítipo alfa-gal de outros animais ativa a produção constitutiva de anticorpos xenoreativos correspondentes (GALILI, 2001). Conseqüentemente, anticorpos anti-alfa-gal são os principais mediadores da rejeição hiperaguda em xenotransplantes discordantes (YANG & SYKES, 2007). Sendo assim, é de extrema importância certificar-se que o PB descelularizado estará livre do epítipo alfa-gal, de maneira a atestar a sua imunocompatibilidade *in vivo*.

Assim, a lectina BSI-B4 foi utilizada como marcador do epítipo alfa-gal em imunofluorescência e mostrou que o epítipo foi removido eficientemente após a descelularização (FIGURA 5.7). As lâminas foram analisadas por toda a sua extensão e não foi encontrada marcação positiva em nenhum dos pericárdios utilizados. Foi possível também observar que no corte de tecido de intestino de porco (controle

positivo) o anticorpo tem uma marcação mais dispersa pelo tecido, enquanto que no PB nativo ela está evidente principalmente ao redor dos vasos, apesar de também haver marcação ao longo da matriz (FIGURA 5.7). Imagens complementares podem ser encontradas no APENDICE A.

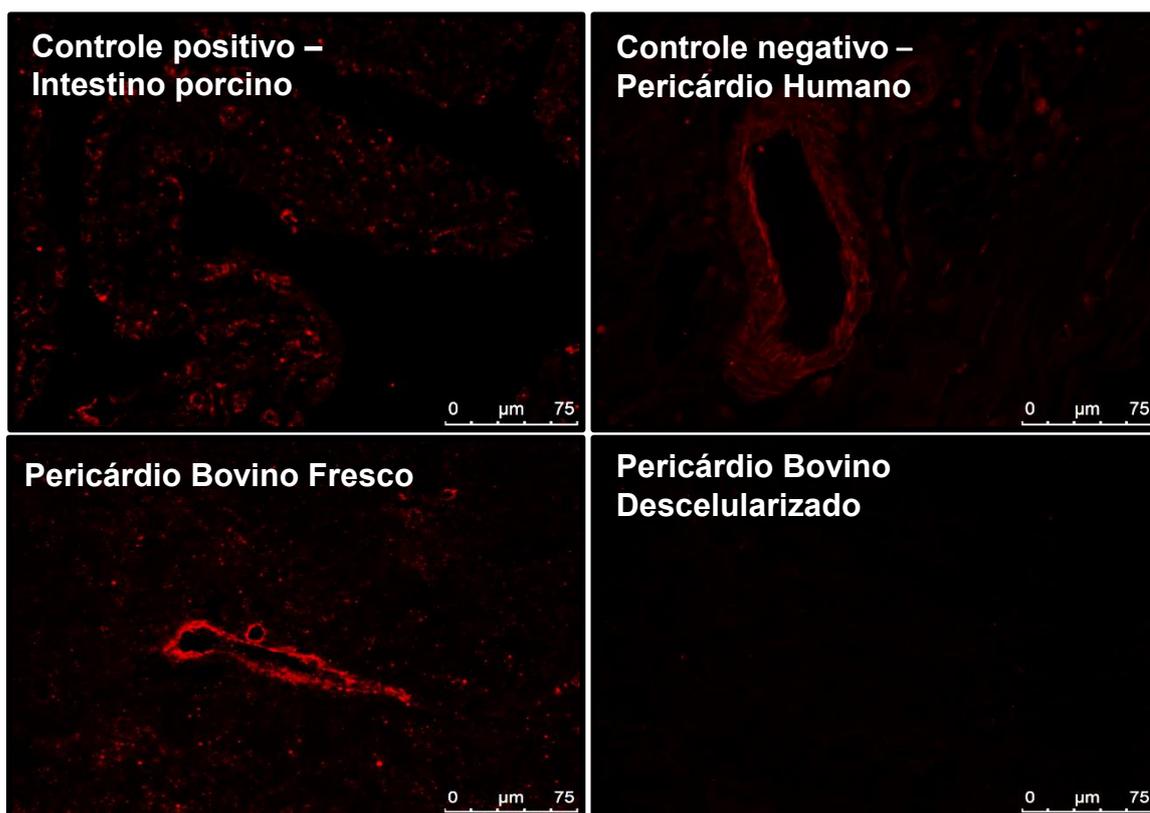


**Figura 5.7. Detecção do antígeno alfa-gal utilizando lectina BSI-B4.** Em verde está a marcação do epítipo alfa-gal e em azul o corante DAPI marcando os núcleos celulares. No controle positivo e no tecido nativo o epítipo alfa-gal pode ser visualizado, no controle negativo de pericárdio humano não há marcação evidente. Por fim, no pericárdio bovino (G71) descelularizado a lectina BSI-B4 mostrou-se não reativa (Magnificação de 400x).

Como forma de confirmar os resultados obtidos com a lectina foi realizada a marcação com o anticorpo M86, também utilizada como marcador do epítipo alfa-gal (IOP *et al.* 2009). Aproximadamente 10 anos atrás, a detecção do epítipo imunoxenogênico alfa-gal era possível utilizando-se apenas a lectina reativa de *Bandeiraea griffonia*. Apesar de lectinas não serem anticorpos, elas podem ser usadas para marcar cortes de tecidos quando conjugadas com um fluoróforo, como o FITC. Dessa maneira, a fim de excluir a possibilidade de marcação cruzada, o anticorpo

monoclonal M86, descrito por Galili e colaboradores (1998) como um IgM específico para resíduos de açúcar xenogênicos também foi utilizado.

De modo semelhante ao observado com a lectina, o antígeno não foi visível nos cortes pós-descelularização (FIGURA 5.8). A distribuição da marcação seguiu os padrões encontrados em outros estudos com o clone M86, com organização no controle positivo por toda a MEC, porém predominando ao redor das células dos vasos sanguíneos. No controle negativo houve pequeno background devido a autofluorescência do tecido e o PB fresco teve marcação predominante ao redor dos vasos (FIGURA 5.8). Assim como realizado para a lectina, as lâminas foram analisadas por toda a sua extensão e não foi encontrada uma marcação positiva específica para o alfa-gal. No entanto, como mostram as imagens complementares presentes no APÊNDICE B, foi possível observar em alguns casos uma marcação inespecífica (provável precipitação do anticorpo secundário), na forma de pontos fluorescentes dispersos por toda a extensão da lâmina, mesmo onde não há tecido.



**Figura 5.8. Detecção do antígeno alfa-gal utilizando o anticorpo M86.** No controle positivo e no tecido de PB nativo o epitopo alfa-gal pode ser visualizado. No controle negativo de pericárdio humano apenas o background da autofluorescência do tecido é evidente. Por fim, no PB descelularizado (G46) o anticorpo M86 mostrou-se não reativo (Magnificação de 400x).

Anteriormente, já havia sido demonstrado que o tratamento com GA, geralmente aplicado a biopróteses comerciais, não era capaz de mascarar completamente a presença do antígeno alfa-gal. Vários epítomos alfa-gal em PB nativo e tratado com GA em válvulas cardíacas porcinas ainda estão expostos e reativos, eventualmente prejudicando a durabilidade dos enxertos (NASO *et al.*, 2013). Porém, em nosso trabalho, vimos que o processo de descclularização seguido do tratamento com GA foi eficaz na remoção do antígeno. Tal fato é de extrema importância visto que o mascaramento não confiável do antígeno pode ser considerado um dos principais responsáveis por disparar a rejeição hiperaguda, representando um déficit fundamental do processo de fixação (HÜLSMANN *et al.*, 2012).

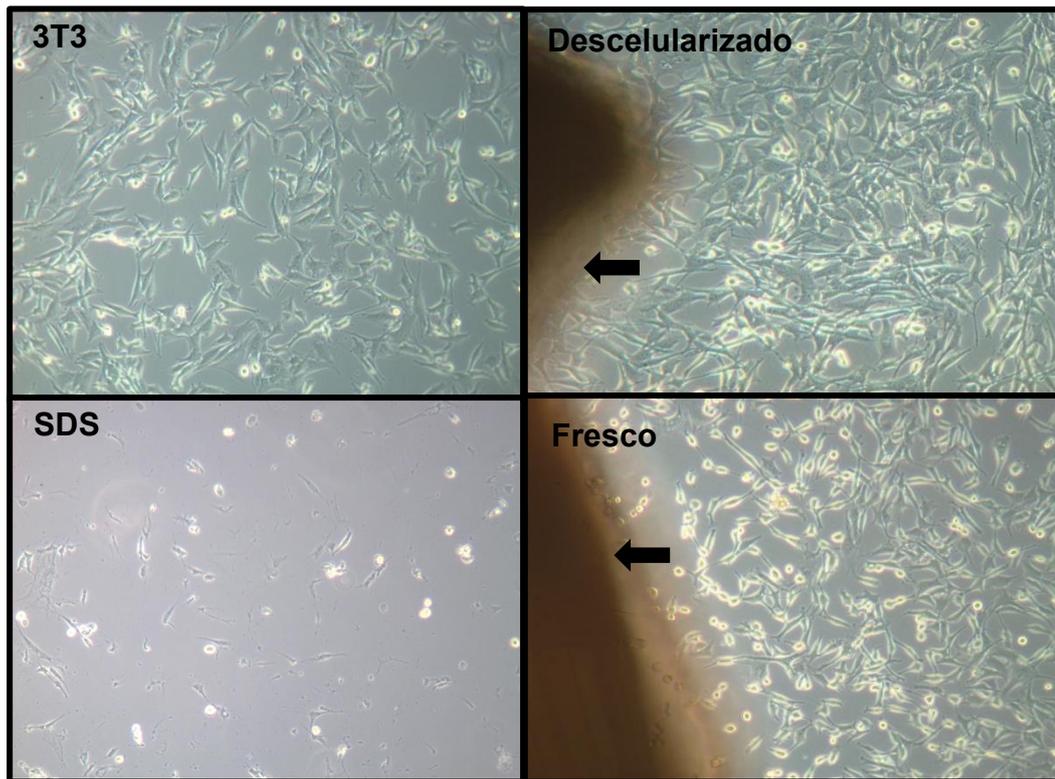
No trabalho publicado por Kim e colaboradores (2015) foi mostrado que o PB fixado em GA apresentou maiores níveis de cálcio do que o pericárdio de um primata. Além disso, o aumento de anticorpos IgG no PB, mas não no grupo dos primatas, sugeriu que uma resposta imune estava acontecendo no tecido implantado. No entanto, tais diferenças nos níveis de cálcio e IgG eram insignificantes no grupo de pericárdio tratado com GA com uma etapa adicional de incubação com a enzima alfa-galactosidase. Os autores propõem, desta maneira, que a remoção do antígeno alfa-gal pode ser um método aliado efetivo na prevenção da calcificação da bioprótese.

Atualmente, a eficácia de um tratamento de decelularização geralmente é avaliado por vários métodos, incluindo técnicas histológicas clássicas, imunohistoquímica e/ou análise de fluorescência, quantificação de DNA e eletroforese. No entanto, estranhamente a detecção e quantificação residual do alfa-gal e/ou os antígenos similares ao alfa-gal ainda não foram adotados como um procedimento de controle padronizado para a produção de materiais xenogênicos confiáveis e adequados para serem implantados em seres humanos. Dessa maneira, acreditamos que a análise do epítomo alfa-gal, fisiologicamente presente na membrana de tecidos xenogênicos, é também um marcador para avaliação da remoção completa de detritos celulares e, portanto, deva ser incluído nas análises básicas de descclularização de maneira a proporcionar maior segurança aos pacientes contra reações imunes.

## 5.4 CITOTOXIDADE

Antes do início dos ensaios de biocompatibilidade dos PBs é necessário ter conhecimento da citotoxicidade do tecido após o processo de descelularização. Nesse contexto, os detergentes têm um papel muito importante. Esses componentes químicos podem ser capazes de dissolver as membranas celulares, de maneira a estabelecer um alto potencial citotóxico que conseqüentemente pode engatilhar uma resposta imune (SPINA *et al.*, 2014).

Sendo assim, seguindo as recomendações da ISO 10993/5 de avaliação de materiais médicos, o ensaio de citotoxicidade por contato direto foi realizado. A técnica visa analisar a morfologia e crescimento das células em contato ou nas proximidades do tecido (indicado pela flecha). De acordo com a FIGURA 5.9, a morfologia dos fibroblastos murinos cultivados com o tecido descelularizado mostrou-se normal após 72 horas de incubação, semelhante ao controle, com fibroblastos alongados em crescimento. Por outro lado, o tecido de PB nativo apresentou citotoxicidade leve, com a morfologia das células em contato com o pericárdio levemente alterada, ou seja, células com conformação arredondada, frouxamente aderidas e crescimento levemente inibido (FIGURA 5.9). Tal resultado já era esperado, visto que o tecido fresco havia sido coletado a mais de 96 horas e provavelmente teria entrado no processo de necrose, que é caracterizado principalmente pela morte celular com liberação de enzimas dos lisossomos, as quais podem afetar o crescimento de células ao seu redor. Por outro lado, como também esperado, o SDS (controle positivo) causou forte citotoxicidade celular, exibindo morte celular acentuada (FIGURA 5.9).

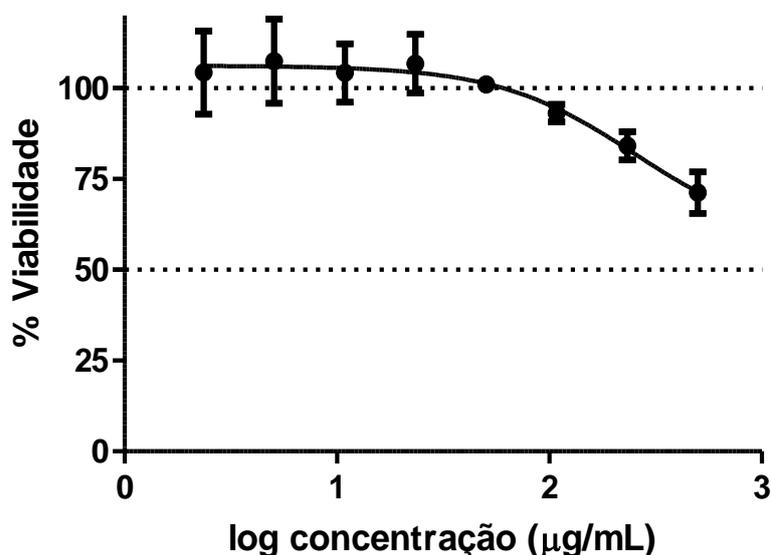


**Figura 5.9. Citotoxicidade do pericárdio bovino descclularizado no ensaio de contato direto.** Aparência morfológica de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 no ensaio de citotoxicidade por contato direto após 72 horas de cultivo com pericárdio bovino descclularizado e fresco. As margens do tecido fresco e descclularizado estão indicadas nas flechas. Magnificação de 10x.

O uso de SDS como agente descclularizante para tecidos biológicos enfatiza também outras questões potencialmente importantes. Um efeito citotóxico residual, atribuído ao forte potencial aniônico do detergente, foi demonstrado anteriormente em tecidos tratados com SDS, mesmo após 7 dias de lavagem (LIU *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2005). Altos níveis de resíduos do detergente estão relacionados a perda da resistência à tração e também ao aumento da proteólise das fibras de elastina, o que pode levar a uma subsequente degeneração estrutural (KAGAN *et al.*, 1972). Relatos anteriores dos efeitos da descclularização com SDS e o potencial de recelularização do tecido mostraram resultados mistos, com alguns achados positivos e outros descrevendo resultados negativos (CEBOTARI *et al.*, 2010; RIEDER *et al.*, 2004; GRATZER *et al.*, 2006). As possíveis razões para as diferenças no potencial de recelularização relatadas incluem: (1) diferentes tecidos e órgãos podem alterar a capacidade de remover SDS dos arcabouços resultantes, (2) diferentes métodos de lavagem são utilizados nas abordagens SDS-descclularização, (3) sensibilidade de diferentes tipos de células para toxicidade de SDS (LIU *et al.*, 2016).

Outro ensaio sugerido pela ISO 10993/5 é o ensaio de citotoxicidade por extrato. Sendo assim, a citotoxicidade do PB descelularizado foi avaliada pelo ensaio de captação do vermelho neutro. Conforme é mostrado na FIGURA 5.10, é possível observar efeito citotóxico baixo do extrato de PB na concentração mais alta (média de 71%), seguido por uma diminuição da citotoxicidade nas concentrações mais baixas. O IC<sub>50</sub> foi estimado em 1650 µg/mL.

Já foi relatado anteriormente que, apesar da realização de grande quantidade de lavagens, não é possível eliminar totalmente os rastros do surfactante do material biológico tratado (SPINA *et al.*, 2014), o que pode ser um dos pontos a explicar a morte de 29% das células na concentração mais alta do extrato de PB descelularizado. No entanto, a redução da viabilidade celular em até 30% é considerada como não citotóxica pela ISO 10993/5. Resultados referentes a citotoxicidade do tecido de pericárdio porcino com a descelularização baseada em SDS 0,1% foi reportada anteriormente, demonstrando efeito citotóxico nulo sobre fibroblastos de pele humana (TRAN *et al.*, 2016). Assim, o PB descelularizado neste trabalho pode ser considerado não citotóxico, visto que diminuiu a viabilidade das células 3T3 em 29% na sua concentração máxima. Sendo assim, consideramos que a segurança do tecido de PB descelularizado foi propriamente certificada para que os ensaios de biocompatibilidade pudessem ser iniciados.

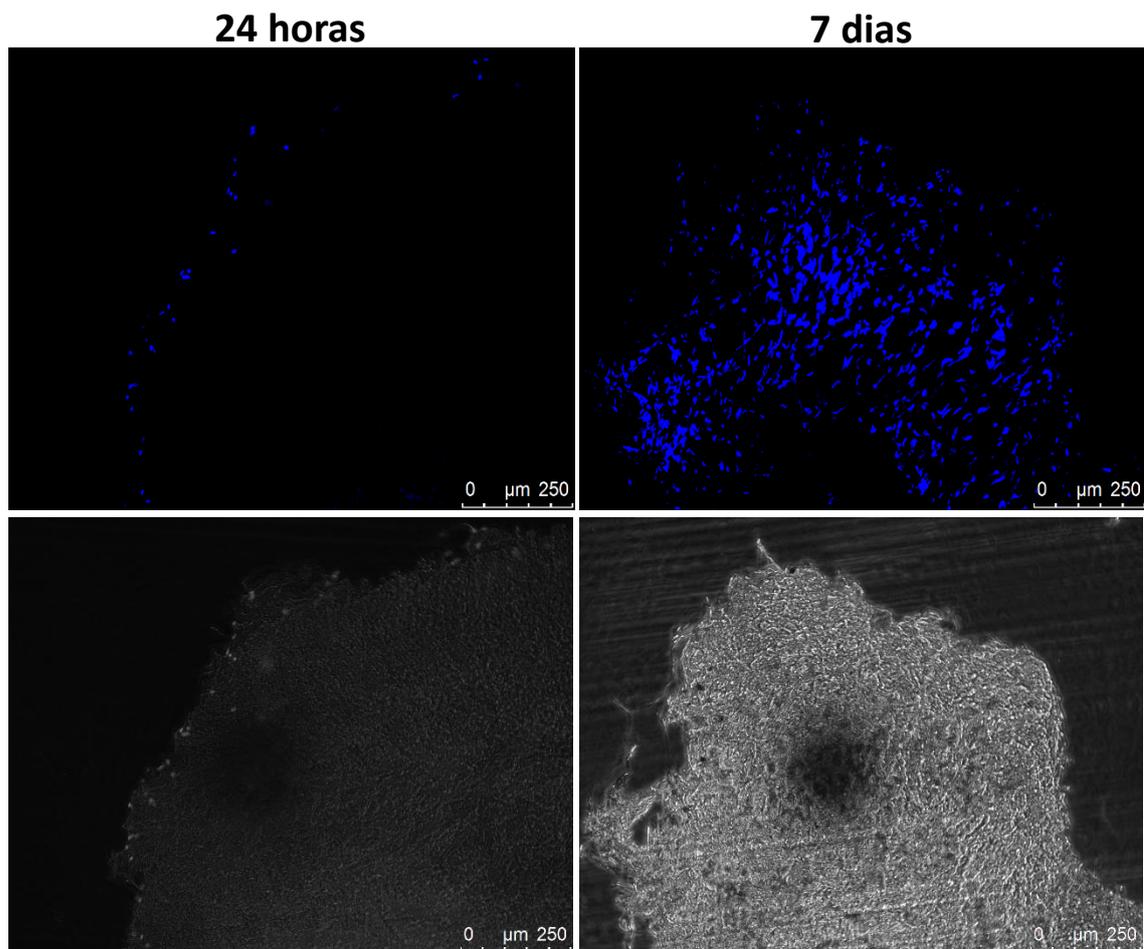


**Figura 5.10** Citotoxicidade do pericárdio bovino descelularizado no ensaio de captação do vermelho neutro. Células BALB/c 3T3 foram tratadas com diferentes concentrações de extrato de pericárdio bovino descelularizado por 48 horas. A citotoxicidade é demonstrada pela viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato.

## 5.5 BIOCOMPATIBILIDADE

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que visa desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido ou um órgão. Essa área utiliza matrizes como arcabouços para preencher o vazio do tecido, para fornecer suporte estrutural, e fatores de crescimento e/ou células que tenham a capacidade de formar tecidos dentro do corpo do paciente após o transplante. Embora uma grande variedade de materiais esteja disponível, existe um interesse crescente pela necessidade da MEC oriunda de um tecido estar presente, principalmente pelo fato de que ela possa fornecer ligações/sinais chave para as células durante a interação com o tecido do hospedeiro (LAKSHMANAN et al., 2012). Sendo assim, é importante testar a citocompatibilidade de um arcabouço tecidual. Portanto, o PB descelularizado foi testado através do seu cultivo com aCTMs humanas.

As células foram semeadas nos tecidos e cultivadas por 24 horas ou 7 dias. A marcação com DAPI mostra que, após 24 horas de contato das células com o tecido, as aCTMs estavam aderidas principalmente na sua superfície do arcabouço, com poucas células no seu interior (FIGURA 5.11). No entanto, com o cultivo prolongado por até 7 dias foi possível observar uma quantidade muito maior de células espalhadas por toda a extensão do pericárdio, não somente na sua periferia, sugerindo que as células penetraram no tecido (FIGURA 5.11). Uma vez que as células não aderentes foram removidas da cultura após 24 horas, para a troca de placas e de meio, é possível que essas células estejam proliferando sobre o tecido.



**Figura 5.11. Cultivo do pericárdio bovino descelularizado com aCTMs.** As imagens representativas de fluorescência com DAPI (fotos superiores) e campo claro (fotos inferiores) mostram os pericárdios após 24 horas ou 7 dias de cultivo. Houve aumento na quantidade de células no tecido com o cultivo prolongado. Magnificação de 100x.

Estudos mostram que o cultivo celular sobre o pericárdio pode ser considerado uma preocupação, visto que o tecido pode apresentar tamanho de poro e porosidade limitada para o crescimento celular (WEI *et al.*, 2005; HOLLISTER, 2005). Nossos resultados, no entanto, demonstram o contrário, pois o PB descelularizado com a solução de SDS 0,1% foi capaz de fornecer o suporte necessário para as células, mesmo após 7 dias de cultivo.

Atualmente, a engenharia de tecidos possui um novo desafio além da recelularização, o de vascularizar um arcabouço, seja ele sintético ou biológico. Um passo para isso é cultivando no tecido células endoteliais que sejam capazes de formar uma nova vasculatura capaz de nutrir e manter o desenvolvimento do novo enxerto (CHUNG & TIM, 2012). Mathapati e colaboradores (2014), mostraram em seu estudo que células-tronco mesenquimais foram capazes de se diferenciar *in vitro* em células-

tronco endoteliais após 14 dias de cultivo sobre o PB descelularizado. As células-tronco mesenquimais apresentam cada vez mais possibilidades de investigação para aplicações na medicina regenerativa, principalmente devido a suas propriedades imunomoduladoras e pró-regenerativas (LIU *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2016). Seus efeitos imunomoduladores são realizados através do contato direto célula-a-célula e também por mecanismos indiretos de secreção de citocinas, podendo assim conferir benefícios na limitação da resposta imune do receptor contra o arcabouço enxertado (AGGARWAL, S. & PITTENGER, 2005). Além disso, através da liberação de fatores parácrinos, as células-tronco exibem uma gama de potenciais efeitos pró regenerativos, incluindo a capacidade para induzir a angiogênese local (LAI *et al.*, 2011).

Outro ponto importante a ser considerado no uso das aCTMs é a possibilidade de utilização de células autólogas do paciente, sem que seja necessário um procedimento invasivo para sua remoção.

Além disso, com os resultados de biocompatibilidade observados, é necessário fazer um questionamento referente aos critérios estabelecidos por CRAPO e colaboradores (2011). Segundo os autores, um tecido ideal para ser usado na área de biomateriais é aquele com uma quantidade baixa de DNA. No seu estudo não são considerados outros possíveis ativadores da reação imune como o antígeno alfa-gal, citotoxicidade e também a sua interação com células que devam ser analisados para a verificação de um tecido descelularizado. Assim, no presente estudo nós mostramos que apesar do PB descelularizado possuir DNA remanescente em quantidade maior do que o indicado por Crapo e colaboradores, o tecido foi capaz de preservar a MEC e a distribuição de suas proteínas, está livre do antígeno xenogênico alfa-gal, não foi citotóxico e, por fim, foi capaz de sustentar a interação de aCTMs e sua possível migração/proliferação no seu interior. Esses aspectos possivelmente seriam alterados se a solução de descelularização utilizada possuísse uma concentração maior de SDS ou fossem usadas enzimas de degradação, capazes de reduzir ainda mais os níveis de DNA, como já reportado anteriormente (LIU *et al.*, 2016). Assim, permanece a questão se existe um limiar de debris celulares nos tecidos descelularizados que irá provocar o remodelamento da resposta imune e que o mesmo deva ser ajustado para cada tipo tecidual, de acordo com as suas aplicações.

## 6 CONCLUSÕES

Materiais inovadores são necessários para se obter resultados superiores em terapia celular e engenharia de tecidos. Assim, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação da integridade da MEC de PB submetido ao processo de descelularização com fim de aplicação para biopróteses valvares. Além disso, através do cultivo do PB com células-tronco mesenquimais humanas buscamos avaliar a possibilidade de se utilizar a união de aCTMs e arcabouços de PB em novas terapias como forma de integrar o tecido ao seu hospedeiro.

A quantificação de DNA revelou que o processo de descelularização promoveu redução média de 77% da quantidade de DNA das amostras, houve ausência de núcleos nas colorações de H&E e DAPI, apesar da presença de bandas no gel de agarose. Além disso, foram identificadas várias proteínas da MEC, como colágenos I, III, IV, decorina e elastina, sugerindo a preservação da MEC após o protocolo de remoção celular. Uma vez caracterizados os padrões de distribuição de proteínas da MEC buscou-se avaliar o principal antígeno xenogênico de enxertos biológicos, o alfa-gal. Tal epítipo foi removido das amostras após a descelularização. A citotoxicidade foi avaliada segundo as definições da ISO 10993/5 de avaliação de materiais médicos. Os PBs descelularizados apresentaram-se não-citotóxicos *in vitro*, ao contrário do tecido fresco, com padrões de citotoxicidade leve.

Dessa maneira ,conclui-se que a avaliação do potencial imunogênico e inflamatório de um bioimplante deve utilizar outros parâmetros metodológicos além do DNA devem ser incluídos, como, por exemplo, a distribuição de antígenos celulares e testes de citotoxicidade. Neste trabalho escolhemos (i) avaliar a presença de núcleos residuais como marcador pró-calcificatório e inflamatório, (ii) quantificar o conteúdo de DNA para aprimoramento de qualidade do potencial inflamatório e (iii) detectar a presença do epítipo alfa-gal como representantes do potencial de rejeição hiperaguda do tecido (iv) verificar o potencial citotóxico (v) e de biocompatibilidade do tecido. A aplicação desta combinação de parâmetros revelou que o protocolo de descelularização promoveu a obtenção de um tecido biocompatível possível de ser aplicado como bioprótese.

Por fim, a descelularização branda do PB foi capaz de criar um tecido adequado para a recelularização com aCTMs, que não somente mantiveram-se aderidas ao tecido após 7 dias, mas também mostraram potencial de crescimento e expansão.

Em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o PB descelularizado com solução de SDS 0,1% pode ser considerado como um biomaterial promissor para a construção de substitutos valvares. O tecido mostrou-se com quantidade reduzida de células, MEC preservada, alfa-gal-free, não-citotóxico e biocompatível com células humanas. Apesar do estudo atual considerar apenas o uso do PB para o desenvolvimento de válvulas cardíacas, o arcabouço também tem potencial para utilização em outros procedimentos biomédicos. A tecnologia de descelularização com SDS 0,1% sem a adição de GA apresenta por exemplo, potencial para confecção de “patches” utilizados para restaurar lesões nos mais variados tecidos humanos. A partir dos resultados promissores que o trabalho mostrou, PB descelularizado e semeado com aCTMs merece investigações adicionais para que futuramente possa ser utilizado clinicamente.

Outras perspectivas que se abrem para esse estudo são:

- Realizar cultivos com aCTMs por períodos mais longos, como 15 e 30 dias, a fim de verificar a permanência dessas células no tecido e também a possibilidade de diferenciação para células endoteliais e fibroblastos;
- Analisar a possível formação de uma nova MEC no conjunto PB-aCTMs;
- Realizar estudos *in vivo*, nos quais o remodelamento imune e o potencial de calcificação possa ser analisado com a implantação do enxerto de PB descelularizado.

## 7 REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S. & PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815–1822, 2005.

AGUIARI, P.; IOP, L.; FAVARETTO, F.; FIDALGO, C. M. L.; NASO, F.; MILAN, G.; VINDIGNI, V.; SPINA, M.; BASSETTO, F.; BAGNO, A.; VETTOR, R.; GEROSA, G. In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves. **Biomedical Materials**, v. 12, p. 1–12, 2017.

ALREFAI, M.; MURALI, D.; PAUL, A. Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy. **Stem cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 8, p. 81–101, 2015.

ANDERSON, R. H. Clinical anatomy of the aortic root. **Heart**, v. 84, p. 670–673, 2000.

BADYLAK, S. F.; FREYTES, D. O.; GILBERT, T. W. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2009.

BOSMAN, F. T. AND STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **The Journal of Pathol**, v. 200, p. 423–428, 2003.

CARPENTIER, A. La valvuloplastie reconstructive. Une nouvelle technique de valvuloplastie mitrale. **Presse Medm** v. 77, p. 251–256, 1969.

CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; JAEKEL, T.; HILFIKER, A.; DORFMAN, S.; TERNES, W.; HAVERICH, A.; LICHTENBERG, A. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial Organs**, v. 34, n. 3, p. 206-10, 2010.

CHANG, Y.; CHEN, S. C.; WEI, H. J.; KOTTURATHU, M. G.; SOMA, R.; SEERAM, V.; RAMA, S. Tissue regeneration observed in a porous acellular bovine pericardium used to repair a myocardial defect in the right ventricle of a rat model. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 130, n. 3, p. 1–10, 2005.

CHUNG, J. C. Y.; TIM, D. S. Neovascularization in Tissue Engineering. **Cells**, v. 1, n. 4, p. 1246–1260, 2012.

COFFEY, S.; CAIRNS, B. J.; IUNG, B. The modern epidemiology of heart valve disease. **Heart**, v. 102, n. 1, p. 75–85, 2015.

COLE, W. G.; CHAN, D.; HICKEY, A. J.; WILCKEN, D.E. Collagen composition of normal and myxomatous human mitral heart valves. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 451-460, 1984.

COLLATUSSO, C.; RODERJAN, J. G.; VIEIRA, E. D.; MYAGUE, E. D.; NORONHA, N. I.; DE COSTA, L.; DA COSTA, F. D. A. Descelularização como método anticalcificante em próteses valvulares de pericárdio bovino sem suporte. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 26, n. 3, p. 419–426, 2011.

COLLATUSSO, C.; RODERJAN, J. G.; VIEIRA, E. D. Efeito da descelularização com SDS na prevenção da calcificação em pericárdio bovino fixado em glutaraldeído. Estudo em ratos. **Revista Brasileira Cardiovascular**, v. 27, n. 1, p. 88–96, 2012.

COSTA, F. D. A.; SANTOS, L. R.; COLLATUSSO, C.; MATSUDA, C. N.; LOPES, S. A. V.; CAUDORO, S.; RODERJAN, J.; INGHAM, E. Thirteen years' experience with the Ross operation. **Journal of Heart valve Diseases**, v. 18, n. 84, 2009.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization process. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 1–21, 2011.

D'ARCY, J. L.; PRENDERGAST, B. D.; CHAMBERS, J. B.; RAY, S. G.; BRIDGEWATER, B. Valvular heart disease: the next cardiac epidemic. **Heart**, v. 97, n. 2, p. 91–93, 2011.

DAHM, M.; LYMAN, W. D.; SCHWELL, A. B.; FACTOR, S. M.; FRATER, R. W.; Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 99, p. 1082–1090, 1990.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine, **Journal of cell science**, v. 121, p. 255–264, 2008.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195–4200, 2010.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J. C. Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, v.32, n.28, p. 6692-6709, 2011.

GALILI, U. The  $\alpha$ -gal epitope (Gal $\alpha$ 1–3Gal $\beta$ 1–4GlcNAc-R) in xenotransplantation. **Biochemistry**, v. 83, p. 557–563, 2001.

GALILI, U.; LATEMPLE, D. C.; RADIC, M. Z. A sensitive assay for measuring  $\alpha$ -Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. **Transplantation**, v. 65, n. 8, p. 1129–1132, 1998.

GALILI, U.; CLARK, M. R.; SHOHET, S. B.; BUEHLER, J.; MACHER, B. A.; Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal alpha 1–3Gal epitope in primates. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 84, n. 5, p. 1369–1373, 1987.

GALILI, U.; MACHER, B. A.; BUEHLER, J.; SHOHET, S. B. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1–3)-linked galactose residues. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, p. 573–582, 1985.

GAUVIN, R.; MARINOV, G.; MEHRI, Y. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. **Journal of biomaterials applications**, v. 28, n. 4, p. 552–65, 2013.

- GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–3683, 2006.
- GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L., et al. Heart disease and stroke statistics – 2013 update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, 2013.
- GONÇALVES, A. C.; GRIFFITHS, L. G.; ANTHONY, R. V; ORTON, E. C. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. **The Journal of heart valve disease**, v. 14, n. 2, p. 212–217, 2005.
- GRATZER, P. F.; HARRISON, R. D.; WOODS, T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue Engineering**, v. 10, p. 2975-83, 2006.
- GRIFFITHS, L. G.; CHOE, L.; LEE, K. H.; REARDON, K. F.; CHRISTOPHER, E. Protein extraction and 2-DE of water and lipid-soluble proteins from bovine pericardium, a low-cellularity tissue. **Electrophoresis**, v. 29, n. 22, p. 4508–4515, 2008.
- HEINO, J. The collagen family members as cell adhesion proteins. **Bioessays**, v. 29, p. 1001–1010, 2007.
- HERBST, T. J.; MCCARTHY, J. B.; TSILIBARY, E. C.; FURCHT, L. T. Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. **Journal of Cell Biology**, v. 106, p. 1365-1373, 1988.
- HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, p. 518 524, 2005.
- HOSHIBA, T.; LU, H.; KAWAZOE, N.; CHEN, G. Decellularized matrices for tissue engineering. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1717–1728, 2010.
- HOSSEINKHANI, M.; MEHRABANI, D.; KARIMFAR, M. H.; BAKHTIYARI, S.; MANAFI, A.; SHIRAZI, R. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 33, n. 11, p. 3–7, 2014.
- HUMAN, P.; ZILLA, P. Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, p. 385–388, 2001.
- HÜLSMANN, J.; GRÜN, K.; EL AMOURI, S.; BARTH, M.; HORNUNG, K.; HOLZFUSS, C.; LICHTENBERG, A.; AKHYARI, P. Transplantation material bovine pericardium: Biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. **Xenotransplantation**, v. 19, n. 5, p. 286–297, 2012.
- IAZZO, P. A. **Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices**. 2a. Ed. Totowa: Human Press Inc, 2005, p.1–659.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: ISO 10993-5.** Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009.

IONESCU, M. I.; TANDON, A. P.; MARY, D. A.; ABID, A. Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, n. 73, v. 1, p. 31-42, 1977.

IOP, L.; RENIER, V.; NASO, F.; PICCOLI, C. M.; BONETTI D. A.; GANDAGLIA, A. A.; POZZOBON, C. M.; PAOLIN, E. A.; ORTOLANI, D. O.; MARCHINI, D. M.; SPINA, B. M.; DE COPPI, C. F. P.; SARTORE, G.; GEROSA, G. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4104–4116, 2009.

IUNG, B.; BARON, G.; BUTCHART, E. G.; DELAHAYE, F.; GOHLKE-BÄRWOLF, C.; LEVANG, O. W.; TORNOS, P.; VANOVERSHELDE, J. L.; VERMEER, F.; BOERSMA, E.; RAVAUD, P.; VAHANIAN, A. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. **European Heart Journal**, v. 24, n. 13, p. 1231-1243, 2003.

KAGAN, H. M.; CROMBIE, G. D.; JORDAN, R. E.; LEWIS, W.; FRANZBLAU, C. Proteolysis of elastin-ligand complexes. Stimulation of elastase digestion of insoluble elastin by Sodium dodecyl Sulfate. **Biochemistry**, v. 11, n. 18, p. 3412–3418, 1972.

KEANE, T. J.; LONDONO, R.; TURNER, N. J.; BADYLAK, S. F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771–1781, 2012.

KEANE, T. J.; SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**, v. 84, p. 25–34, 2015.

KADEN, J. J.; DEMPFFLE, C. E.; GROBHOLZ, R.; FISCHER, C. S.; VOCKE, D. C.; KILIC, R.; SARIKOC, A.; PINOL, R.; HAGL, S.; LANG, S.; BRUECKMANN, M.; BORGGREFE, M. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. **Cardiovascular Pathology**, v.14, p. 80–87, 2005.

KIM, M. S.; LIM, H. G.; KIM, Y. J. Calcification of decellularized and alpha-galactosidase-treated bovine pericardial tissue in an alpha-Gal knock-out mouse implantation model: Comparison with primate pericardial tissue. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 49, n. 3, p. 894–900, 2016.

KONAKCI, K. Z.; BOHLE, B.; BLUMER, R. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, p. 17–23, 2005.

KULAR, J. K.; BASU, S.; SHARMA, R. I. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering**, v. 5, p. 204173141455711, 2014.

KUNZELMAN, K. S.; COCHRAN, R. P.; MURPHREE, S. S.; RING WS, VERRIER E. D.; EBERHART, R. C. Differential collagen distribution in the mitral valve and its influence on biomechanical behavior. **Journal of Heart Valve Disease**, v. 2, p. 236-244, 1993.

LAI, R. C.; CHEN, T. S.; LIM, S. K. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. **Regenerative Medicine**, v. 6, p. 481–492, 2011.

LAITINEN, L. Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissue. **The Histochemical Journal**, n. 19, p. 225–34, 1987.

LAKSHMANAN, R.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Living cardiac patch: The elixir for cardiac regeneration. **Expert Opinion on Biology Therapy**, v. 12, p. 1623–1640, 2012.

LAM, M. T.; WU, J. Regeneration, Biomaterial application in cardiovascular tissue repair. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 10, n. 8, p. 1039–1049, 2012.

LATIF, N.; SARATHCHANDRA, P.; TAYLOR, P. M.; ANTONIW, J.; YACOUB, M. H. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. **Journal of Heart Valve Disease**, v. 14, n. 2, p. 218–227, 2005.

LEE, C.; CHOI, S. H.; KIM, Y. J. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 39, n. 3, p. 381–387, 2011.

LEOPOLD, J. A. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. **Circulation. Cardiovascular Interventions**, v. 5, n. 4, p. 605–614, 2012.

LIU, J.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; GUO, Y.; YANG, S.; MA, M.; LI, LI, Z.; GAO, W. Q.; HE, Z. Generation, Characterization, and Potential Therapeutic Applications of Cardiomyocytes from Various Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 12, p. 2095–2110, 2012.

LIU, X. & HARADA, S. DNA Isolation from Mammalian Samples. In: **Current Protocols for in Molecular Biology, 2012**. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471142727/homepage/archive.htm>. Acesso em: 14 mar, 2016.

LIU, Z. Z.; WONG, M. L.; GRIFFITHS, L. G. Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function. **Nature Scientific Reports**, v. 6, p. 1–12, 2016.

LOPES, S. A. V.; COSTA, F. D. A.; DE PAULA, J. B.; HOMEN, P. P.; FELIPE, V.; RODERJAN, J. G.; VIEIRA, E. D. Análise do comportamento biológico de heteroenxertos descelularizados e homoenxertos criopreservados: estudo em ovinos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 1, p. 15–22, 2009.

LOVEKAMP, J. J.; SIMIONESCU, D. T.; MERCURI, J. J.; ZUBIATE, B.; SACKS, M. S.; VYAVAHARE, N. R. Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1507–1518, 2006.

LOVEKAMP, J.; VYAVAHARE, N. Periodate-mediated glycosaminoglycan stabilization in bioprosthetic heart valves. **J Biomed Mater Res**, v. 56, n. 4, p. 478-486, 2001.

MANGOLD, A.; SZERAFIN, T.; HOETZENECKER, K. Alpha- Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 57, p. 191–195, 2009.

MATHAPATI, S.; BISHI, D. K.; VENUGOPAL, J. R. Nanofibers coated on acellular tissue-engineered bovine pericardium supports differentiation of mesenchymal stem cells into endothelial cells for tissue engineering. **Nanomedicine**, v. 9, n. 5, p. 623–34, 2014.

MCPHERSON, T. B.; LIANG, H.; RECORD, R. D.; BADYLAK, S. F. Gal- alpha(1,3)Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. **Tissue Engineering**, v. 6, p. 233–239, 2000.

MOUW, J. K.; OU, G.; WEAVER, M. V. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 771-785, 2014.

MURTRA, M. The adventure of cardiac surgery. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 21, n.2, p. 167-180, 2002.

NAGATA, S.; HANAYAMA, R.; KAWANE, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell**, v. 140, n.5, p. 619-630, 2010.

NASO, F.; GANDAGLIA, A.; BOTTIO, T.; TARZIA, V.; NOTTLE, M. B.; D'APICE, A. J. F.; COWAN, P. J.; COZZI, E.; GALLI, C.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G.; IOP, L.; SPINA, M.; GEROSA, G. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. **Xenotransplantation**, v. 20, n. 4, p. 252–261, 2013.

NEWELL, James. **Fundamentos da moderna engenharia e ciência dos materiais**. Rio de Janeiro: LTC, 2010. Cap.9, p.234-253.

**NIH – National Heart, Lung and Blood Institute**. U.S Department of Health and Human Services. What is heart valve disease?, 2015. Disponível em: <<https://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/hvd>>. Acesso em: 20 jul, 2017.

NKOMO, V. T.; GARDIN, J. M.; SKELTON, T. N.; GOTTDIENER, J. S.; SCOTT, C. G.; ENRIQUEZ-SARANO, M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. **Lancet**, v. 368, n. 9540, p. 1005–1011, 2006.

NORTON, L. W.; BABENSEE, J. E. Innate and Adaptive Immune Responses in Tissue Engineering. **Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Berlin: Springer, 2009, p. 721-47.

**OECD**. Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129. OECD Environment, Health and Safety Publications, Paris, 2010.

PARK, B. S.; JANG, K. A.; SUNG, J. H.; PARK, J. S.; KWON, Y. H.; KIM, K. J.; KIM, W. S. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. **Dermatology Surgery**, v. 34, p. 1323–1326, 2008.

PIRES, A. C.; SAPORITO, W. F.; CARDOSO, S. H.; RAMACIOTTI, O. Bovine pericardium used as a cardiovascular patch. **Heart Surgery**, v. 2, p. 60–69, 1999.

PIBAROT, P.; DUMESNIL, J. G. Prosthetic heart valves: Selection of the optimal prosthesis and long-term management. **Circulation**, v. 119, n. 7, p. 1034–1048, 2009.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETAO, M. P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901–913, 2008.

RIEBEN, R.; BOVIN, N. V.; KORCHAGINA, E. Y.; ORIOL, R.; NIFANT'EV, N. E.; TSVETKOV, D. E.; DAHA, M. R.; MOHACSI, P. J.; JOZIASSE, D. H. Xenotransplantation: in vitro analysis of synthetic alpha-galactosyl inhibitors of human anti-Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal IgM and IgG antibodies. **Glycobiology**, v. 10, p. 141–148, 2000.

RIEDER, E.; KASIMIR, M. T.; SILBERHUMER, G.; SEEBACHER, G.; WOLNER, E.; SIMON, P.; WEIGEL, G. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 127, n. 2, p. 399–405, 2004.

RIEDER, E.; SEEBACHER, G.; KASIMIR, M. T.; EICHMAIR, E.; WINTER, B.; DEKAN, B. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. **Circulation**, v. 111, n. 21, p. 2792–2797, 2005.

ROZARIO, T. AND DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Development Biology**, v. 341, p. 126–140, 2010.

SUNDELACRUZ, S.; KAPLAN, D. L. D. L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approached to osteochondral regenerative medicine. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 6, p. 646–655, 2009.

SAPIRSTEIN, J. S.; SMITH, P. K. The "ideal" replacement heart valve. **American Heart Journal**, v. 141, n. 5, p. 856–860, 2001.

SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J.; HILBERT, S. L.; BIANCO, R.W. Antimineralization treatments for bioprosthetic heart valves. Assessment of efficacy and safety. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 104, n. 5, p. 1285–1288, 1992.

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

SCHOEN, F. J., LEVY, R. J. Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. **The Annal of Thoracic Surgery**, v. 79, n. 3, p. 1072-1080, 2005.

SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, n.4, p. 439-465, 1999.

SIDDIQUI, R. F; ABRAHAM, J. R.; BUTANY, J. Bioprosthetic heart valves: modes of failure. **Histopathology**, v. 55, p. 135–144, 2009

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 5a Ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2010, p. 467-511.

SLIWA, K.; CARRINGTON, M.; MAYOSI, B. M.; ZIGIRIADIS, E.; MVUNGI R.; STEWART, S. Incidence and characteristics of newly diagnosed rheumatic heart disease in urban African adults: insights from the heart of Soweto study. **European Heart Journal**, v. 31, n. 6, p. 719-727, 2010.

SPINA, M.; NASO, F.; ZANCAN, I.; IOP, L.; DETTIN, M.; GEROSA, G. Biocompatibility Issues of Next Generation Decellularized Bioprosthetic Devices. **Conference Papers in Science**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

STEIN, P. D.; WANG, C. H.; RIDDLE, J. M.; MAGILLIGAN, D. J. Leukocytes, platelets, and surface microstructure of spontaneously degenerated porcine bioprosthetic valves. **Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 3, p. 253–261, 1988.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

TIBAZARWA, K. B.; VOLMINK, J. A.; MAYOSI, B. M. Incidence of acute rheumatic fever in the world: a systematic review of population-based studies. **Heart**, v. 94, p. 1534-1540, 2008.

TOBITA, M.; ORBAY, H.; MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells. Current findings and future perspectives. **Discovery Medicine**, v. 11, p. 160–170, 2011.

TRAN, H. L. B.; DINH, T. T. H.; NGUYEN, M. T. N.; TO, Q. M.; PHAM, A. T. T. Preparation and characterization of acellular porcine pericardium for cardiovascular surgery. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, p. 1243–1250, 2016.

VAFAEE, T.; THOMAS, D.; DESAI, A.; JENNINGS, M. L.; BERRY, H.; ROONEY. P.; KEARNE, J.; FISHE, J.; INGHAM, E. Decellularisation of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration SDS. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 44, n. 0, 2016.

VENGRENYUK, Y.; CARLIER, S.; XANTHOS, S.; CARDOSO, L.; GANATOS, P.; VIRMANI, R.; EINAV, S.; GILCHRIST, L.; WEINBAUM, S. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 103, p. 14678-14683, 2006.

VYAVAHARE, N. R.; HIRSCH, D.; LERNER, E.; BASKIN, J. Z.; ZAND R.; SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 40, n. 4, p. 577-585, 1998.

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. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 73, n. 1, p. 61–67, 2005.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211–228, 2001.

WEI, H. J.; LIANG, H. C.; LEE, M. H.; HUANG, Y. C.; CHANG, Y.; SUNG, H. W. Construction of varying porous structures in acellular bovine pericardia as a tissue-engineering extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 26, p. 1905–1913, 2005.

WESTABAY, S.; KARP, R. P.; BLACKSTONE, E.; BISHOP, S. P. Adult Human Valve Dimensions and Their Surgical Significance. **The American Journal of Cardiology**, v. 53, p. 552-556, 1984.

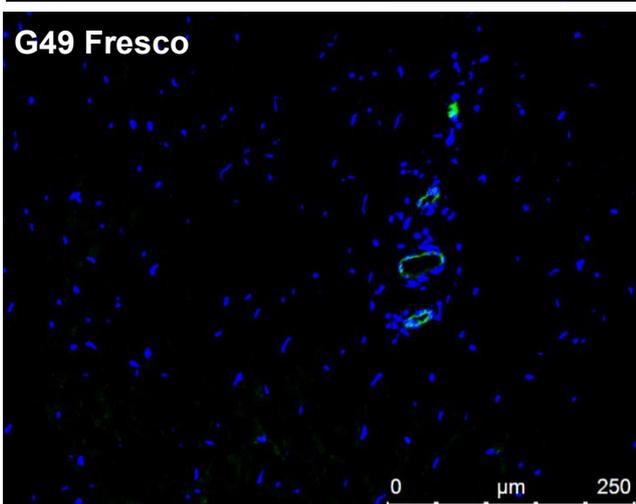
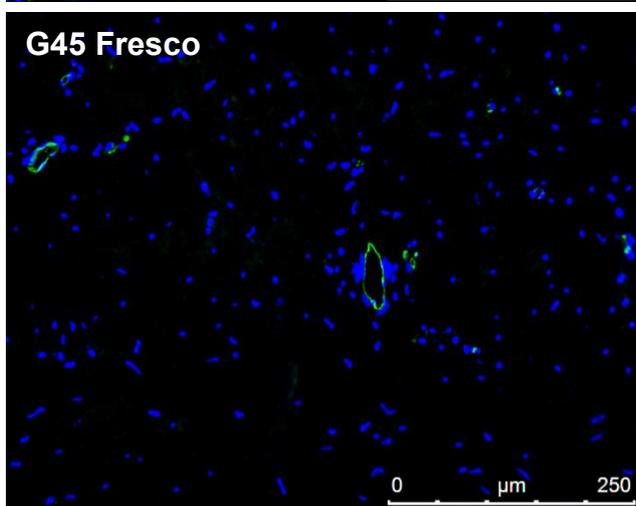
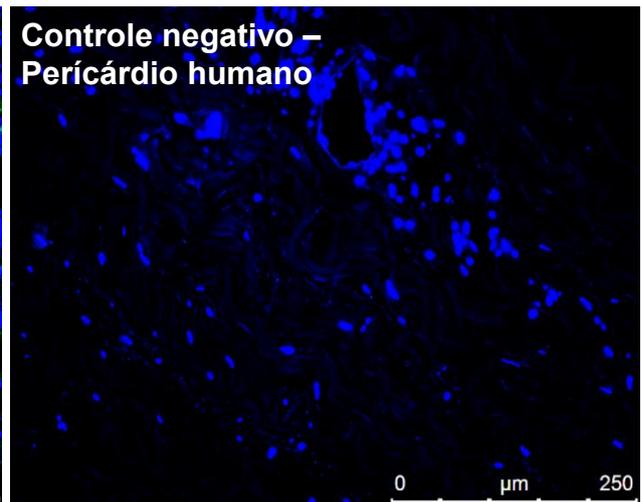
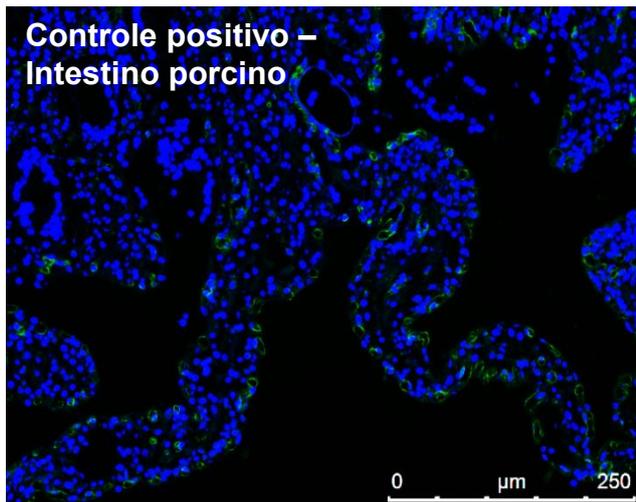
**WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Cardiovascular diseases (CDVs), 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acesso em: 03 out, 2016.

WILHELMI, M. H.; MERTSCHING, H.; WILHELMI, M.; LEYH, R.; HAVERICH, A. Role of inflammation in allogeneic and xenogeneic heart valve degeneration: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. **Journal of Heart Valve Diseases**, v. 12, p. 520–526, 2003.

WU, Q.; DAI, M.; XU, P.; HOU, M.; TENG, Y.; FENG, J. In vivo effects of human adipose-derived stem cells reseeding on acellular bovine pericardium in nude mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 1, p. 31–39, 2016.

YANG, Y. G.; AND SYKES, M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 7, p. 519–531, 2007.

**APÊNDICE A - Detecção do antígeno alfa-gal utilizando lectina BSI-B4**



APENDICE B - Detecção do antígeno alfa-gal utilizando anticorpo M86

