



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

RUI CARLOS GIORGI FILHO

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA DE COLÁGENO PARA ENXERTIA
TECIDUAL: NOVO TRATAMENTO DE DESCELULARIZAÇÃO
DO PERICÁRDIO BOVINO**

São José do Rio Preto
2024

RUI CARLOS GIORGI FILHO

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA DE COLÁGENO PARA ENXERTIA
TECIDUAL: NOVO TRATAMENTO DE DESCELULARIZAÇÃO
DO PERICÁRDIO BOVINO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 159566/2019-3

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2024

G498m Giorgi Filho, Rui Carlos
Método de obtenção de membrana de colágeno para enxertia
tecidual: Novo tratamento de descelularização do pericárdio bovino /
Rui Carlos Giorgi Filho. -- São José do Rio Preto, 2024
109 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientador: José Geraldo Nery

1. Materiais biomédicos. 2. Colágeno Tipo I. 3. Xenoenxertos. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

RUI CARLOS GIORGI FILHO

**MÉTODO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA DE COLÁGENO PARA
ENXERTIA TECIDUAL: NOVO TRATAMENTO DE
DESCELULARIZAÇÃO DO PERICÁRDIO BOVINO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 159566/2019-3

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ieda Pastre Fertoni
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
PUC-PR – Câmpus de Curitiba

Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares
UFRGS – Câmpus de Porto Alegre

São José do Rio Preto
15 de Abril de 2024

Dedico este trabalho a meus pais,
Rui Carlos Giorgi e Maria Ignez Manelli Giorgi.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a pessoas e organizações cujo apoio e orientação foram fundamentais para a conclusão desta tese de doutoramento.

Em primeiro lugar, sou imensamente grato ao meu estimado orientador, Professor Doutor José Geraldo Nery, por seu apoio e orientação acadêmica ao longo desta jornada. Sua experiência, incentivo e dedicação foram fundamentais para moldar meus esforços de pesquisa.

Agradeço aos membros titulares da banca, que aceitaram participar desta avaliação e contribuíram com seu tempo de leitura e arguições, objetivando o sucesso deste trabalho: Dra. Ieda Pastre Fertoni, Dr. João Ruggiero Neto, Dr. Felipe Tuon e Dra. Rosane Duarte. Agradeço aos membros suplentes, pela disponibilidade: Dr. Sidney Jurado, Dra. Bianca Maniglia e Dr. Marcio Akira.

Estendo meus sinceros agradecimentos ao professor Doutor Sidney Jurado de Carvalho, coordenador do programa de doutorado em Biofísica Molecular, por seus incentivos ao longo de minha trajetória acadêmica.

Agradecimento especial à professora Doutora Marília Calmon, professora Pesquisadora do Laboratório de Estudos Genômicos LEGO-IBILCE, cuja expertise e colaboração científica, técnica e na parte estatística enriqueceram minha experiência de pesquisa, contribuindo significativamente para o avanço do meu trabalho.

Agradeço ao professor Doutor Marcio Tiera, professor Titular do Depto. de Química e Ciências Ambientais (IBILCE), pela parceria na pesquisa, que contribuiu significativamente para o alcance e a profundidade de minhas investigações.

Estendo meu sincero agradecimento à Professora Doutora Ieda Pastre Fertoni, professora Associada do Departamento de Química e Ciências Ambientais (IBILCE), por suas críticas construtivas e orientação enfática durante a fase de qualificação deste projeto.

Sou profundamente grato aos meus colegas do laboratório LACET-IBILCE, Dr. Alex Silva e Dr. Adriano Vasconcelos, pelas valiosas trocas de conhecimentos e pelo espírito colaborativo, que enriqueceram vários aspectos do processo investigativo desde o início de minha experiência como doutorando. Adicionalmente, gostaria de agradecer a mestres e doutores do Laboratório de Tecnologia em Energia Limpa

LACET-IBILCE, que são, acima de tudo, amigos: Vinicius Litrenta, Oscar Niño, Guilherme Guarnieri, Erick Paiva e Guilherme Sacco pela colaboração dentro e fora do laboratório, que contribuíram significativamente para o sucesso deste trabalho. Aos colegas do laboratório LEGO-IBILCE que colaboraram em etapas críticas deste trabalho: Vivaldo Gomes, Dayla Geraldini, Pâmela Previdelli e Yasmin Neves. Agradecimentos especiais aos colegas André Martins, do Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais que cooperou com análises de citotoxicidade do material desenvolvido e Thalles Rocha, do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises, que cooperou com análises de microscopia óptica e me orientou ao correto manuseio de equipamento e softwares.

Agradeço à agência de fomento CNPQ (proc. 159566/2019-3) pela concessão de bolsa de doutorado e pela crença no valor da minha pesquisa, sem a qual este projeto não teria sido possível. Agradeço também à empresa Products and Features Brasil P&D, gerida pelo Sr. Guilherme Agreli, Físico-Médico e CEO da empresa, pela assistência no financiamento desta pesquisa e pelo provimento de pessoal capacitado, material e espaço propícios para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também à Dra. Dayane dos Santos Alvares, que nutriu a interação entre empresa e universidade, além de colaborar com a publicação do artigo científico.

Estendo meus agradecimentos aos laboratórios parceiros: Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE, da Universidade Federal de São Carlos, pelas caracterizações de Microscopia Eletrônica de Varredura. Ao Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises, liderado pelo Professor Doutor Sebastião Taboga, que forneceu equipamentos e pessoal para colaboração em análises histológicas. Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica, coordenado pelo Professor Doutor Marcelo Orlandi, que ofereceu equipamentos para análises microscópicas. Ao Laboratório PatAnimal, liderado pela Doutora Daniela Nóbrega, que realizou o preparo das lâminas histológicas em época de isolamento social, contribuindo imensamente para o andamento da pesquisa no período da pandemia de COVID-19.

Sou profundamente grato à Nathalia De Luca, minha namorada, por seu apoio inabalável, incentivo e compreensão ao longo desta exigente jornada. A sua companhia proporcionou-me a força emocional e a estabilidade necessárias para superar desafios e perseverar.

Estendo meu agradecimento aos meus irmãos, Sabrina, Mariana e André Giorgi, pelo apoio e compreensão sobre minhas decisões profissionais e pessoais.

A todos os professores do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), com os quais tive a oportunidade de me relacionar nestes últimos cinco anos, por meio das disciplinas, dos estágios e de conversas, em que pude entender melhor o funcionamento e as colaborações que fazem deste Campus da Unesp ser provido de tamanha excelência em pesquisa e capacitação profissional.

Cada um de vocês desempenhou um papel significativo neste empreendimento acadêmico e, por isso, sou verdadeiramente grato.

RESUMO

A obtenção de colágeno a partir de fontes animais tem demonstrado ser um processo economicamente viável e lucrativo. O pericárdio bovino é uma biomassa abundante e com aplicabilidade na Engenharia de Tecidos, e a descelularização é uma condição fundamental para que este material seja biocompatível e se ajuste a aplicações médicas. Este estudo teve como objetivo otimizar a descelularização do PB, integrando parâmetros físicos e químicos e avaliando seus efeitos na eliminação do DNA nativo, na preservação da matriz extracelular e na biocompatibilidade. Neste trabalho, exploramos a combinação do congelamento-descongelamento do PB seguido de tratamento em solução de Desoxicolato de Sódio para desenvolver um protocolo de descelularização e produção de membranas tipo *scaffolds* para aplicação em regeneração tecidual guiada. O uso de Desoxicolato de Sódio no processo de descelularização, para remoção de componentes celulares do pericárdio bovino, trouxe vantagens em relação a outros métodos de descelularização de membranas biológicas já publicados ou patenteados. Neste trabalho, fornecemos informações úteis sobre o impacto de concentrações mais baixas de Desoxicolato de Sódio na eficiência da eliminação de DNA nativo e em relação à preservação da matriz extracelular. Avaliamos o comportamento biomecânico dos tecidos preparados em comparação com sua forma nativa e, enfim, se houve resposta citotóxica das membranas *in vitro*. A microscopia da superfície revelou a preservação dos feixes de fibras e sua natureza anisotrópica, enquanto as lâminas histológicas evidenciaram ausência de núcleos visíveis com aparente retenção de glicoproteínas. O protocolo SD010, compreendendo congelamento-descongelamento, agitação em solução de Desoxicolato de Sódio de baixa concentração (0,10% m/v) e limpeza salina completa, destacou-se como um método promissor para descelularização do PB. A análise histológica revelou eliminação bem-sucedida de componentes celulares, com SD010 exibindo descelularização completa. A quantificação do DNA nas amostras tratadas com o protocolo SD010 indicou uma redução significativa do conteúdo de DNA (cerca de 85,7%). A eletroforese reforçou esta análise, permitindo identificar que as moléculas de DNA em todas as amostras mantiveram seu comprimento nativo. A microscopia eletrônica de varredura confirmou a preservação da arquitetura da matriz extracelular após o tratamento. Os testes biomecânicos demonstraram mínimo impacto nas propriedades mecânicas dos tecidos tratados. O potencial do protocolo SD010 para aplicações do pericárdio bovino descelularizado como enxerto heterólogo foi apoiado por testes de biocompatibilidade, conforme evidenciado pela proliferação de fibroblastos *in vitro*. Os resultados indicaram um método eficiente para a descelularização do pericárdio bovino, destacando sua utilidade para o reaproveitamento de resíduos de biomassa produzidos pela indústria alimentícia e de saúde.

Palavras-chave: Descelularização; Matriz extracelular; Pericárdio Bovino, Engenharia de Tecidos; Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Obtaining collagen from animal sources has proven economically viable and profitable. Bovine pericardium is an abundant biomass with applicability in tissue engineering, and decellularization is a fundamental condition for this material to be biocompatible and suitable for medical applications. This study aimed to optimize PB decellularization, integrate physical and chemical parameters, and evaluate their effects on the elimination of native DNA, preservation of the extracellular matrix, and biocompatibility. In this work, we explored the combination of freezing-thawing of PB followed by treatment in Sodium Deoxycholate solution to develop a decellularization protocol and production of scaffold-like membranes for application in guided tissue regeneration. The use of Sodium Deoxycholate in the decellularization process to remove cellular components from the bovine pericardium brought advantages compared to other decellularization methods of biological membranes already published or patented. In this work, we provide helpful information on the impact of lower concentrations of Sodium Deoxycholate on the efficiency of native DNA elimination compared to the preservation of the extracellular matrix. We evaluated the biomechanical behavior of the prepared tissues compared with their native form and whether there was a cytotoxic response from the membranes *in vitro*. Surface microscopy revealed the preservation of fiber bundles and their anisotropic nature, while histological slides showed the absence of visible nuclei with apparent retention of glycoproteins. The SD010 protocol, comprising freezing-thawing, agitation in a low-concentration Sodium Deoxycholate solution (0.10% w/v), and complete saline cleaning, was a promising method for PB decellularization. Histological analysis revealed the successful elimination of cellular components, with SD010 exhibiting complete decellularization. DNA quantification in samples treated with the SD010 protocol indicated a significant reduction in DNA content (about 85.7%). Electrophoresis reinforced this analysis, allowing us to identify that the DNA molecules in all samples maintained their native length. Scanning electron microscopy confirmed the preservation of the extracellular matrix architecture after treatment. Biomechanical tests demonstrated minimal impact on the mechanical properties of the treated tissues. The potential of the SD010 protocol for applications of decellularized bovine pericardium as a heterologous graft was supported by biocompatibility testing, as evidenced by *in vitro* fibroblast proliferation. The results indicated an efficient method for the decellularization of bovine pericardium, highlighting its usefulness for the reuse of biomass waste produced by the food and health industries.

Keywords: Decellularization; Extracellular Matrix; Bovine Pericardium, Tissue Engineering; Biocompatibility

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Fotografias representativas do pericárdio bovino (PB). PB nativo sobre placa de vidro para corte (à esquerda) e recorte de PB nativo em formato retangular (à direita); paquímetro para referência..... 24
- Figura 2 – Diferentes configurações de *scaffolds* da Matriz Extracelular (MEC) de: A) rim; B) bexiga urinária; C) derme 26
- Figura 3 – Membrana em bicamada Bio-Gide® (Geistlich, Suíça) para ortodontia. Enxerto heterólogo produzido com colágeno suíno, para regeneração gengival 31
- Figura 4 – Esquema da formação da tripla hélice. Cadeias-alfa e configuração molecular (à esquerda) e tripla hélice que forma desde o procolágeno, ao tropocolágeno e colágeno (à direita)..... 34
- Figura 5 – Fibras de colágeno observadas por: Microscopia Óptica da pele humana (a); Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele humana (b), as setas apontam fibrilas independentes ao redor do aglomerado; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do tendão de rato (c); e MEV da aorta de rato (d), as setas apontam estruturas filamentosas que conectam as fibras de colágeno periodicamente Barra: 100 μm .. 35
- Figura 6 – Ilustração das unidades monoméricas de diferentes glicosaminoglicanos. “R” indica pontos de sulfatação (substituição por SO_3)..... 38
- Figura 7 – Estrutura química do desoxicolato de sódio 43
- Figura 8 - Fluxograma da Fase 1 do projeto de descelularização do PB 53
- Figura 9 – Ensaio de tração x deformação. Imagens representativas do ensaio biomecânico de tração x deformação em amostra de PB. (a) As extremidades da amostra foram presas nas garras do equipamento; (b) configuração ao início do teste com indicação da espessura 1,5 cm; (c) fim do teste 57
- Figura 10 – Gráfico gerado no Microsoft Excel a partir dos dados de Força e Deformação aplicados à uma membrana elástica de pericárdio bovino e fornecidos pelo extensômetro do equipamento. O gráfico ilustra as fases do estiramento de um corpo de prova: fase elástica, transição, fase de deformação e ruptura..... 58

Figura 11 – Fluxograma da Fase 2 do projeto de descelularização do PB.....	60
Figura 12 – Obtenção de amostras de Pericárdio Bovino. Imagens representativas do procedimento de recortes de amostras de pericárdio bovino nativo. As amostras foram recortadas com bisturi previamente aos tratamentos de descelularização.....	63
Figura 13 – Interação dos tratamentos físico e químico. Fotografia representativa da montagem experimental da etapa de agitação orbital do material com a solução de descelularização, utilizada em condição semelhante para a etapa de enxágues com solução fisiológica	63
Figura 14 – Fotografias de teste de <i>shrinkage</i> : (A) montagem experimental; (B) amostra de pericárdio bovino no início do teste; (C) imagem aproximada de amostra de pericárdio bovino após o ponto de transição (Td)	67
Figura 15 – Histologia com coloração H&E (Protocolo 1). Lâminas histológicas do material PB após protocolos de descelularização com pré-tratamento em banho ultrassônico seguido de tratamento de agitação por 24 horas em solução de: (RG_1) SD 0,1% em PBS; (RG_2) SD 0,1% em Água; (RG_3) NaOH 0,1M por 12h e H ₂ O ₂ 5% por 12h; (RG_4) SDS 0,1% + EDTA 1,0%. Pós-tratamento de agitação em álcool 70% por 24h seguido de agitação em PBS por 96h para todas as amostras. Amostra RG_C consiste em PB nativo Barra: 50 µm	72
Figura 16 – Histologia com coloração H&E (Protocolo 2). Lâminas histológicas do material PB após protocolos de descelularização com pré-tratamento de congelamento por 72 horas seguido de tratamento de agitação em solução de: (RG_5) SD 1,0%; (RG_6) SD 0,1%; (RG_7) SDS 1,0%; (RG_8) SDS 0,1%. Pós-tratamento de agitação em PBS por 48h para todas as amostras. Amostra RG_CFT consiste em PB nativo após congelamento e descongelamento Barra: 50 µm	73
Figura 17 – Micrografias representativas das superfícies lisa e rugosa do Pericárdio Bovino em ampliações 2.000X e 50.000X (Protocolo 1).....	75
Figura 18 – Micrografias representativas das superfícies lisa e rugosa do Pericárdio Bovino em ampliações 2.000X e 50.000X (Protocolo 2).....	76
Figura 19 – Fotografias: (A) configuração da fase de descelularização dos tecidos após 24 horas de interação com as soluções de descelularização apresentadas na imagem; (B) imagem aproximada do reservatório dos grupos de descelularização WATER, SD010 e SD001. As setas destacam o aspecto das soluções	78

Figura 20 – Histopatologia do pericárdio bovino. Imagens representativas de fragmentos de amostras de pericárdio bovino sob coloração HE ampliadas em 400X. PB descelularizado com pré-tratamento de congelamento-descongelamento, seguido de agitação por 24 horas em água pura (WATER), SD 1,00% (SD100); SD 0,10% (SD010), SD 0,01% (SD001) e amostra de PB nativo (NATIVE). O protocolo SD010 indicou preservação do padrão fibroso de colágeno e ausência de núcleos celulares, observados em azul Barra: 100µm 79

Figura 21 – Exame histológico de glicosaminoglicanos sulfatados da MEC pela coloração AB de amostras de pericárdio bovino. Imagens representativas de fragmentos de amostras de pericárdio bovino ampliadas em 400X. a) NATIVE b) WATER c) SD100 d) SD010 e) SD001. O protocolo SD100 induziu maior redução dos GAG na MEC do pericárdio nativo em comparação aos outros tratamentos. Barra: 100µm 80

Figura 22 – DNA em amostras de PB descelularizadas em comparação à amostra de PB nativo. O grupo SD010 exibiu maior diferença significativa com redução de 85,7% (**** ou $p < 0,0001$) de DNA..... 82

Figura 23 – Imagem representativa da extensão (*Length*) em pares de base (BP) do DNA de pericárdio bovino por eletroforese em gel de agarose. (LAD = padrão para identificação do peso molecular)..... 83

Figura 24 – MEV do pericárdio bovino. Fotomicrografias representativas de superfície de amostras de pericárdio bovino com aumento de 1000X. A análise abrangeu os dois lados da superfície da amostra. As micrografias das amostras que passaram por tratamento revelam a preservação do padrão superficial do pericárdio nativo e características específicas de ambas as faces da MEC Barra 50µm 85

Figura 25 – MEV do pericárdio bovino. Fotomicrografias representativas do *scaffold* de ambas as superfícies de amostras de pericárdio bovino com aumento de 20.000X. As micrografias evidenciam fibrilas colágenas arranjadas em aglomerados e ausência de falhas ou rompimentos nas fibras das amostras que passaram por tratamento Barra: 1µm..... 85

Figura 26 – Teste de tração x deformação. Gráficos de resposta ao estresse de amostras de pericárdio bovino tracionadas uniaxialmente: controle (NATIVE) e descelularizadas pelos protocolos (WATER), (SD100), (SD010), (SD001). O aspecto das curvas e a Resistência à Tração (UTS) foram as duas principais indicações do alinhamento das fibras 87

Figura 27 – Teste de citotoxicidade por extrato MTS/PES. O gráfico mostra cinco proporções de diluição do extrato para as células cultivadas após 3 h de incubação, e a viabilidade celular (%) das amostras tratadas é expressa como percentagens de controle. A citotoxicidade foi relacionada à viabilidade celular nas diferentes concentrações do extrato. 89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Empresas brasileiras atuantes no mercado de biomateriais.....	28
Quadro 2 – Implantes e substitutos dérmicos disponíveis no mercado brasileiro de enxertos e respectivas indicações	31
Quadro 3 – Tipos e apresentações da molécula de Colágeno	33
Quadro 4 – Referência para amostras do Protocolo 1	54
Quadro 5 – Referência para amostras do Protocolo 2.....	55
Quadro 6 – Referência para amostras do Protocolo Único da Fase 2.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de Surfactantes e propriedades físicas.....	42
Tabela 2 – Módulo de Young e Tração de Ruptura. Valores apresentados como média \pm desv. pad.	77
Tabela 3 – Quantificação de núcleos celulares em amostras histológicas de PB nativo e descelularizadas.....	81
Tabela 4 – Densitometria Óptica relativa à concentração de DNA no gel usado para eletroforese	84
Tabela 5 – Resultados do ensaio biomecânico do PB na direção longitudinal (0°) ..	88
Tabela 6 – Resultados do ensaio biomecânico do PB na direção transversal (90°) .	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-5-(3-CARBOXIMETOXIFENIL)-2-(4-SULFOFENIL)-2H-TETRAZÓLIO – MTS

3-[(3-COLAMIDOPROPIL)DIMETILAMÔNIO]-1-PROPANO SULFONATO – CHAPS

4',6'-DIAMINO-2-FENIL-INDOL – DAPI

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO – DNA

ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO – EDTA

ÁCIDO PERACÉTICO – APA

ÁCIDO RIBONUCLEICO – RNA

AGÊNCIA UNESP DE INOVAÇÃO – AUIN

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS – ABTO

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE – HPLC

DESOXICOLATO DE SÓDIO – SD

DODECIL SULFATO DE SÓDIO – SDS

DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM – DMEM

ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA – EEB

ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA – ELISA

EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL – EPI

ETOSSULFATO DE FENAZINA – PES

FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS – FCB

FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITOS – FCH

FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS – FCDP

FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR – FCT

FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL – FCVE

FATOR ESTIMULADOR DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS-MACRÓFAGOS – FEC-GM

FATORES DE CRESCIMENTO INSULÍNICO – FCI

FLUORETO DE FENILMETILSULFONIDA – PMSF

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA

GALACTOSE-ALFA-1,3-GALACTOSE – α -GAL

GLICINA – GLY

GLICOSAMINOGLICANOS – GAG

GLOBAL OBSERVATORY ON DONATION AND TRANSPLANTATION – GODT

HEMATOXILINA E EOSINA – H&E
HIDROXILISINA – HYL
HIDROXIPROLINA – HYPRO
IMUNO-HISTOQUÍMICA – IHQ
LABORATORY FOR CLEAN ENERGY TECHNOLOGY – LACET
LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR – LCA
LISINA – LIS
MATRIZ EXTRACELULAR – MEC
MEDICAL DEVICE REGULATION – MDR
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS
PARES DE BASE – PB
PERICÁRDIO BOVINO – PB
PRODUCTS AND FEATURES BRASIL – PFBr
PROLINA – PRO
SISTEMA DE INSPEÇÃO FEDERAL – SIF
SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE – SUS
SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA – SBCT
SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO – PBS
TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO – TD
WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH – WOAH

LISTA DE SÍMBOLOS

m – Metro

kg – Quilograma

s – Segundo

A – Ampère

K – Kelvin

mol – Mol

Pa – Pascal

kDa - Quilodalton

J – Joule

W – Watt

V – Volt

°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	24
3.1 Biomateriais	24
3.2 Escassez de doadores	25
3.3 Engenharia de Tecidos	25
3.4 Enxertia	27
3.4.1 Enxertos Homólogos (autoenxertos).....	29
3.4.2 Enxertos Alogênicos.....	29
3.4.3 Enxertos Heterólogos (xenoenxertos).....	29
3.5 Matriz Extracelular (MEC)	32
3.5.1 Colágeno	32
3.5.2 Elastina.....	35
3.5.3 Fibronectina.....	36
3.5.4 Laminina.....	36
3.5.5 Fatores de crescimento.....	36
3.5.6 Glicosaminoglicanos	37
3.6 Descelularização	38
3.6.1 Tratamento Físico.....	39
3.6.2 Tratamento Químico.....	40
3.6.2.1 Reagentes ácidos e alcalinos.....	40
3.6.2.2 Surfactantes	41
3.6.3 Tratamento Enzimático.....	44
3.6.4 Outros reagentes e aplicações.....	45
3.6.5 Eliminação dos agentes de descelularização	45
3.7 Caracterização da matriz extracelular (MEC) descelularizada	46
3.7.1 Concentração de remanescentes nucleares.....	48
3.7.2 Identificação dos componentes da matriz extracelular	48
3.7.3 Caracterização biomecânica	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Compromisso ético e responsabilidade científica	50
4.2 Solução tampão fosfato salino (PBS)	50

4.3 Obtenção, manuseio e descarte do Pericárdio Bovino	51
4.4 Fase 1	53
4.4.1 Protocolos de descelularização.....	54
4.4.2 Caracterização da matriz extracelular (MEC)	56
4.4.2.1 <i>Histologia</i>	56
4.4.2.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	56
4.4.2.3 <i>Ensaio biomecânico</i>	57
4.5 Fase 2	60
4.5.1 Protocolo de descelularização	61
4.5.2 Caracterização da matriz extracelular (MEC)	64
4.5.2.1 <i>Histologia</i>	64
4.5.2.2 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	64
4.5.2.3 <i>Extração de DNA e Quantificação</i>	65
4.5.2.4 <i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	65
4.5.2.5 <i>Ensaio biomecânico</i>	65
4.5.2.6 <i>Transição térmica do Colágeno Tipo I</i>	66
4.5.2.7 <i>Teste de citotoxicidade in vitro</i>	67
4.5.2.8 <i>Análise Estatística</i>	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 Fase 1	71
5.2 Fase 2	78
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO	106

1 INTRODUÇÃO

Membranas pericárdicas tornaram-se uma opção relevante no campo da Medicina Regenerativa quando comparadas a biomateriais sintetizados, por possuírem uma maior habilidade em simular tecidos humanos nativos. Particularmente, da descélularização do pericárdio bovino (PB) se produz um xenoenxerto que tem mostrado um potencial em aplicações variadas, incluindo próteses de válvulas cardíacas, membranas absorvíveis ortodônticas e no reparo da hérnia abdominal (COBURN; PANDIT, 2007; GARDIN et al., 2015; GAUVIN et al., 2013; JAMES et al., 1991). O desenvolvimento de xenoenxertos visa a constantes melhoras à resposta imunológica e à degradação natural que um material biológico sofre após o transplante (HUSSEIN et al., 2016; SCHOEN; LEVY, 2005; SPECKE et al., 2002; WANG et al., 2007). A descélularização de tecidos é uma estratégia para a produção de enxertos que resulta em uma menor resposta imunológica e menor tendência à degradação precoce, pois o processo elimina ou reduz significativamente a quantidade de ácidos nucleicos do material nativo, enquanto retém componentes importantes como glicosaminoglicanos e fatores de crescimento, que contribuem para a recelularização (HAWKINS et al., 2000; SCARRITT; PASHOS; BUNNELL, 2015).

A Products and Features Brasil P&D (PFBr) fabrica dispositivos biomédicos para tratamento de patologias cardíacas, por meio da produção de válvulas transcateres, voltadas a pacientes que sofrem de cardiopatias, como refluxos (insuficiência valvar) ou obstruções (estenose), podendo se tornar disfunções mais graves. As biopróteses cardíacas são fabricadas de forma híbrida, ou seja, a combinação de uma estrutura expansível, de material e formato semelhantes ao stent cardíaco e folhetos valvares artificiais costurados nesta estrutura (PRODUCTS AND FEATURES, 2024). Os folhetos valvares artificiais possuem características mecânicas similares aos folhetos naturais do coração humano e são obtidos a partir de membranas de PB reticulado com glutaraldeído. A Empresa Products & Features GmbH possui patentes depositadas (EP3184082A1/ EP3205308A1/ EP3311774A1/ EP3154474A1) e depende diretamente da pesquisa em biomateriais desenvolvida em parceria com grupos nos campi da Unesp em Araraquara e São José do Rio Preto bem como testes hemodinâmicos *in vitro* realizados na Alemanha e testes *in vivo* na Áustria.

A biomassa que constitui a matéria-prima das biopróteses valvares é adquirida de abatedouros certificados e passa por um rigoroso controle de qualidade na empresa. O descarte desta biomassa ocorre em todos os lotes e está relacionado a fatores como espessura, vascularização excessiva e/ou descamação natural, sendo o primeiro o mais significativo. As membranas de PB recém-coletadas do abatedouro são inspecionadas e separadas e têm espessura que pode variar entre 100 μm e 1000 μm , sua superfície possui “áreas ideais” que são recortadas em formato circular, com 13,0 cm de diâmetro e de espessura uniforme que varia entre 300 μm e 500 μm . Dessa forma, a primeira etapa do controle de qualidade para a fabricação das biopróteses cardíacas implica em quantidades significativas de descartes de membranas de PB. A demanda detectada pela empresa parceira ocorreu, portanto, sobre o redirecionamento do descarte de PB que apresentasse espessura classificada como “não-conforme” aos padrões exigidos industrialmente para a produção de folhetos valvares. Este projeto buscou alternativas através do uso consciente de descartes provenientes da indústria de biomateriais.

A enxertia com biomateriais pode ser definida como uma tecnologia com potencial para substituir tecidos ou órgãos prejudicados, seja pela idade, traumas ou por doenças congênitas. A palavra *scaffold* pode ser traduzida para “arcabouço” ou “estrutura tipo andaime” e a descelularização de tecidos é um dos métodos que produz estas estruturas. Um *scaffold* compreende uma estrutura tridimensional porosa que imita a matriz extracelular (MEC) de um tecido ou órgão nativo e existem diferentes métodos para obtenção de *scaffolds* de colágeno. Assim, a partir dos descartes de PB, desenvolvemos um protocolo para a produção de *scaffolds* de colágeno, com resultados compatíveis a métodos reportados na literatura científica, utilizando técnicas e reagentes de baixo custo e realizando a combinação de técnicas de descelularização de baixo investimento, o que implicou na redução das quantidades de reagentes químicos e redução no tempo médio para produção do biomaterial.

A descelularização de tecidos é um processo que está diretamente relacionado à rejeição e a inflamações ocasionadas por componentes nativos. Técnicas de descelularização podem ser classificadas como: físicas (ações físicas), químicas (reagentes químicos) ou enzimática (agentes enzimáticos). As técnicas enzimáticas, embora bastante eficazes, possuem um alto custo na obtenção, armazenamento e

manuseio das enzimas utilizadas. Por outro lado, técnicas físicas e químicas são mais acessíveis e de menor manutenção em comparação às técnicas enzimáticas. Há interesse industrial e comercial na busca por métodos eficientes de descelularização, como enxertos heterólogos na forma de implantes de colágeno ou membranas absorvíveis, comercializadas entre US\$ 8,00/cm² e US\$ 30,00/cm², e ainda na forma de enxerto ósseo, que pode custar até US\$ 100,00/g. Empresas consolidadas no mercado de enxertos produzem membranas colagênicas para suporte regenerativo por meio de absorção de células e/ou ossatura nativas ao paciente, é o caso da Baumer, do Brasil; e Geistlich, da Alemanha (Baumer website, 2024; Geistlich website, 2024). Acredita-se que a fabricação de tais produtos se enquadra na cadeia de processos já existente na empresa parceira, em que a biomassa é de origem 100% bovina. Portanto o projeto se fundamentou em técnicas eficientes para descelularizar o PB a fim de equiparar resultados obtidos por tratamentos enzimáticos impostos para a produção de xenoenxertos.

A contribuição oferecida pela empresa parceira foi de reconhecimento do mercado e a respectiva bibliografia patentária dos métodos e dispositivos utilizados na pesquisa; oferecimento de ensaios clínicos nas dependências da empresa, bem como parceria com laboratórios associados; disponibilização de pessoal; treinamentos; e fornecimento de reagentes e material de qualidade para desenvolvimento de um processo de interesse à propriedade intelectual da empresa, resultando em uma proposta de inserção de novos produtos em sua cadeia de suprimentos. Um projeto no domínio da Engenharia de Tecidos foi delineado entre a Universidade Estadual Paulista e a Empresa Parceira Products and Features Brasil P&D. A Agência Unesp de Inovação (AUIIN) intermediou um Contrato de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação, promovendo este acordo. À luz destes desafios, concentramos nossos esforços no desenvolvimento de biomateriais derivados de fontes naturais, tais como matrizes extracelulares provenientes de tecidos descelularizados, que possam oferecer biocompatibilidade e propriedades funcionais compatíveis com dispositivos comercializados atualmente. Um novo método para descelularização foi obtido no desenvolvimento deste projeto, capaz de evitar a desnaturação proteica e que registrou ausência de citotoxicidade em testes *in vitro* no pericárdio bovino tratado, além do manutenção das propriedades mecânicas do pericárdio.

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver um protocolo eficiente de descelularização do pericárdio bovino (PB) que corresponda aos resultados obtidos pelos tratamentos enzimáticos utilizados na produção de xenoenxertos.

2. Produzir *scaffolds* de colágeno a partir de PB descartados, utilizando técnicas e reagentes de baixo custo, com foco na redução do uso de reagentes químicos e do tempo de produção.

3. Investigar e desenvolver um método de descelularização capaz de preservar as propriedades mecânicas, evitar danos à matriz extracelular e não demonstrar citotoxicidade em testes *in vitro* no pericárdio bovino tratado.

4. Estabelecer a colaboração entre a Universidade Estadual Paulista e a empresa parceira Products and Features Brasil P&D para avançar nas pesquisas na área de Engenharia de Tecidos, com o objetivo de inserir novos produtos na cadeia de suprimentos da empresa.

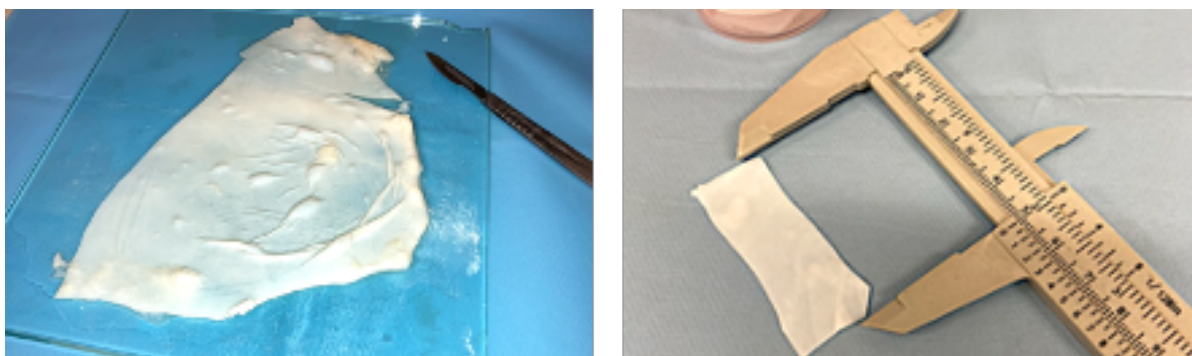
3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 Biomateriais

São considerados biomateriais os biopolímeros, cerâmicas ou placas de titânio/aço inoxidável utilizados em dispositivos médicos ou na forma de implantes. A literatura apresenta registros primitivos sobre a utilização de materiais que substituíam ou preenchiam órgãos danificados desde a antiguidade, como o ouro (BECKER, 1999; NERLICH et al., 2000). Atualmente, o progresso na pesquisa com biomateriais, principalmente nas últimas décadas, se deve às obrigações no cumprimento de critérios de biocompatibilidade e melhorias de performance destes dispositivos (HOLZAPFEL et al., 2013).

A biocompatibilidade é o maior obstáculo para os biomateriais, uma vez que podem provocar respostas imunológicas e inflamação, minando sua capacidade de interagir harmoniosamente com os organismos vivos. As propriedades mecânicas representam outro obstáculo: materiais sintéticos têm dificuldade para replicar os diversos comportamentos mecânicos dos tecidos naturais, que vão desde a flexibilidade à elasticidade e resistência a estiramentos, o que é fundamental para sua funcionalidade (CHELU; MUSUC, 2023; REDDY et al., 2021). Logo, as complexas microestruturas dos tecidos naturais têm se mostrado superiores à imitação sintética. A Figura 1 ilustra o pericárdio bovino (PB) nativo usado neste projeto.

Figura 1 – Fotografias representativas do pericárdio bovino (PB). PB nativo sobre placa de vidro para corte (à esquerda) e recorte de PB nativo em formato retangular (à direita); paquímetro para referência



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

3.2 Escassez de doadores

Atualmente, os órgãos ou tecidos comumente transplantados pelo sistema público de saúde do Brasil são: pele, coração, pulmões, rins, pâncreas, fígado e medula óssea (SISTEMA NACIONAL DE TRANSPLANTE, 2023). O Brasil é o país onde mais se transplanta órgãos e tecidos no mundo através da iniciativa pública. Em 2022, o Sistema Único de Saúde (SUS) atendeu a 10.181 transplantes de tecido musculoesquelético, sendo estas intervenções ortopédicas e odontológicas variadas que dependem exclusivamente de matrizes naturais ou sintéticas de colágeno Tipo I (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO), 2023). No contexto mundial, o país se destacou tendo crescido de 33,2 em 2021 para 35,7 transplantes por milhão de habitantes em 2022. No entanto, países como Estados Unidos e Espanha superam a média brasileira em mais de três vezes, de acordo com o site do Observatório Global sobre Doações e Transplantes (TRANSPLANT OBSERVATORY, 2024).

3.3 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos visa reparar tecidos lesionados que sofreram traumas, por fatores etários, acidentais ou doenças, imitando a estrutura e função do órgão danificado. Terapias baseadas na Engenharia de Tecidos incluem materiais sintéticos ou naturais e, geralmente, há limitações fundamentadas em aspectos como a origem do biomaterial, a compatibilidade e as características físico-químicas que permitirão a adesão e regeneração com novas células. No entanto, há produtos disponíveis atualmente que receberam aprovação de órgãos internacionais, como a agência Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Dentre eles, o polímero tridimensional (Dermagraft®) pode ser usado para crescimento de fibroblastos no tratamento de úlceras (HARDING; SUMNER; CARDINAL, 2013), o tecido descelularizado homólogo (ReadiGRAFT®) pode ser usado para cicatrização de ferimentos (SONG; OTT, 2011) ou a combinação de membranas de Colágeno Tipo I (Bio-Gide®) e enxertos ósseos heterólogos (Bio-Oss®) para retração gengival (BURNS et al., 2000).

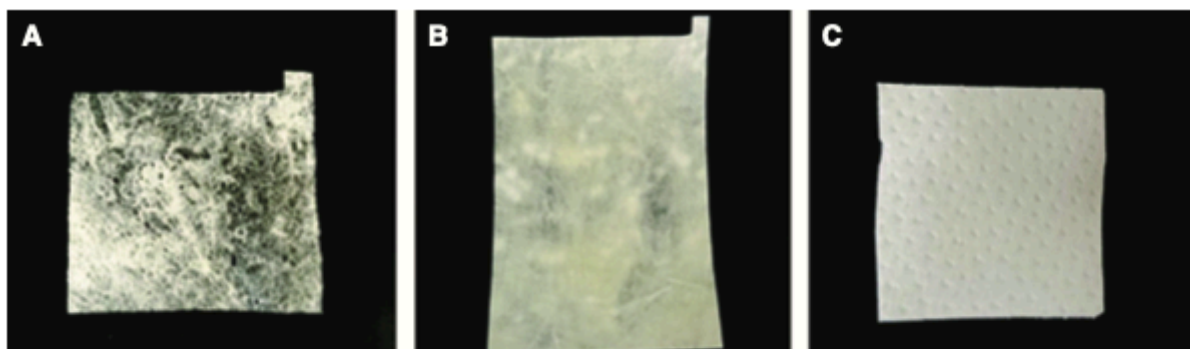
A escolha por biopolímeros naturais quando comparamos a materiais sintéticos para transplantes está relacionada a vantagens como melhor bioatividade e

hidrofilicidade, ampliando a resposta celular e função biológica do órgão (REDDY et al., 2021). O material do *scaffold* deve oferecer integridade ao tecido hospedeiro, capacidade de suporte de carga e capacidade de remodelação, além de ser dimensionado adequadamente para o defeito específico a ser tratado (HENKEL et al., 2013; KOONS; DIBA; MIKOS, 2020). Criar a estrutura ideal para o crescimento de tecidos é um desafio, pois diferenças químicas e estruturais influenciam diretamente o comportamento celular migratório. Desta forma, uma opção promissora de biomaterial são os tecidos biológicos descelularizados (KUSUMA et al., 2018), como os tecidos pericárdicos, que oferecem composição primariamente de colágeno Tipo I, microarquitetura estrutural e perfil análogo à matriz extracelular (MEC) de tecidos humanos (ZOUHAIR et al., 2020). A Figura 2 exemplifica três configurações de *scaffolds* obtidos da MEC de mamíferos.

O PB descelularizado destaca-se como um potencial material de enxertia. Este biomaterial mantém o arranjo das principais proteínas da MEC durante todo o processo de descelularização, tornando-se uma escolha confiável (GARDIN et al., 2015; HEUSCHKEL et al., 2019). Além disso, os *scaffolds* de PB possuem uma MEC elástica e uma estrutura tridimensional bem desenvolvida, tornando-os adequados para aplicações de Engenharia de Tecidos (YANG et al., 2009, 2012). O PB é um material disponível prontamente, podendo ser coletado com mínimos impactos na produção frigorífica e são econômicos, tornando-os viáveis para a produção de *scaffolds* em larga escala.

Figura 2 – Diferentes configurações de *scaffolds* da Matriz Extracelular (MEC) de:

A) rim; B) bexiga urinária; C) derme



Fonte: Adaptado de Costa (2017).

3.4 Enxertia

A enxertia é o procedimento no qual um tecido saudável é explantado de um doador, falecido ou vivo, e implantado em um receptor a fim de substituir o órgão danificado ou não funcional. O órgão implantado recebe o nome de enxerto.

O mercado global de implantes para enxertia está enfrentando um crescimento constante, impulsionado pela demanda por soluções médicas inovadoras e pelos avanços nas tecnologias de Engenharia de Tecidos. Os principais desenvolvedores de implantes presentes no mercado estão investindo em pesquisa e desenvolvimento (P&D) a fim de aumentar a eficácia e segurança em seus produtos. Apesar do potencial promissor dos enxertos, o mercado enfrenta vários desafios, incluindo preocupações com a imunogenicidade, obstáculos regulatórios e considerações éticas em torno do uso de tecidos de origem animal. Enfrentar estes desafios requer colaboração interdisciplinar e investimento contínuo em pesquisas e desenvolvimento.

As empresas no mercado de xenoenxertos incluem empresas estabelecidas, como a Eurofarma, Baumer e Criteria Biomaterials, e empresas emergentes de biotecnologia, como a Products and Features Brasil. Essas empresas estão focadas no desenvolvimento de produtos para aplicação como enxertos e na expansão de sua presença no mercado por meio de inovações no mercado de biomateriais. Estas empresas desenvolvem atividades variadas, como xenoenxertos cardíacos para substituição de válvula cardíaca, xenoenxertos ortopédicos para reparo ósseo e xenoenxertos de tecidos moles para cicatrização de feridas. O interesse geral no avanços das técnicas de Engenharia de Tecidos nas últimas duas décadas tem apresentado resultados positivos no desenvolvimento de xenoenxertos com melhor biocompatibilidade e durabilidade. O Quadro 1 relaciona empresas e produtos desenvolvidos na área de implantes produzidos a partir de biomateriais.

Colaborações entre instituições acadêmicas, organizações de pesquisa e parceiros industriais favorecem os avanços na pesquisa e desenvolvimento de xenoenxertos, como a descclularização de tecidos, modificação de biomateriais e tecnologias com células-tronco. As principais tendências do mercado incluem bioimpressão 3D e o desenvolvimento de órgãos de bioengenharia para transplante.

Quadro 1 – Empresas brasileiras atuantes no mercado de biomateriais

Empresa	Tipo de Produto	Doenças / condições específicas
Baumer S.A.	Implantes ortopédicos	Cirurgias de substituição articular, fraturas, defeitos ósseos
FH Ortopedia	Implantes ortopédicos, instrumentos cirúrgicos	Vários procedimentos ortopédicos, incluindo cirurgias de trauma, coluna e articulações
Neodent	Implantes dentários, componentes protéticos	Perda dentária, edentulismo, reabilitação oral
Eurofarma	Implantes ortopédicos, biomateriais	Defeitos ósseos, regeneração óssea
Implacil De Bortoli	Implantes dentários, componentes protéticos	Perda dentária, edentulismo, reabilitação oral
SIN Implantes	Implantes dentários, componentes protéticos	Perda dentária, edentulismo, reabilitação oral
Grupo Straumann Brasil	Implantes dentários, componentes protéticos	Perda dentária, edentulismo, reabilitação oral
Products and Features Brasil	Implantes cardíacos protéticos	Insuficiência Valvar, implante transcaterter
TitânioFix	Implantes e instrumentos ortopédicos	Cirurgias de substituição articular, fraturas, defeitos ósseos

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

As agências reguladoras desempenham um papel crucial na garantia da segurança e eficácia dos produtos destinados à enxertia. Estas regulamentações buscam melhorar o desempenho e a funcionalidade dos xenoenxertos. Dentre as formas de regulamentações nacionais que regem a produção, teste e comercialização de xenoenxertos, estão a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as Normas Brasileiras (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Podemos classificar enxertos quanto à sua origem e quanto à composição. Órgãos ou tecidos usados para enxertia podem ser homólogos (mesmo indivíduo), alogênicos (indivíduo não idêntico geneticamente, porém sendo ambos da mesma espécie) ou heterólogos (entre espécies diferentes). O enxerto pode ser total, quando toda a derme está presente no material; parcial, quando há apenas uma camada fina de derme; ou composto, que consiste em pele acrescida de um componente de gordura ou cartilagem, usados em situações especiais, que requerem reconstrução tridimensional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA, 2024).

3.4.1 Enxertos Homólogos (autoenxertos)

Procedimento que envolve a substituição do tecido danificado de um indivíduo por tecido saudável obtido de outra parte do próprio corpo. Autoenxertos, como enxertos de pele para queimaduras graves (WOOD; KOLYBABA; ALLEN, 2006), veias safenas para revascularização do miocárdio (CALISKAN et al., 2020), reparo ou restituição do ligamento cruzado anterior (LCA) (HARNER et al., 1996), entre outros, são frequentemente utilizados e possuem vantagens em relação aos outros tipos de enxertos. Como o tecido enxertado contém componentes imunológicos idênticos, não provoca rejeição, e os pacientes que recebem autoenxertos não necessitam de imunossupressão. No entanto, há limitações em se obter tecido de qualidade suficiente para transplante da mesma pessoa, além de requerer uma operação adicional para se extrair o enxerto.

3.4.2 Enxertos Alogênicos

Enxertos alogênicos envolvem a utilização de tecidos ou órgãos de outros indivíduos da mesma espécie, embora geneticamente diferentes. Quando o sistema imunológico receptor identifica um enxerto como estranho, uma cascata complexa de reações celulares e moleculares é desencadeada pós-transplante, levando potencialmente à rejeição. Portanto, a seleção criteriosa de um doador adequado, de acordo com diretrizes clínicas como idade, sexo, raça, testes sorológicos para doenças infecciosas e presença de condições como diabetes (SEZER et al., 2011; WESTPHAL et al., 2016) entre outras, é fundamental. Além disso, a aplicação de tratamentos imunossupressores aumenta significativamente as chances de sobrevivência do enxerto e prolonga sua vida funcional (STEWART et al., 2004). Atualmente, por exemplo, a taxa de sobrevivência de um ano após o transplante renal excede 80%, e mesmo casos de rejeição aguda podem ser controlados de forma eficaz (DURAND, 2018).

3.4.3 Enxertos Heterólogos (xenoenxertos)

O enxerto heterólogo, comumente referido como xenoenxerto, constitui no transplante de tecidos ou órgãos entre espécies diferentes. Bovinos e suínos surgiram

como fontes preferidas de órgãos xenoenxertados em humanos devido a algumas semelhanças anatômicas, como órgãos de tamanho comparável, maturidade precoce, curtos períodos de gestação, reprodução prolífica e órgãos com funções muito semelhantes às dos órgãos humanos (GROTH, 2007). Ao longo de décadas, válvulas nativas destes animais serviram como substituto total ou parcialmente implantadas nos enxertos em humanos. Embora este procedimento constitua um enorme desafio, transplantes clínicos alcançaram taxas de sucesso acima de 80% em estudos de longo prazo, utilizando válvulas cardíacas suínas e bovinas que foram reticuladas com glutaraldeído (COLLATUSSO et al., 2019). Estes resultados enfatizam a eficácia de tais xenoenxertos em aplicações médicas práticas. No entanto, um obstáculo significativo no transplante bovino para humanos é a resposta de rejeição desencadeada pela presença do epítopo galactose-alfa-1,3-galactose (α -gal), descrito amplamente como a primeira barreira de um processo inflamatório em xenoenxertos (GONÇALVES et al., 2005). Este epítopo é responsável pelo desencadeamento da doença encefalopatia espongiforme bovina (EEB), popularmente conhecido como “doença da vaca-louca”. Caso o material enxertado possua vestígios de DNA que contenham o epítopo α -gal, seria então possível a transmissão da doença ao paciente. No Brasil, a doença já foi controlada em animais e não apresenta riscos, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS).

Quadro 2 – Implantes e substitutos dérmicos disponíveis no mercado brasileiro de enxertos e respectivas indicações

Matriz	Material	Utilização
Matriderm	Colágeno e elastina de derme bovina	Feridas, queimaduras e cirurgia reparadora
Pelnac	Colágeno de derme suína + silicone (fenestrado ou não)	Terapia de reparo tecidual
Oasis	Submucosa de jejuno suíno	Queimaduras e reparo tecidual
Integra	Colágeno e glicosaminoglicana de tendão bovino + silicone	Feridas crônicas e superficiais
Permacol	Colágeno dérmico suíno acelular reticulado	Reparo de hérnia ventral

Fonte: Adaptado de Cruz (2016).

Há disponibilidade no mercado de xenoenxertos: o Quadro 2 apresenta uma pequena parte do mercado de membranas biológicas absorvíveis e com propriedades regenerativas, que previnem não somente a permeação, ou penetração, de tecido mole para dentro do local enxertado, mas podem também atuar como guia para a formação adequada de osso, tecido mole e o desenvolvimento de vasos sanguíneos. A Figura 3 ilustra a membrana Bio-Gide, produzida para enxertia de tecidos dentro da área odontológica.

Figura 3 – Membrana em bicamada Bio-Gide® (Geistlich, Suíça) para ortodontia. Enxerto heterólogo produzido com colágeno suíno, para regeneração gengival



Fonte: Geistlich *website* (2024).

3.5 Matriz Extracelular (MEC)

A MEC é a matriz intersticial presente entre as células e elementos do tecido conjuntivo, chamado de membrana basal. Além de atuar como um substrato para a fixação das células, a MEC também auxilia na migração e diferenciação celular (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010; HUTTENLOCHER; SANDBORG; HORWITZ, 1995). A MEC é composta por proteínas, polissacarídeos, minerais e água. As principais proteínas e polissacarídeos que constituem a MEC são colágenos, elastina, fibronectina, laminina, fatores de crescimento e glicosaminoglicanos (GAG) associados. Cada órgão e tecido é composto por uma MEC com uma composição única, dependendo do tipo de célula local do tecido e das mudanças dinâmicas que ocorrem ao longo do seu desenvolvimento. O tipo de célula e a composição da MEC determinam as propriedades biomecânicas, como elasticidade, resistência à tração e à compressão (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

3.5.1 Colágeno

O colágeno, a proteína primária em mamíferos, particularmente o Tipo I, domina o tecido conjuntivo. Ele desempenha múltiplas funções, incluindo proteção de órgãos, manutenção da integridade estrutural dos tecidos e fornecimento de resistência mecânica. O tropocolágeno, seu precursor, apresenta uma estrutura molecular hierárquica, variando desde pequenas fibrilas até extensas cadeias de fibras na Matriz Extracelular (MEC). Pele, tendões e cartilagem são compostos por essa proteína fibrosa, formando estruturas de suporte essenciais em todo o corpo. Os colágenos dos tipos I, II e III contribuem significativamente para a resistência dos tecidos, constituindo 80-90% do total de colágenos, sendo o colágeno Tipo II localizado principalmente na cartilagem (THEOCHARIS et al., 2016). Os tipos I e III são encontrados predominantemente na pele, músculos, vasos sanguíneos, tendões, ossos e dentina. O colágeno Tipo IV, um tipo formador de rede, está presente principalmente na membrana basal. A Tabela 3 fornece uma visão geral de conformações e tipos de colágeno.

Quadro 3 – Tipos e apresentações da molécula de Colágeno

	Tipo	Fórmula Molecular	Forma polimerizada	Distribuição nos tecidos
Formação de fibrilas (fibrilar)	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	fibrila	Ossos, pele, tendões, ligamentos, córnea (representa 90% do colágeno total do corpo humano)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	fibrila	Cartilagem, disco intervertebral, humor vítreo
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	fibrila	Pele, vasos sanguíneos
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$ e $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$	Fibrila (agrega com o tipo I)	<i>Idem</i> tipo I
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Fibrila (agrega com o tipo II)	<i>Idem</i> tipo II
Associado a fibrilas	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	Associação lateral com fibrila tipo II	cartilagem
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Associação lateral com fibrila tipo I	Tendões, ligamentos
Formação de cadeias	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Cadeias tipo folha	Membrana basal
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fixação de fibrilas	Membrana amniótica

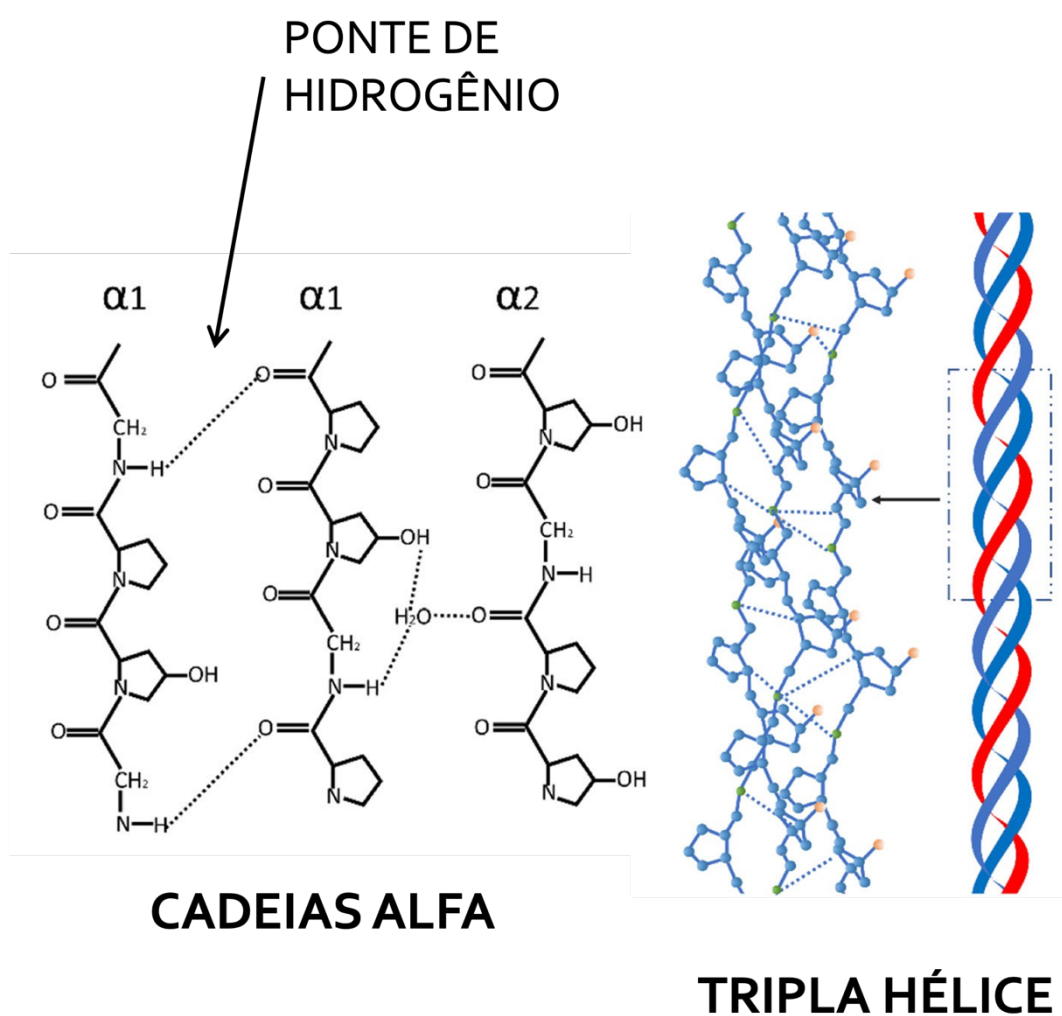
Fonte: Adaptado de Parenteau-Bareil; Gauvin; Berthod (2010).

São 29 tipos de colágenos encontrados, formados por cadeias alfa, dependentes da sequência de aminoácidos que as compõem. A combinação de duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2 forma o colágeno Tipo I, por exemplo. O colágeno Tipo I está presente na preparação da grande maioria dos biomateriais. Este tipo de colágeno é composto por um filamento de 300 nm de comprimento, 1,5 nm de diâmetro e um “gap” de 67 nm entre os terminais carboxila e amina das fibrilas de colágeno. Sua estrutura básica é o tropocolágeno (Figura 4), com 280 KDa, que se encontra em abundância em mamíferos e vertebrados.

Todos os tipos de colágeno são caracterizados por conter domínios com repetições do tri-peptídeo (GLY-X-Y) envolvido na formação das tripla-hélices de colágeno. A presença de Glicina (GLY) é essencial a cada terceira posição de aminoácidos, com as posições X e Y geralmente ocupadas por uma Prolina (PRO) ou Lisina (LIS) e por uma Hidroxiprolina (HYPRO) ou Hidroxilisina (HYL),

respectivamente. Com base na estrutura e função, os colágenos podem ser categorizados em fibrilares, formadores de rede, fibrilas associadas à membrana, formadoras de filamentos, fibrilas de ancoragem e do tipo produtores de endostatina (THEOCHARIS et al., 2016).

Figura 4 – Esquema da formação da tripla hélice. Cadeias-alfa e configuração molecular (à esquerda) e tripla hélice que forma desde o procolágeno, ao tropocolágeno e colágeno (à direita)



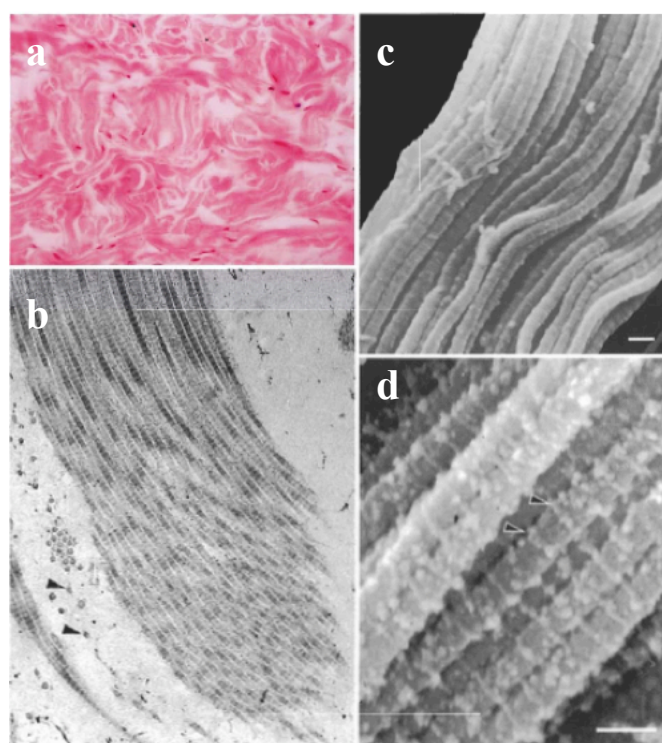
Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* (2020).

3.5.2 Elastina

A elastina é outra estrutura fibrosa da MEC, proporcionando aos tecidos a capacidade de responder às forças de estiramentos. A formação e a função das fibras de elastina são fundamentais para o correto funcionamento das artérias, pulmões, coração, bexiga e pele. A elastina é formada a partir de monômeros de tropoelastina, uma proteína de 60-70kDa, um precursor secretado que se polimeriza para formar fibras de elastina insolúveis (THEOCHARIS et al., 2016). Acredita-se que os domínios hidrofóbicos da elastina contribuem para as propriedades elásticas do tecido (MUIZNIEKS; WEISS; KEELEY, 2010). As microfibrilas estão localizadas ao entorno da fibra e auxiliam na correta disposição, alinhamento e reticulação das moléculas de elastina (Figura 5).

Figura 5 – Fibras de colágeno observadas por: Microscopia Óptica da pele humana (a); Microscopia Eletrônica de Transmissão da pele humana (b), as setas apontam fibrilas independentes ao redor do aglomerado; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do tendão de rato (c); e MEV da aorta de rato (d), as setas apontam estruturas filamentosas que conectam as fibras de colágeno periodicamente

Barra: 100 μm



Fonte: Adaptado de Ushiki (2002).

3.5.3 Fibronectina

A fibronectina é uma glicoproteína de alto peso molecular presente na MEC de vários tipos de tecidos. Interage com o colágeno e as células por meio de seus receptores de integrina, além de ajudar na formação, reparo e remodelação dos tecidos. Esta proteína compreende subunidades ligadas covalentemente por ligações dissulfeto (PETERSEN et al., 1983). A fibronectina se apresenta como fibronectina plasmática ou moléculas de fibronectina celular. Moléculas de fibronectina medeiam a adesão celular (KIM; MOONEY, 1998). As células associam moléculas plasmáticas e secretadas de fibronectina celular em uma fibra supramolecular, e subsequentemente a um estado fibrilar (SKORSTENGAARD et al., 1986).

3.5.4 Laminina

A laminina é outra glicoproteína de alto peso molecular, localizada principalmente na membrana basal junto com o colágeno tipo IV. Em casos específicos, trata-se de uma proteína capaz de interagir com outras lamininas (SCHITTNY; YURCHENCO, 1990; YURCHENCO et al., 1985) ou com ela mesma para formar polímeros de ordem maior (IORIO; TROUGHTON; HAMILL, 2015). As lamininas também são capazes de interagir com outras proteínas e células da MEC e ajudar na adesão, diferenciação, migração e organização da MEC. As lamininas desempenham um papel fundamental durante a cicatrização de feridas, fornecendo um substrato para a fixação de células epiteliais, além de desempenhar um papel importante no crescimento e maturação de vasos sanguíneos (GRANT; KLEINMAN, 1997).

3.5.5 Fatores de crescimento

Além de uma rede fibrilar de proteínas e glicanos, a MEC contém fatores de crescimento secretados pelas células que a tornam única para o tipo específico de órgão e local. A ampla gama de fatores de crescimento na MEC inclui: fator de crescimento de fibroblastos (FCF); fator de crescimento vascular endotelial (FCVE), que age na angiogênese e na granulação dos tecidos num estágio inicial da cicatrização; fator de crescimento de hepatócitos (FCH); fator de crescimento derivado

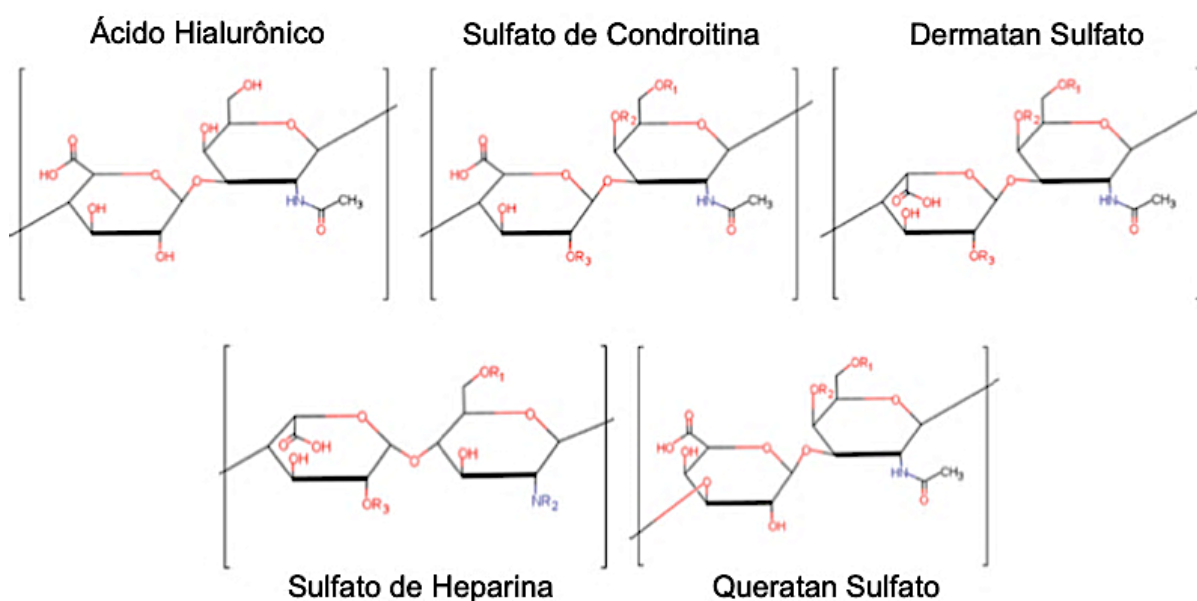
de plaquetas (FCDP), fundamental nas três fases de cicatrização de feridas; fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (FEC-GM); fator de crescimento transformador (FCT); e fatores de crescimento insulínico (FCI), este estimula a proliferação celular, a remodelação tecidual e o aumento de colágeno e elastina (DAVID JOÃO DE MASI et al., 2016; MESSIER; TEUTENBERG, 2005). Na MEC, os fatores de crescimento são geralmente encontrados em associação com GAG, como sulfato de heparano. Em sua conformação tridimensional e em associação com as moléculas mencionadas, a MEC regula o comportamento celular, proliferação, diferenciação, formação de tecido, reparo e regeneração.

3.5.6 Glicosaminoglicanos

Os Glicosaminoglicanos (GAG) são moléculas extensas de polissacarídeos ligados ao colágeno por suas cadeias laterais. GAG como o Sulfato de Condroitina pode atuar como um componente de retenção de água e servir como um lubrificante de articulações (FOOT; MULHOLLAND, 2005; HENROTIN et al., 2010). São importantes por apresentarem propriedades como retenção de água, regulação da diferenciação e sinalização celular (CATERSON; MELROSE, 2018; NECAS et al., 2008). GAG são classificados pelos tipos sulfatados e não-sulfatados. Os sulfatados são o sulfato de heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de queratan (Figura 6). Os GAG não-sulfatados são o ácido hialurônico e a heparina (KOLSET; GALLAGHER, 1990; SODHI; PANITCH, 2021).

Figura 6 – Ilustração das unidades monoméricas de diferentes glicosaminoglicanos.

“R” indica pontos de sulfatação (substituição por SO_3)



Fonte: Adaptado de Sodhi; Panitch (2021).

3.6 Descelularização

A descelularização é um método usado para remover células nativas de um órgão ou tecido, resultando em uma estrutura que se assemelha muito à MEC do órgão nativo em termos de arquitetura e composição. Especificamente, a descelularização de membranas ganhou popularidade, com múltiplas técnicas em desenvolvimento para produzir uma MEC descelularizada (DEEKEN et al., 2012; PORZIONATO et al., 2018). Nas últimas três décadas, vários protocolos de descelularização foram desenvolvidos para órgãos inteiros (ELEBRING et al., 2017; SCHMITT et al., 2017), bem como para tecidos simples e complexos de origem humana e animal (BURK et al., 2014; WOLLMANN et al., 2019). Por exemplo, estruturas intestinais descelularizadas têm sido utilizadas para fins regenerativos em vários tecidos devido à sua capacidade inata de apoiar a resposta imune, o repovoamento de células vivas e a regeneração em várias áreas, como esôfago (SYED et al., 2014), vasos sanguíneos (BADYLAK et al., 1989; LANTZ et al., 1990), trato urinário (KROPP et al., 1998) e derme (JANIS et al., 2012).

Uma matriz descelularizada pode ser considerada minimamente imunogênica por não conter os componentes celulares responsáveis pela imunogenicidade (VIG et al., 2017). Como resultado, esta estrutura descelularizada poderia ser enxertada sem a necessidade de supressão imunológica (KASRAVI et al., 2023). A descelularização pode ser realizada por meio de métodos físicos, químicos ou enzimáticos e, mais comumente, realiza-se uma combinação destes métodos ao longo de etapas de descelularização (MENDIBIL et al., 2020). A maioria dos protocolos de descelularização geralmente começa com um método físico para lisar as células, seguido por tratamentos químicos ou enzimáticos para separar o material nuclear da MEC e, por fim, a lavagem das membranas com solução fisiológica a fim de remover os debris celulares e preservar a natureza do tecido, processo referido neste texto como estabilização.

3.6.1 Tratamento Físico

Os tratamentos físicos para descelularização incluem congelamento, pressão hidrostática, banho ultrassônico e agitação mecânica. Tais tratamentos dependem da força mecânica para separar as células circundantes da MEC. É importante ressaltar que esses métodos podem alterar a estrutura da MEC, sendo necessária atenção quanto à sua intensidade e duração.

O tratamento físico por si só é geralmente insuficiente para alcançar a descelularização completa, e uma lavagem subsequente do material se torna necessária para eliminar remanescentes celulares. O uso de temperaturas abaixo de zero grau Celsius induz a formação de cristais de gelo no interior das células, causando ruptura e lise da membrana celular. Este método é particularmente eficaz para tendões e ligamentos (BECHTOLD et al., 1994; ROBERTS et al., 1991). No entanto, pode causar danos à estrutura da MEC devido aos cristais de gelo danificarem as fibras de colágeno. Embora o congelamento e o descongelamento lentos possam ser benéficos, eles podem não prevenir completamente os danos à MEC.

Outro método eficaz envolve submeter as células à alta pressão em câmaras de descelularização, atingindo pressões de até 1.000 MPa, rompendo as membranas

celulares. Embora esse método permita uma interação eficiente entre os agentes químicos e a matriz, também pode prejudicar as fibras colágenas do tecido, comprometendo sua resistência mecânica. Esta técnica obteve resultados positivos na descelularização de córneas (HASHIMOTO et al., 2010) e vasos sanguíneos (FUNAMOTO et al., 2010).

O banho ultrassônico, também conhecido como sonicação, aplica energia acústica às membranas celulares para rompê-las. No entanto, o uso prolongado pode levar a um aumento de temperatura que pode danificar o *scaffold*. Além disso, a própria vibração pode danificar as estruturas da MEC. A descelularização bem-sucedida de artérias sanguíneas e laringe suína usando sonicação (HUNG et al., 2013; SYAZWANI et al., 2015) surgiram na última década, com duração de ação variando de 30 minutos a 24 horas.

3.6.2 Tratamento Químico

Os métodos químicos para descelularização envolvem o uso de ácidos, reagentes alcalinos, detergentes ou surfactantes, solventes e tampões hipotônicos ou hipertônicos. Entre estes, os detergentes são amplamente favorecidos e frequentemente incluídos em protocolos de descelularização. Seu impacto nas proteínas da MEC pode ser ajustado de acordo com a concentração do detergente ou selecionando um detergente alternativo. Normalmente, os detergentes induzem a lise celular danificando a membrana fosfolipídica das células (NAZARI; KURDI; HEERKLOTZ, 2012).

3.6.2.1 Reagentes ácidos e alcalinos

Os reagentes ácidos e alcalinos que são comumente usados em protocolos de descelularização incluem ácido peracético (APA), hidróxido de amônio ou hidróxido de sódio. O uso de reagentes ácidos e alcalinos proporcionam a ação de cargas elétricas em solução e variações no pH do tecido de forma eficaz para solubilizar a membrana celular e os componentes citoplasmáticos e nucleares. No entanto, alguns reagentes podem causar danos ao colágeno ao alterar sua disposição e removerem GAG do tecido mais extensamente que o desejado. Existem protocolos de desinfecção para

bexiga urinária porcina com APA aplicada como xenoenxerto em cães, com resultados excelentes na remodelagem de lesões no esôfago (GILBERT et al., 2008) ou aplicado como agente de descelularização para a pequena submucosa intestinal, no entanto não tendo sucesso na eliminação de material celular visível em lâminas histológicas (SYED et al., 2014).

3.6.2.2 *Surfactantes*

A classe de surfactantes é caracterizada por espécies químicas que interagem com moléculas polares e apolares, diminuindo a tensão superficial entre duas substâncias, líquido-sólido ou líquido-líquido. Os detergentes são tipos específicos de surfactantes, todos caracterizados por uma parte hidrofóbica (cauda) e uma parte hidrofílica (cabeça). Sua classificação é baseada na estrutura e carga da cabeça hidrofílica, classificando-os em três categorias: iônicos (catiônicos ou aniônicos), não-iônicos e zwitteriônicos. A Tabela 1 lista surfactantes utilizados na Ciência de Proteínas e na Engenharia de Tecidos e suas propriedades físicas. As principais propriedades dos surfactantes usadas para estudos bioquímicos são a concentração crítica de micelas (CMC) e o peso molecular da micela. A concentração na qual os monômeros das moléculas de detergente se combinam para formar micelas, conhecida como CMC, determina o peso molecular característico da micela. Variações no peso molecular da micela e na CMC são influenciadas por fatores como composição da solução tampão, concentração salina, pH e temperatura (COLIGAN, 2001).

Os surfactantes interrompem ou formam interações hidrofóbicas ou hidrofílicas com moléculas biológicas, resultando na criação de micelas (complexos) detergente-proteína/lipídio (SEDDON; CURNOW; BOOTH, 2004). Este processo também implica na interrupção das interações proteína-proteína, proteína-lipídio e lipídio-lipídio dentro do ambiente célula-MEC, levando, em última análise, ao desprendimento celular da MEC, à liberação de proteínas citoplasmáticas solúveis e ao dano às proteínas da membrana celular, que interagem com a MEC. Normalmente, os detergentes podem atingir de forma eficaz um ou dois destes tipos de interação, mas não todos, daí a necessidade potencial de uma combinação de detergentes para remover completamente o material celular da MEC. Devido a interações eletrostáticas entre o

DNA e a MEC, o DNA pode aglutinar na superfície do *scaffold*, e há relatos de que o SD promova esta aglutinação.

A maioria dos protocolos de descélularização atuais utilizam detergentes e surfactantes, e resíduos destes compostos remanescentes do processo podem ter um efeito adverso na subsequente recelularização da estrutura. Detecções de concentrações residuais podem ajudar a compreender a eficácia da remoção de moléculas de DNA e de reagentes químicos ao final do protocolo (ZVAROVA et al., 2016). Cebotari *et al.* (2010) avaliou as variações na migração de células endoteliais humanas em válvulas porcinas descélularizadas com até 10 enxágues em solução salina e notou uma queda exponencial na citotoxicidade de amostras tratadas com SD. As técnicas envolvidas neste estudo foram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para detecção dos resíduos de detergente após os enxágues e citotoxicidade de contato com o tecido hidrolisado.

Tabela 1 – Tipos de Surfactantes e propriedades físicas

Surfactante	pf (°C)	Peso molecular (Da)		CMC	
		Monômero	Micela	% (m/v)	M
Não-iônico					
Triton X-100		650	90.000	0,021	3,00x10 ⁻⁰⁴
C12E8		542	65.000	0,005	8,70x10 ⁻⁰⁵
Aniônico					
SDS	206	288	18.000	0,23	8,00x10 ⁻⁰³
Colato de Sódio	201	430	4.300	0,6	1,40x10 ⁻⁰²
Desoxicolato de Sódio	175	432	4.200	0,21	5,00x10 ⁻⁰³
Catiônico					
C16TAB	230	365	62.000	0,04	1,00x10 ⁻⁰³
Zwiteriônico					
CHAPS	157	615	6.150	0,49	1,40x10 ⁻⁰³
LysoPC		495	92.000	0,0004	7,00x10 ⁻⁰⁶

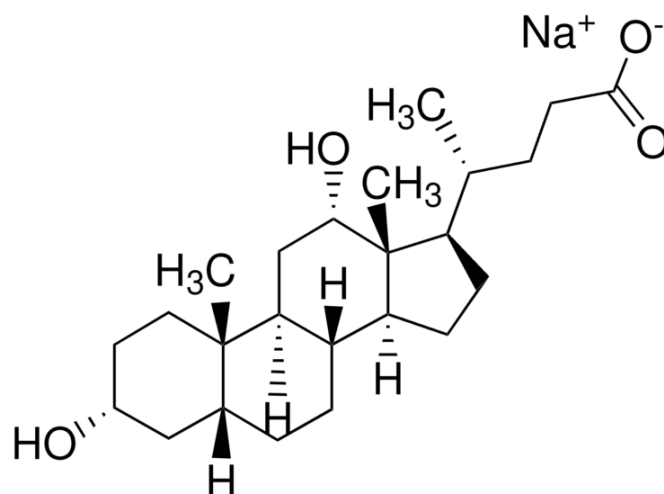
Abreviaturas: C12E8, dodecil octaglicol; C16TAB, brometo de hexadeciltrimetilamônio; CMC, concentração crítica de micelas; LysoPC, lisofosfatidilcolina; pf, ponto de fusão; SDS dodecil sulfato de sódio.

Fonte: Adaptado de Coligan (2001).

Os detergentes iônicos são reconhecidos pela sua capacidade de romper membranas celulares e expor material nuclear no ambiente extracelular. No entanto,

eles podem ter um efeito adverso na estrutura da tripla hélice do colágeno, causando danos à proteína (HWANG et al., 2017). O detergente aniônico mais comumente empregado na descelularização é o dodecil sulfato de sódio (SDS), conhecido por seu uso eficaz na descelularização de vários órgãos e tecidos (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019; GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006; SYED et al., 2014). Outro surfactante que recebe a classificação de sal biliar, o desoxicolato de sódio (SD) também é utilizado em protocolos de descelularização (Figura 7). De acordo com relatos da literatura, os *scaffolds* que passam por tratamento com SD mostraram vantagens comparados ao SDS em termos de atividade metabólica durante a cultura celular (SYED et al., 2014). Em estudo anterior, a descelularização de matriz porcina por SD não induziu o efeito de desnaturação associado ao SDS (HWANG et al., 2017). Em alguns estudos, o SD é usado em combinação com outros detergentes ou enzimas (CHEN et al., 2023; JUNGEBLUTH et al., 2009) com excelentes resultados na eliminação de células das matrizes.

Figura 7 – Estrutura química do desoxicolato de sódio



Fonte: Sigma-Aldrich *website* (2024).

Os detergentes não iônicos agem principalmente nas interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína, preservando em grande parte as interações proteína-proteína e, conseqüentemente, não desnaturam as proteínas, mantendo a sua conformação nativa. Esses detergentes são geralmente considerados mais suaves em sua ação

(MENDOZA-NOVELO et al., 2011). Um dos detergentes não iônicos amplamente utilizados é o Triton X-100. Vavken *et al.* relataram que a descelularização com Triton X-100 resultou em uma redução menor no conteúdo de GAG no tecido do ligamento cruzado anterior suíno em comparação com tratamentos com tripsina e SDS (VAVKEN; JOSHI; MURRAY, 2009).

Os detergentes zwitteriônicos combinam características de detergentes iônicos e não iônicos. Apresentam uma ação mais agressiva que os detergentes não iônicos, sendo mais suaves que os detergentes iônicos. O detergente zwitteriônico mais comumente usado é o 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propano sulfonato (CHAPS). Foi demonstrado que a descelularização com CHAPS remove os núcleos, preservando o colágeno nos vasos sanguíneos e nos pulmões. No entanto, este método pode comprometer as propriedades biomecânicas de vasos sanguíneos (DAHL et al., 2003) e, no caso do tecido pulmonar, pode não eliminar completamente os remanescentes citoplasmáticos (GILPIN et al., 2014).

3.6.3 Tratamento Enzimático

Tratamentos de descelularização com agentes enzimáticos incluem períodos de incubação ou de lavagens com soluções de proteases e nucleases. As proteases são consideradas agentes de descelularização agressivos e seu uso costuma ser associado a extensos danos à MEC. A protease mais utilizada é a tripsina, um serina protease frequentemente usada em combinação com o quelante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Nucleases como as endonucleases e exonucleases catalisam a hidrólise das ligações interna e externa das cadeias de ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos, levando à degradação do RNA ou DNA (FREYMAN, 2003).

Apesar da eficácia enzimática em clivar ligações peptídicas de Arginina e Lisina, a exposição prolongada da tripsina afeta a estrutura da MEC, remove elastina, fibronectina e GAG (MCFETRIDGE et al., 2004). Em protocolos para tecidos e órgãos complexos, a tripsina tem sido usada em combinação com outros detergentes (ZHOU et al., 2010). É relatado que a tripsina, associada ao tratamento com SD e Triton X-100, pode preservar o conteúdo de GAG na descelularização de válvulas porcinas; no entanto, modifica visivelmente a estrutura da MEC (YU et al., 2013).

3.6.4 Outros reagentes e aplicações

Os inibidores de proteases são adicionados às soluções de detergente para descelularização a fim de preservar a estrutura da MEC de proteases liberadas após a lise celular. Eles podem ter papel fundamental na descelularização de tecidos ou órgãos com alta atividade metabólica. Os inibidores de protease comumente usados são o fluoreto de fenilmetilsulfonida (PMSF), a aprotinina e a leupeptina (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Agentes quelantes como o EDTA são adicionados às soluções de descelularização, pois se ligam fortemente aos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} , interrompendo a ação enzimática intracelular. Além disso, os cátions bivalentes são necessários para a adesão celular (KLEBE, 1975).

Antibióticos são agentes preventivos a diversas contaminações bacterianas, em geral são usadas penicilina e estreptomicina. O estudo de Guillaume *et al.* aponta taxas reduzidas de infecção pelos enxertos usando materiais revestidos com polímero antibiótico em 2 e em 4 semanas após implante (GUILLAUME *et al.*, 2012). O agente bacteriostático azida sódica (NaN_3) também é usado em alguns protocolos para interromper o crescimento bacteriano durante a descelularização (GUILLAUME *et al.*, 2012).

A esterilização dos tecidos e órgãos pode ser alcançada por produtos químicos, incluindo álcool e peróxido de hidrogênio (STAPLETON *et al.*, 2008). Além disso, o ácido peracético pode atuar como um agente esterilizante ao entrar em contato com vírus e oxidar suas enzimas (HODDE; HILES, 2002).

3.6.5 Eliminação dos agentes de descelularização

Para garantir a não rejeição dos implantes e facilitar a recelularização, é necessário eliminar completamente os reagentes químicos, enzimas e quaisquer remanescentes nucleares pós-descelularização, uma vez que estas substâncias possuem propriedades citotóxicas e imunogênicas. Procedimentos eficazes de estabilização das membranas são fatores decisivos dentro de um protocolo de descelularização concebido para implantes heterólogos. Embora o risco seja

geralmente baixo, a literatura sugere que doenças causadas por príons, como a encefalopatia espongiforme bovina (EEB), podem ser transmitidas através de enxertos (WOO et al., 2008). Esta preocupação estende-se a outras patologias potenciais, particularmente para indivíduos imunossuprimidos ou imunocomprometidos (LAURENCIN; EL-AMIN, 2008). O Brasil, por sua vez, tem um rebanho livre da doença EEB desde 2012 de acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde Animal (FONSECA, 2015; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013).

Processos como lavagens extensivas com água destilada ou solução salina são usados para este propósito. Conforme relatado na literatura, sucessivas lavagens com solução tampão fosfato (PBS) diminuem a concentração de detergentes (CEBOTARI et al., 2010) e, por consequência, reduz a citotoxicidade em enxertos. Embora métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) possam ser empregados para a quantificação de resíduos químicos da descclularização em tecidos que foram modificados, não são amplamente usados devido à sua complexidade técnica e ao custo envolvido.

3.7 Caracterização da matriz extracelular (MEC) descclularizada

Um método de descclularização que mostra a ausência de núcleos e proteínas citoplasmáticas em tecidos descclularizados é geralmente considerado bem-sucedido. No entanto, uma completa avaliação da MEC descclularizada é fundamental para compreender o impacto dos diferentes reagentes na sua integridade estrutural e funcional. Além disso, esta caracterização desempenha um papel fundamental na adequação do tecido ou órgão para posterior recclularização e produção de um tecido funcional (GILPIN; YANG, 2017). Este processo envolve avaliações qualitativas e quantitativas, sobre a integridade biomecânica, da presença de material celular nativo e de fatores de crescimento residuais na MEC. Adicionalmente, o material produzido pode ser avaliado quanto a seu potencial citotóxico *in vitro* e *in vivo* (CEBOTARI et al., 2010; HUSSEIN et al., 2016; NGUYEN; DOAN; TRAN, 2019) ou quanto à sua capacidade de suportar a degradação por colagenase (KARTHIK et al., 2017; LI et al., 2018). A adesão celular à MEC e a organização das proteínas da MEC dependem de várias interações, como interações

proteína-proteína, proteína-lipídio e lipídio-lipídio, sendo as interações proteína-proteína as mais intensas (KAHYA, 2010).

A descelularização pode ser analisada por métodos histológicos simples: a coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) são corantes iônicos que coram os núcleos celulares de azul e as fibras colágenas com tonalidade rosada, tornando possível avaliar a preservação da arquitetura do tecido descelularizado e a perda de células quando comparadas ao tecido nativo; a coloração Tricrômico de Masson cora os núcleos de azul/preto, o citoplasma em vermelho e o colágeno em azul; a conservação dos componentes da elastina e glicosaminoglicanos sulfatados (GAG) podem ser confirmadas por coloração Verhoeff-Van Gieson e *Alcian Blue*, respectivamente. Outros métodos histológicos que coram núcleos também podem ser usados. Além disso, a remoção de componentes citoplasmáticos pode ser determinada por imunohistoquímica usando anticorpos específicos. Coloração para proteínas como actina, vimentina, α -Gal são também utilizadas (MIN et al., 2012; WHITE et al., 2017).

A descelularização nos tecidos é o fator fundamental na enxertia de tecidos ou órgãos heterólogos, pois quaisquer resquícios de compostos imunogênicos podem causar uma resposta imune de alto grau, podendo levar à falência de órgãos (GILPIN; YANG, 2017). Embora não sejam amplamente utilizadas, a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (MEV e MET) de tecidos descelularizados também pode fornecer uma visão mais profunda da presença de células, remanescentes celulares, proteínas citoplasmáticas e organelas (GILBERT; SELLARO; BADYLAK, 2006).

Estas metodologias contribuem para entendermos o efeito dos reagentes químicos na estrutura, auxiliam na compreensão da composição e características da MEC descelularizada, bem como indicam a capacidade que um enxerto tem em favorecer a recelularização após transplantado. Embora todos os métodos de descelularização afetem as proteínas, estrutura e propriedades biomecânicas da MEC, o uso balanceado de detergentes, agentes enzimáticos e métodos físicos podem efetivamente remover células de um tecido, sem grandes alterações na estrutura e arranjo da biomecânica e dos componentes da MEC (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

3.7.1 Concentração de remanescentes nucleares

Moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) foram detectadas por marcadores fluorescentes como o 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) ou Hoechst, que se ligam fortemente a regiões do DNA (EMAMI et al., 2021; SYAZWANI et al., 2015). Métodos para detecção e identificação de partículas infecciosas causadoras de doenças, como príons, incluem técnicas tipo Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e Western Blot (SAKUDO et al., 2011).

Métodos de quantificação da concentração de DNA em amostras são usados na verificação da descclularização. O isolamento do DNA e sua quantificação por métodos espectrofotométricos verificam quantitativamente a eliminação de ácidos nucleicos (GARDIN et al., 2015; GILPIN et al., 2014; HEUSCHKEL et al., 2019) para além da quantificação de núcleos celulares remanescentes no material descclularizado. A dimensão dessas moléculas pode ser estimada executando-se eletroforese em gel de agarose no DNA extraído (LAKER; DOHMEN; SMIT, 2020). Os critérios de Crapo sugerem que tecidos descclularizados que cumpram três requisitos específicos provocam menor reação imunogênica (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

3.7.2 Identificação dos componentes da matriz extracelular

Métodos histológicos baseados em corantes são usados principalmente para quantificar colágeno, elastina e GAG, enquanto fibronectina, laminina e tipos específicos de colágeno são detectados usando coloração para imuno-histoquímica (IHQ). Proteínas da MEC e fatores de crescimento podem ser identificados usando coloração para IHQ (FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010).

3.7.3 Caracterização biomecânica

As propriedades biomecânicas são importantes na avaliação da estrutura remanescente ao tecido, pois o tecido descclularizado que perde suas qualidades biomecânicas pode falhar após transplantado. Em geral, são realizados testes de

compressão, testes de tração uni- e biaxial, testes de pressão pontual até ruptura e teste de retenção de suturas. O tipo de teste escolhido depende do tipo de MEC e da função do órgão, embora todos os testes envolvam a aplicação de forças de diferentes magnitudes, direções e frequências, enquanto se registra o deslocamento ou a eventual falha/rompimento das fibras do tecido. Os resultados são comparados entre o tecido ou órgão tratado e o nativo para determinar se a descelularização causou alterações em suas propriedades mecânicas (MENDOZA-NOVELO et al., 2011).

Nos estiramentos causados em cargas altas no teste de tração x deformação, o conjunto de fibras de colágeno-elastina prevalece na resposta à extensão. Os gráficos obtidos a partir da resposta à tração originam gráficos de aspecto reto e com diferentes inclinações, as quais sugerem o alinhamento entre as fibras e a direção da carga. No tecido estirado, as fibras de colágeno alinhadas na direção da carga tornam-se progressivamente endireitadas e suportam a carga, um processo conhecido como “recrutamento” introduzido pela primeira vez por Wiederhielm (STROMBERG; WIEDERHIELM, 1969; WIEDERHIELM, 1965). A “anisotropia” é identificada nas fibras de colágeno e elastina que apresentam uma distribuição angular não uniforme dentro do tecido e, conseqüentemente, algumas direções são mecanicamente predominantes. O comportamento de transição entre as fases inicial, controlada pela elastina, e a fase final, controlada pelo colágeno, é determinado pela associação mecânica das fibras colágenas às elásticas (ZIOUPOS; BARBENEL, 1994a).

A norma ASTM D1708 padroniza testes a fim de determinar as propriedades tensoriais de amostras elásticas. As propriedades dos materiais elásticos verificadas são a tração, deformação, resistência à tração, tensão de ruptura e deformação de ruptura (RODERJAN et al., 2019). Fabricantes de materiais na área da saúde necessitam preencher requisitos fundamentais em seus produtos para que suportem desgastes de uso a longo prazo, válvulas cardíacas, por exemplo, precisam abrir e fechar, em média, 100.000 vezes por dia para controlar o fluxo de sangue adequado a um adulto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Compromisso ético e responsabilidade científica

Membranas de pericárdio bovino nativo (sacos pericárdicos) foram coletadas em abatedouros certificados pelo Sistema de Inspeção Federal (SIF). As membranas cedidas para a pesquisa faziam parte dos descartes resultantes da linha de produção da empresa parceira, Products and Features Brasil P&D (PFBr). Todos os protocolos de descclularização desenvolvidos para a pesquisa foram aceitos pela empresa parceira. Os procedimentos obedeceram às normas e diretrizes descritas na Portaria Normativa nº 2.600, publicada em 21 de outubro de 2009, e na Resolução ANVISA – RDC nº 625, publicada em 17 de setembro de 2021. A empresa parceira possui certificação ISO 13485:2016, ISO 14971:2019, RDC 16.2013 e MDR 2017/745.

Os reagentes químicos foram manuseados com cuidado e seguindo as boas práticas laboratoriais. Todos os procedimentos de segurança e equipamentos de proteção individual (EPI) necessários foram utilizados ao se trabalhar com produtos químicos. Adicionalmente, nos certificamos de seguir as diretrizes e regulamentos específicos relacionados ao uso e descarte de quaisquer reagentes químicos dentro do laboratório ou em ambiente de análise. Para cobertura das bancadas, campo cirúrgico estéril de cor azul foi providenciado pela empresa PFBr.

4.2 Solução tampão fosfato salino (PBS)

O preparo da solução PBS 1X utilizada durante este projeto envolveu a diluição de quantidades apropriadas de cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), todos os reagentes Sigma-Aldrich, em água destilada ou desmineralizada, na concentração de 152mM e $\text{pH} = 7,42 \pm 0,05$ para 1,0 litro de solução.

- 8,00g NaCl – mm: 58,44 g/mol;
- 0,20g KCl – mm: 74,55 g/mol;
- 1,44g Na_2HPO_4 – mm: 141,96 g/mol;
- 0,24g KH_2PO_4 – mm: 136,09 g/mol;
- Água destilada ou desmineralizada;

4.3 Obtenção, manuseio e descarte do Pericárdio Bovino

O pericárdio bovino nativo foi obtido de um frigorífico certificado (JBS Frigorífico, Promissão, São Paulo, Brasil) dentro de 12 horas após o abate. Os sacos pericárdicos foram extraídos e enxaguados abundantemente com solução tampão fosfato salino (PBS) para eliminar excessos de sangue e fluidos corporais, que, posteriormente, foram armazenados em solução PBS. Os recipientes contendo os sacos pericárdicos imersos em PBS foram transportados para o laboratório acondicionados em caixa de isopor com barras refrigeradas a uma temperatura próxima a 0°C.

Após a chegada do material ao laboratório, os sacos pericárdicos foram dissecados para retirada de gordura e descamação de materiais adjacentes, cuidadosamente com auxílio de pinças. As partes selecionadas do pericárdio possuíam, majoritariamente, espessura uniforme, sendo descartadas regiões com vasculatura ou estriamento excessivo.

Os protocolos de descelularização aplicados às amostras de PB possuíam condições específicas em cada etapa. As variáveis ajustadas durante os protocolos foram: o processo físico aplicado durante o pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento; os reagentes químicos usados no tratamento de descelularização; a solução utilizada para enxágues no pós-tratamento; a concentração dos reagentes em solução; o tempo de duração de cada etapa; a temperatura durante cada etapa.

Os tratamentos físicos disponíveis em nosso laboratório eram de congelamento em freezer biológico, ultrassom e agitação mecânica orbital. Também exploramos os efeitos da interação da matriz extracelular (MEC) com reagentes químicos: Peróxido de Hidrogênio, Hidróxido de Sódio e Detergentes e Surfactantes em diferentes concentrações. Desta forma, concentramo-nos na identificação de métodos eficazes para a remoção de células de tecidos, baseados em técnicas exploradas anteriormente, disponíveis na literatura científica e patentária.

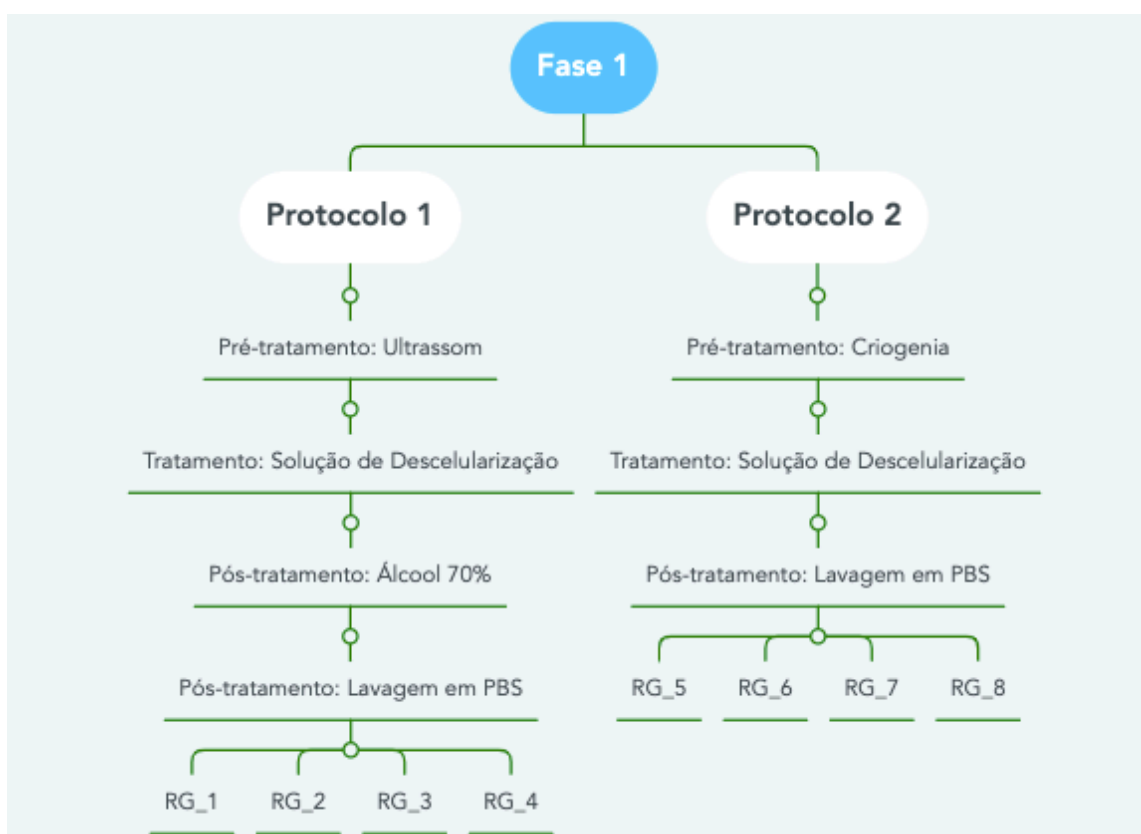
As soluções de descelularização escolhidas na etapa de Tratamento distinguiu as amostras ao final de cada protocolo. O Quadro 4, Quadro 5 e Quadro 6 detalham as soluções utilizadas em cada protocolo e o nome dos grupos.

A fim de se garantir o cumprimento das normas sanitárias e descarte apropriado dos biomateriais doados pela empresa Products and Features Brasil, ao final dos protocolos aplicados ao PB, as membranas, os recortes de membranas e amostras tratadas pelos protocolos de descelularização foram descartados usando o mesmo procedimento: ao final dos testes os tecidos foram guardados em sacolas brancas, identificados como “material de descarte” e entregues diretamente ao setor responsável pela fase de triagem e descartes de matéria-prima na empresa PFB.

4.4 Fase 1

Na separação inicial de amostras, as regiões selecionadas para caracterização de amostras dos dois protocolos possuíam espessura majoritariamente uniforme e inferior a 500 μm . Os recortes de PB separados da membrana nativa – com auxílio de instrumentos que foram devidamente esterilizados, como bisturi, pinças, bandeja plástica e placa de vidro – em formato retangular de 15 x 50 mm foram destinadas aos testes de tração e em quadrados de aproximadamente 10 x 10 mm foram destinadas à histologia e microscopia eletrônica de varredura.

Figura 8 - Fluxograma da Fase 1 do projeto de descclularização do PB



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A primeira fase do projeto, teve caráter exploratório, sobre a resposta do PB a diferentes abordagens físico-químicas de tratamentos de descclularização aplicados a tecidos e órgãos que a literatura científica se aprofundou nas últimas décadas (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). A Figura 8 esquematiza os Protocolos 1 e 2 aplicados ao PB durante a Fase 1 do projeto

4.4.1 Protocolos de descelularização

(Protocolo 1) As três etapas realizadas são detalhadas a seguir:

1. **Pré-tratamento:** Frascos plásticos contendo amostras de PB imersas em PBS foram posicionados dentro da cuba ultrassônica (RCHISTO, Barueri, Brasil) com água e submetidos ao pré-tratamento com ondas ultrassônicas por 1 hora.
2. **Tratamento:** Os frascos contendo amostras foram removidos da cuba ultrassônica e a solução PBS descartada. Em seguida, os frascos contendo amostras foram preenchidos com as soluções de descelularização definidas no Quadro 4 e posicionados sobre a plataforma do agitador orbital VDRL Kline (MYLABOR, São Paulo, Brasil). As amostras foram submetidas à agitação orbital a 100 rpm por 24 horas a 12°C. Exclusivamente, as amostras do grupo RG_3 passaram por uma troca de solução no intervalo de 12 horas após o início do tratamento de descelularização.
3. **Pós-tratamento:** Os frascos, contendo as amostras, foram submetidos a um processo de enxágue em álcool 70% por 24 horas, sob agitação e temperatura nas mesmas condições da fase de descelularização. Em seguida, o álcool foi drenado e as amostras passaram por enxágue em solução PBS por 96 horas.

Amostra Controle (RG_C): Pericárdio bovino nativo, sem tratamento.

Quadro 4 – Referência para amostras do Protocolo 1

Protocolo	Solução de descelularização	Tempo (h)	Nome do Grupo
<i>I</i>	SD 0,1% (PBS)	24	RG_1
	SD 0,1% (Água)	24	RG_2
	1) NaOH 0,1M	1) 12	RG_3
	2) H ₂ O ₂ 5,0%	2) 12	
	SDS 0,1% + EDTA 1,0%	24	RG_4

(**Protocolo 2**) As três etapas realizadas são detalhadas a seguir:

1. Pré-tratamento: Tubos criogênicos contendo em seu interior amostras de PB, individualmente acondicionadas, foram submetidos a um congelamento em freezer biológico à temperatura de -80°C por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para a bancada em temperatura ambiente de 20°C até o completo descongelamento.
2. Tratamento: Cada amostra foi imersa aleatoriamente em um frasco correspondente a um grupo de amostras, com a solução definida no Quadro 5. Os frascos contendo amostras em solução foram submetidos à agitação orbital a 100 rpm por 24 horas a 25°C.
3. Pós-tratamento: As soluções contidas nos frascos foram drenadas e as membranas foram submetidas ao processo de lavagem em solução PBS por 48 horas. Esta etapa ocorreu sob agitação e temperatura nas mesmas condições da fase de descelularização.

Amostra Controle (RG_CFT): Pericárdio bovino nativo, após tratamento de congelamento-descongelamento (*freeze-thaw*).

Quadro 5 – Referência para amostras do Protocolo 2

Protocolo	Solução de descelularização	Tempo (h)	Nome do Grupo
2	SD 1,0%	24	RG_5
	SD 0,1%	24	RG_6
	SDS 1,0%	24	RG_7
	SDS 0,1%	24	RG_8

4.4.2 Caracterização da matriz extracelular (MEC)

4.4.2.1 Histologia

Amostras de PB (**Protocolos 1 e 2**) nativo e descelularizadas foram fixadas em formaldeído tamponado 10% (Alkimia, Campinas, Brasil) imediatamente após o término dos tratamentos de descelularização. Fragmentos das amostras foram desidratados em escalas crescentes de álcool, em seguida em Xilol, e montadas em parafinas para seccionamento em micrótomo com espessura selecionada de 5µm. As lâminas histológicas foram processadas com coloração H&E e as imagens obtidas por microscópio óptico 0400S (Opticam, São Paulo, Brasil) em ampliação 100X e 400X pelo laboratório de patologia “Pat Animal – Laboratório de Patologia Veterinária” de São José do Rio Preto – SP, sob supervisão da Dra. Daniela Farias da Nóbrega.

4.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

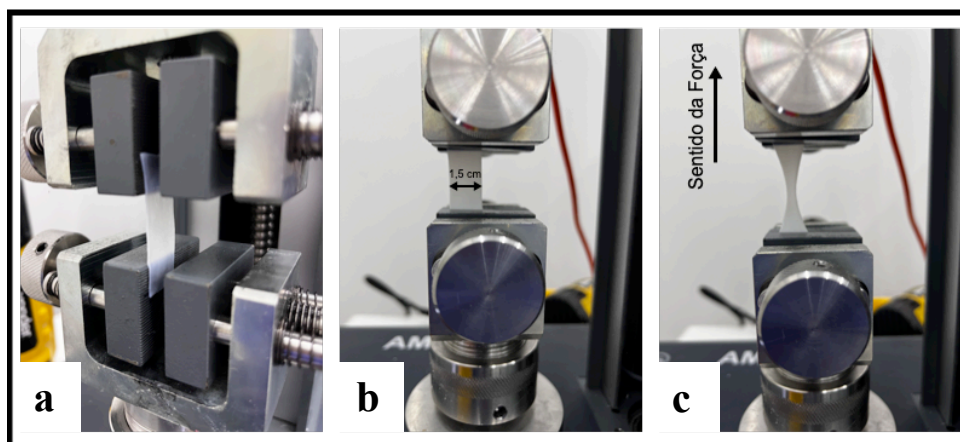
Amostras de PB (**Protocolos 1 e 2**) nativo e descelularizadas foram fixadas em formaldeído tamponado 10% imediatamente após o término dos tratamentos de descelularização. As amostras foram desidratadas em escala crescente de álcool e mantidas em ambiente com sílica por 12 horas. Em seguida, fragmentos das amostras nativas e tratadas foram expostas à metalização com ouro em ambos os lados, liso e rugoso. As amostras foram observadas no microscópio modelo JSM-7500F (JEOL, Akishima, Japão), no Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da UNESP Araraquara.

4.4.2.3 Ensaio biomecânico

Amostras de PB (**Protocolo 1**) nativo e descelularizadas foram deformadas até rompimento (Figura 9) em uma máquina de ensaios de tração AME-2kN. O teste seguiu procedimentos descritos por Mendoza *et al.* Brevemente, amostras do grupo controle e amostras submetidas aos diferentes tratamentos foram presas às garras do equipamento com distância de 20mm e condicionadas a um procedimento de carga até a falha com taxa de subida de 50 mm/minuto.

A partir dos dados fornecidos pelo sensor do extensômetro, os valores de força, força máxima suportada e os alongamentos dos corpos de prova foram transmitidos ao software DynaView e exportados para o Microsoft Excel (Figura 10) para o cálculo do módulo de Young (E), definido como a inclinação da região linear da curva tração x deformação. Os testes biomecânicos foram realizados na empresa parceira, Products and Features Brasil P&D, localizada no Parque Tecnológico em São José do Rio Preto.

Figura 9 – Ensaio de tração x deformação. Imagens representativas do ensaio biomecânico de tração x deformação em amostra de PB. (a) As extremidades da amostra foram presas nas garras do equipamento; (b) configuração ao início do teste com indicação da espessura 1,5 cm; (c) fim do teste

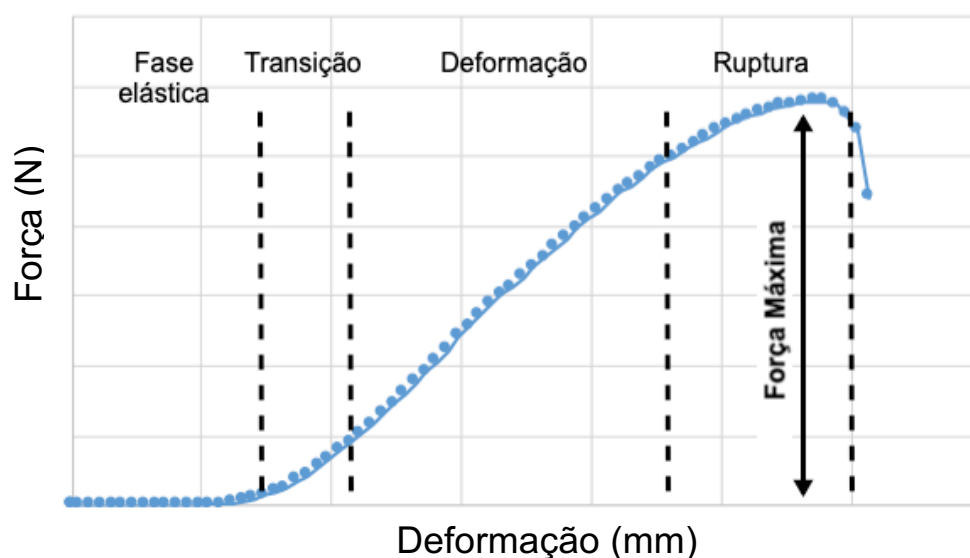


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O Módulo de Young (E) e a Tração de Ruptura (UTS) foram calculados a partir dos dados de uma série de 10 amostras de cada grupo. Aproximadamente 60% dos

dados da curva foram utilizados para calcular o Módulo de Young, ignorando-se as fases elástica, de transição e de ruptura da membrana (JOYCE; ROCHEV; RAHMANI, 2019). Com o intuito de se minimizar a influência da degradação natural, foram utilizados para os testes tecidos nativos recém-obtidos, como amostras controle, e *scaffolds* recém-tratados. A espessura média dos corpos de prova foi determinada medindo-se três pontos, igualmente espaçados por 5 mm, na porção central usando um medidor de espessura Mitutoyo 7301 (Mitutoyo, Osaka, Japão) e auxílio de um “gabarito” acrílico para este fim, e assim calculada a área (A_0).

Figura 10 – Gráfico gerado no Microsoft Excel a partir dos dados de Força e Deformação aplicados à uma membrana elástica de pericárdio bovino e fornecidos pelo extensômetro do equipamento. O gráfico ilustra as fases do estiramento de um corpo de prova: fase elástica, transição, fase de deformação e ruptura



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O critério de término do teste foi predefinido no software quando a ruptura fosse identificada. Para determinação do Módulo E, usamos a Lei de Hooke de forma simplificada/linear em seções em que cada conjunto de dados discretos pode ser transformado em um sistema de equações lineares (1), (2), (3) e (4):

$$\varepsilon_x = \frac{\Delta l_x}{l_{x0}} \quad (1)$$

$$\sigma_x = \frac{F_x}{A_{x0}} \quad (2)$$

$$E_x = \frac{\sigma_x}{\varepsilon_x} \quad (3)$$

$$\begin{bmatrix} \sigma_{x1} \\ \sigma_{x2} \\ \sigma_{x3} \\ \vdots \\ \sigma_{xi} \end{bmatrix} = E_x \cdot \begin{bmatrix} \varepsilon_{x1} \\ \varepsilon_{x2} \\ \varepsilon_{x3} \\ \vdots \\ \varepsilon_{xi} \end{bmatrix} \quad (4)$$

Em que l_{x0} é o comprimento da membrana na direção axial x (mm); Δl_{x0} é a variação do comprimento na direção x (mm); F_x é a Força na direção x (N); A_{x0} é a área da seção (mm²); ε_x é a Tração na direção x (N/mm² = MPa); E_x é o módulo de Young na direção x (MPa), sendo calculado pelo coeficiente angular da curva na fase de deformação.

A orientação entre o sentido da força aplicada (ver Figura 9c) e o sentido majoritário das fibras de colágeno dá origem a tomadas de dados com particularidades nos gráficos de tração x deformação para cada amostra (ZIOUPOS; BARBENEL, 1994a). Não é possível caracterizar a olho nu a orientação entre as fibras colagênicas e o sentido da aplicação da força, no entanto, os gráficos de tração x deformação apresentam padrões que permitem definir este sentido (ZIOUPOS; BARBENEL, 1994b). Gráficos que apresentam maior inclinação e picos acentuados no momento do rompimento representam variações entre 0-30° entre a orientação das fibras e o sentido da força (orientação longitudinal), e os gráficos com baixa inclinação e sem pico definido representam variações entre 70-90° (orientação transversal). Para a análise da Resistência à tração e para o cálculo do módulo de Young das amostras do Protocolo 1, optou-se por utilizar as tomadas de dados dos gráficos que apresentavam um formato do tipo “longitudinal”. Os testes de tração não seguiram a norma internacional ASTM 1708-13 a qual padroniza testes de tração x deformação para materiais plásticos, devido a limitações na etapa de preparação e corte do corpo de prova em um formato tipo “gravata” específico deste teste.

4.5 Fase 2

A Figura 11 esquematiza o passo-a-passo do Protocolo Único da Fase 2. A segunda fase do projeto foi direcionada à resposta do PB ao tratamento físico-químico de descelularização a fim de se definir uma concentração de detergente desoxicolato de sódio (SD) que cumprisse os requisitos gerais de descelularização de tecidos avaliados neste estudo. As regiões selecionadas para os experimentos de caracterização de amostras do protocolo único possuíam espessura uniforme e inferior a 500 μm . Os recortes de PB destinados a amostras foram separados da membrana nativa – com auxílio de instrumentos que foram devidamente esterilizados, como bisturi, pinças, bandeja plástica e placa de vidro – em formato retangular de 15 x 50 mm, sendo destinadas aos testes de tração, e em quadrados de aproximadamente 10 x 10 mm, sendo destinadas à histologia, microscopia eletrônica de varredura, Citotoxicidade e quantificação do DNA.

Figura 11 – Fluxograma da Fase 2 do projeto de descelularização do PB



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

4.5.1 Protocolo de descelularização

(Protocolo Único) As etapas de descelularização empregadas ao PB nesta fase foram:

1. **Pré-tratamento:** As amostras de PB foram dispostas individualmente dentro de tubos criogênicos sem adição de crioprotetor e imediatamente submetidas a um congelamento rápido em freezer de temperatura -80°C por 12 horas. Posteriormente, elas foram transferidas para um freezer convencional a -20°C por 2 horas. Em seguida, foram mantidas em temperatura ambiente de 20°C até o completo descongelamento.
2. **Tratamento de descelularização:** As amostras foram imersas individualmente, em ordem aleatória, em frascos de vidro correspondentes aos grupos de amostras que continham a solução definida no Quadro 6, e então submetidas à agitação orbital a 120 rpm por 24 horas a 20°C .
3. **Pós-tratamento:** Após o tratamento de descelularização, os frascos contendo as amostras foram submetidos a um processo de enxágue repetitivo em solução salina estéril (NaCl 0,9%, JP Farma) durante 72 horas, por meio da substituição da solução utilizada no tratamento de descelularização, e submetidos à agitação orbital nas mesmas condições da fase de descelularização. Nesta etapa, a solução salina da fase de lavagem foi substituída a cada 24 horas por solução salina estéril refrigerada em geladeira.

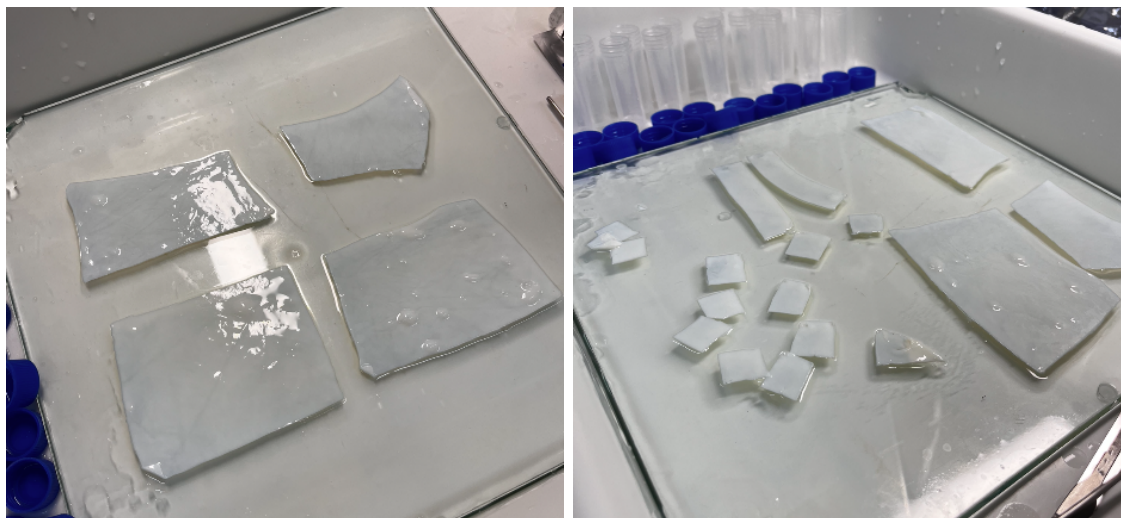
Amostra Controle (NATIVE): Pericárdio bovino nativo, sem tratamento.

Quadro 6 – Referência para amostras do Protocolo Único da Fase 2

Protocolo	Solução de descelularização	Nome do Grupo
<i>Protocolo Único</i>	Água	WATER
	SD 1,00%	SD100
	SD 0,10%	SD010
	SD 0,01%	SD001

Os tratamentos físicos disponíveis em nosso laboratório eram de congelamento em freezer biológico, ultrassom e agitação mecânica orbital. Também exploramos os efeitos da interação da MEC com reagentes químicos: Peróxido de Hidrogênio, Detergentes em diferentes concentrações e Hidróxido de Sódio. Desta forma, concentramo-nos na identificação de métodos eficazes para a remoção de células de tecidos, baseados em técnicas exploradas anteriormente, disponíveis na literatura científica e patentária. A Figura 12 ilustra a etapa de preparação de amostras de PB a partir dos processos descritos. A Figura 13 ilustra a configuração do agitador orbital durante os processos de descelularização e lavagens do PB.

Figura 12 – Obtenção de amostras de Pericárdio Bovino. Imagens representativas do procedimento de recortes de amostras de pericárdio bovino nativo. As amostras foram recortadas com bisturi previamente aos tratamentos de descelularização



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 13 – Interação dos tratamentos físico e químico. Fotografia representativa da montagem experimental da etapa de agitação orbital do material com a solução de descelularização, utilizada em condição semelhante para a etapa de enxágues com solução fisiológica



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

4.5.2 Caracterização da matriz extracelular (MEC)

4.5.2.1 Histologia

As amostras de PB foram fixadas em formaldeído tamponado 10% imediatamente após o término dos tratamentos de descelularização. A amostra controle correspondendo a PB nativo sem tratamento foi armazenada em formaldeído 10% tamponado. Fragmentos das amostras foram desidratados em escalas crescentes de álcool, diafanizadas em Xilol, e montadas em parafinas para seccionamento em micrótomo com espessura selecionada de 5 μ m. As lâminas histológicas foram processadas com coloração H&E e imagens obtidas por microscópio óptico com scanner de lâminas BX61VS slide scanner (Olympus, Toquio, Japão) Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises, Unesp de São José do Rio Preto – SP, sob supervisão do Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga.

4.5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de PB foram fixadas em formaldeído tamponado 10% imediatamente após o término dos tratamentos de descelularização. A amostra controle correspondendo a PB nativo sem tratamento, em formaldeído. As amostras foram desidratadas em escala crescente de álcool (25%; 50%; 75%; 99%; trocadas a cada 30 minutos) e mantidas em ambiente com sílica por 12 horas. As amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio com auxílio de fita de carbono condutora dupla-face e em seguida metalizadas com ouro. As amostras observadas no microscópio Inspect S50 (FEI Company, Oregon, EUA) e no microscópio Magellan 400L (FEI Company, Oregon, EUA), no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar, São Carlos (LCE-DEMa).

4.5.2.3 Extração de DNA e Quantificação

Fragmentos de amostras ($n = 3$) de PB nativo e descelularizado foram desidratadas em presença de sílica-gel e pesadas em balança analítica AUW220D (Shimadzu, Tóquio, Japão). O DNA animal foi extraído com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha). Para determinar a quantidade de DNA, 1,0 μ L do DNA eluído, foi depositado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para se aferir valores de absorbância. Cada leitura de DNA foi realizada em triplicata, com o tampão de eluição aferido como branco. A quantidade de DNA foi calculada com base no peso seco da amostra e expressa em ng/mg. A extração e aquisição de dados aconteceu no Laboratório de Estudos Genômicos, sob supervisão da Profa. Dra. Paula Rahal e Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, Unesp de São José do Rio Preto.

4.5.2.4 Eletroforese em Gel de Agarose

Quantidades iguais a 6 μ l de amostras de DNA foram impregnadas com corante “loading dye” e depositadas em gel de agarose 2,0%. O equipamento foi ajustado em 90V e a corrida no gel teve duração de 40 minutos. Um padrão molecular de DNA (identificado como LAD) foi usado como referência para fragmentos de dimensões entre 100-1500 pares de base (BP). A corrida eletroforética no gel e subsequente leitura sob UV aconteceu no Laboratório de Estudos Genômicos, sob supervisão da Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, Unesp de São José do Rio Preto.

4.5.2.5 Ensaio biomecânico

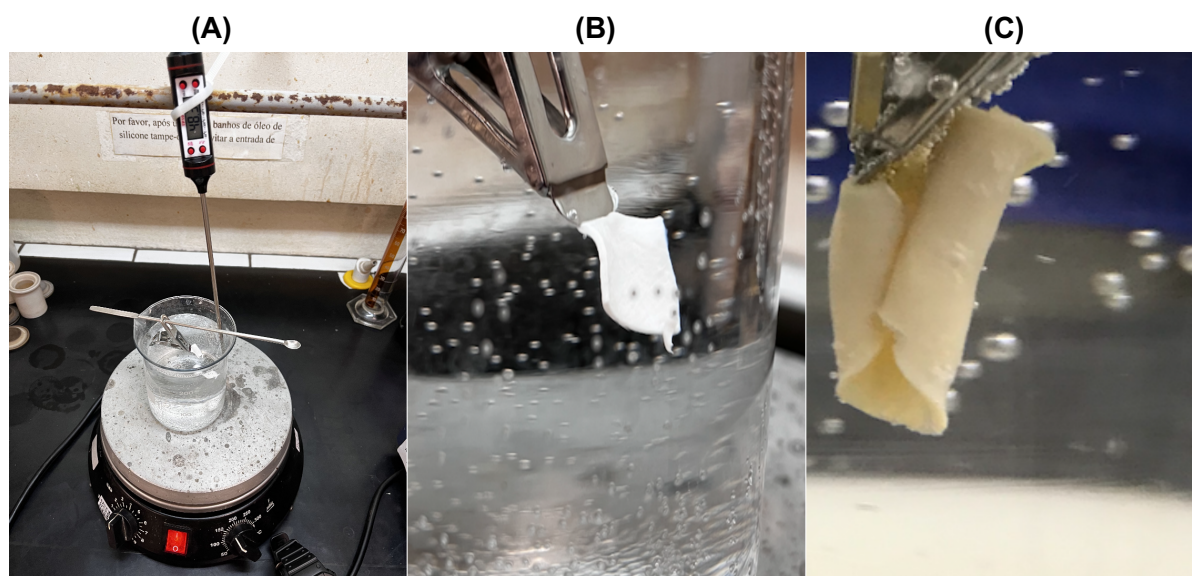
Amostras em formato retangular ($n = 10$) de cada grupo foram tracionados unidimensionalmente até a ruptura a uma taxa de 10 mm/min. As direções longitudinal ($\sim 0^\circ$) e transversal ($\sim 90^\circ$) foram determinadas a partir dos gráficos obtidos para cada amostra. Os testes biomecânicos foram realizados em temperatura ambiente de 20°C, com 10 mm (l_0) entre as pinças. A reação mecânica ao estresse no tecido descelularizado foi avaliada comparando-o com o tecido nativo. Os testes foram realizados na máquina de ensaios de tração AME-2kN (Oswaldo Filizola, São Paulo, Brasil), seguindo a metodologia descrita na literatura (OSWAL et al., 2007). Os dados

obtidos das curvas tração x deformação foram exportados para o Microsoft Excel, em que o módulo de Young (E), a Tração de Ruptura (UTS) e a alongação (TS%) foram quantificados segundo as equações (1), (2) e (3) definidas no item *Ensaaios Biomecânicos* da Fase 1.

4.5.2.6 Transição térmica do Colágeno Tipo I

A temperatura de desnaturação do Colágeno Tipo I proveniente de pele porcina e pericárdio bovino foi reportada em 67°C para ambos os tecidos, através de calorimetria diferencial exploratória (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009). Essa transição corresponde ao processo de gelatinização do colágeno em um ambiente hidratado e é causado pela quebra de ligações internas do tipo *cross-link* natural das fibrilas (BOZEC; ODLYHA, 2011). Um teste para investigação desses efeitos foi realizado para determinar se a proteína do colágeno sofreu desnaturação durante o tratamento. O teste de encurtamento (*shrinkage*), ilustrado na Figura 14, foi realizado para se obter a temperatura de desnaturação (Td). Amostras de cada grupo foram suspensas individualmente por pinças em água deionizada em temperatura ambiente. Aumentando gradualmente a temperatura em 1°C por minuto, a temperatura foi monitorada usando um termômetro e um agitador magnético aquecido até que a temperatura atingisse 70°C ou até que o encolhimento da amostra fosse observado. A transição fez com que as amostras assumissem uma forma de “C”, após o resfriamento, as amostras não retornaram ao tamanho natural, indicando uma mudança de fase na proteína de colágeno (Figura 14c), bem como a saída de moléculas de água da estrutura. Os testes de encurtamento foram realizados no Laboratório do grupo *Laboratory for Clean Energy Technology* (LACET), sob supervisão do Prof. Dr. José Geraldo Nery, Unesp São José do Rio Preto.

Figura 14 – Fotografias de teste de *shrinkage*: (A) montagem experimental; (B) amostra de pericárdio bovino no início do teste; (C) imagem aproximada de amostra de pericárdio bovino após o ponto de transição (Td)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

4.5.2.7 Teste de citotoxicidade in vitro

A citotoxicidade foi avaliada seguindo um método descrito anteriormente (MIRSADRAEE et al., 2006) com pequenas modificações. Fibroblastos NIH/3T3 (ATCC, Virgínia, EUA) foram cultivados em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/poço um dia antes do experimento. Para avaliar a viabilidade celular, foi utilizado o kit comercial CellTiter96® AQueous One Solution (Promega Corporation, Massachussetts, EUA). Este kit contém uma mistura de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS) e etossulfato de fenazina (PES). Para obter extratos de tecidos, 5 mg de tecidos recém-preparados foram incubados em 1 mL de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado com antibióticos por 72 horas a 37 °C sob agitação orbital (aproximadamente 100 rpm). Para o controle, o DMEM-antibiótico sem tecido (apenas o solvente) foi mantido nas condições aplicadas para a obtenção dos extratos. Em seguida, o meio de crescimento de fibroblastos foi substituído por diferentes concentrações de extratos de tecido (10 a 80%, v/v), que foram obtidos pela diluição do extrato em meio DMEM-antibiótico fresco. Após 24 h de incubação a 37 °C, o meio foi removido e 100 μ L de DMEM juntamente com 20 μ L de solução comercial

MTS/PES foram adicionados às células. Após um período de incubação de 3 horas, a absorbância dos poços foi medida a 490 nm utilizando o leitor de microplacas ELx808 (BioTek Instruments, Vermont, EUA). A citotoxicidade das amostras tratadas foi expressa em termos de viabilidade celular em relação às células tratadas apenas com antibióticos em meio DMEM (solvente; 100% de viabilidade celular). Os extratos foram preparados em triplicata e cada leitura foi realizada em dois poços diferentes, resultando em um total de seis medidas colorimétricas para cada grupo em diferentes concentrações. Os testes de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Estudos em Ciências Ambientais, sob supervisão do Prof. Dr. Marcio Tiera, Unesp de São José do Rio Preto.

4.5.2.8 Análise Estatística

Os dados obtidos nos experimentos realizados na Fase 2 deste projeto foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão e as diferenças foram analisadas por ANOVA duas vias (efeito dos protocolos de descelularização em diferentes concentrações) com pós-teste de Dunnett, usando o software GraphPad Prism 10. Para diferenças significativas em relação à amostra controle, foi considerado o nível de significância 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso na utilização de xenoenxertos de pericárdio bovino depende da minimização da presença de DNA endógeno somada à preservação da estrutura orgânica e da composição bioquímica. Sabe-se que o uso de enzimas na descclularização facilita a quebra do DNA e melhora a descclularização, atingindo níveis mínimos, em alguns casos. O objetivo da descclularização é, portanto, maximizar a remoção de células e debris celulares e, ao mesmo tempo, minimizar alterações nas propriedades nativas da matriz extracelular (MEC) durante o tratamento. Um protocolo de descclularização bem-sucedido, otimizado e de baixo custo para reparos teciduais por meio da enxertia seria um grande avanço no campo da Engenharia de Tecidos.

Atualmente, não existe um método amplamente aceito para avaliar a extensão da descclularização. Isto se deve em grande parte ao fato de que a densidade celular, a composição e a rigidez da MEC são diferentes de um tecido para outro e, portanto, os métodos e técnicas de descclularização devem ser especificamente adaptados ao tecido de interesse (MENDIBIL et al., 2020). Contudo, o grupo de Crapo sugere que as seguintes características definem um material totalmente descclularizado e com baixo risco de rejeição:

1. Menos de 50 ng de DNA de fita dupla por mg de peso seco de MEC.
2. Nenhum material nuclear visível nas secções de tecido após coloração com DAPI e/ou H&E.
3. Comprimento do fragmento de DNA inferior a 200 pares de bases.

Neste estudo, durante a Fase 1, voltamos nossos esforços ao segundo critério, realizando a avaliação qualitativa da remoção de núcleos em lâminas com coloração H&E em pericárdio bovino (PB) após aplicação dos protocolos 1 e 2, com as soluções descritas no Quadro 4 e Quadro 5. Durante a Fase 2, realizamos análises do PB de acordo com todos os critérios, com o objetivo de identificar a condição ideal para o tratamento de descclularização com desoxicolato de sódio (SD) (Quadro 6).

Ao todo, doze tratamentos diferentes para PB foram utilizados para investigar a resposta específica para diferentes pré-tratamentos, diferentes reagentes químicos

e concentrações do detergente aniônico SD, que variaram entre 1,00%, 0,10% e 0,01%, por 24 horas. Não utilizamos enzimas ou quaisquer agentes biológicos, como antibióticos ou inibidores de protease neste estudo. Desta forma, os protocolos desenvolvidos em ambas as fases deste projeto podem ser classificados como **Protocolo Físico-Químico de Descelularização**.

5.1 Fase 1

Os estudos da descclularização do PB foram iniciados na prática laboratorial a partir da exploração das técnicas físicas e químicas disponíveis, instalações físicas e de equipamentos, bem como a aquisição de materiais de E.P.I., luvas, máscaras, touca e demais instrumentações necessárias para se trabalhar com biomateriais. A investigação dos tratamentos de descclularização ocorreu na forma de *screening*, no sentido de identificarmos as dificuldades e desafios na produção de *scaffolds*.

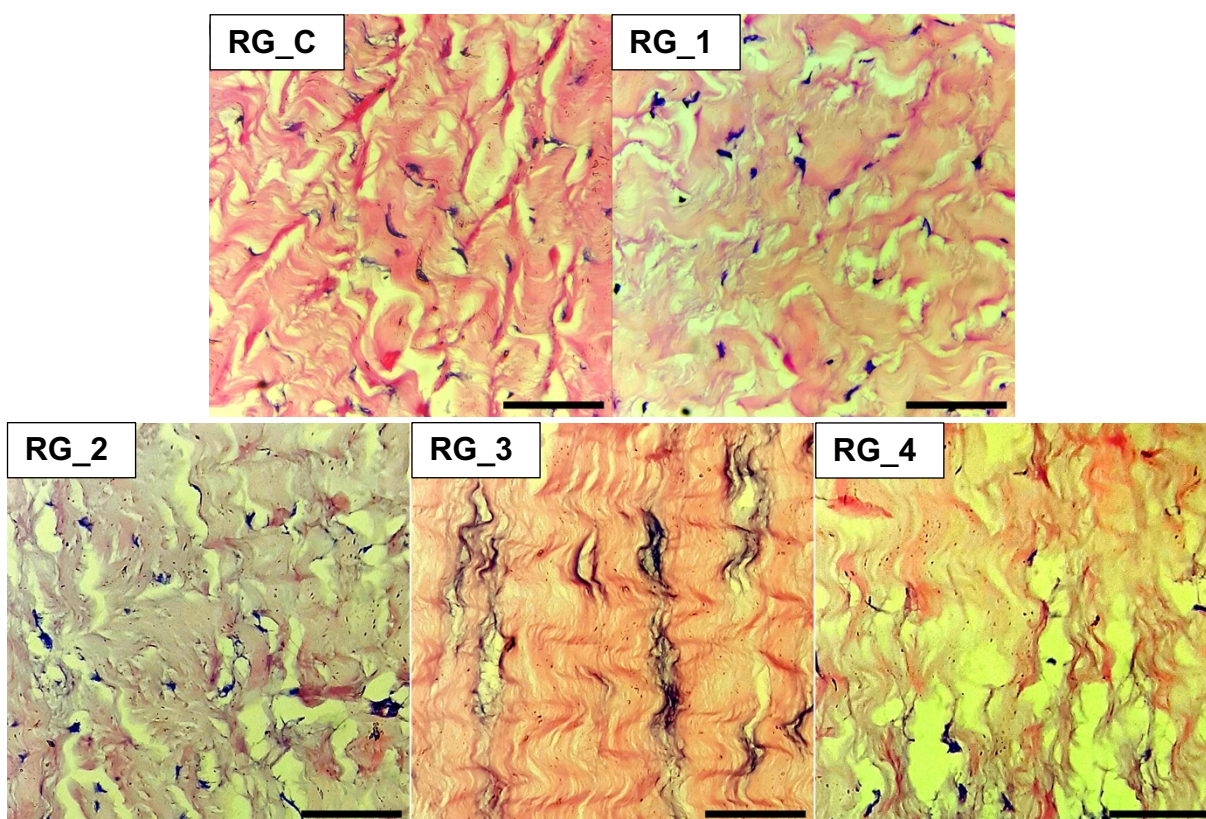
O pericárdio bovino em sua forma nativa é uma membrana de aspecto flácido, de cor bege-claro, com tamanho entre 500 e 800 cm² e espessura entre 100 e 1000 µm. O pericárdio, devido ao colágeno que majoritariamente compõe o tecido, oferece grande resistência ao esticamento. É possível a identificação dos lados liso e rugoso do PB a olho nu, quando a membrana se encontra sob forte iluminação, devido a uma maior ocorrência de estriamentos e descamações na superfície rugosa.

Histologia – Protocolo 1: A micrografia da amostra controle (RG_C) apresenta núcleos intactos e uma conformação da MEC com padrão ondulado, identificado como as fibras colagênicas. As amostras que passaram por banho ultrassônico, seguido de agitação em reagentes químicos (RG_1, RG_2, RG_3, RG_4) apresentam baixa descclularização, sendo possível a identificação de núcleos celulares intactos nas amostras RG_1 e RG_2, enquanto as amostras RG_3 e RG_4 possuíam menos núcleos intactos, sendo possível identificar remanescentes nucleares, em azul, que aparentam estar aderidas ao colágeno (Figura 15).

Histologia – Protocolo 2: A micrografia da amostra controle (R_CFT) apresenta núcleos, embora tenha sido possível identificar o rompimento da membrana celular e poucos danos à MEC do pericárdio bovino. As amostras que passaram por tratamentos com detergentes (RG_5, RG_6, RG_8) apresentaram descclularização acentuada, no entanto a eliminação de material celular da amostra RG_5 foi dificultada. A micrografia da amostra RG_7 indica danos à MEC, como a ausência do padrão ondulado da MEC e presença de remanescentes nucleares na matriz (Figura 16).

Figura 15 – Histologia com coloração H&E (Protocolo 1). Lâminas histológicas do material PB após protocolos de descelularização com pré-tratamento em banho ultrassônico seguido de tratamento de agitação por 24 horas em solução de: (RG_1) SD 0,1% em PBS; (RG_2) SD 0,1% em Água; (RG_3) NaOH 0,1M por 12h e H₂O₂ 5% por 12h; (RG_4) SDS 0,1% + EDTA 1,0%. Pós-tratamento de agitação em álcool 70% por 24h seguido de agitação em PBS por 96h para todas as amostras. Amostra RG_C consiste em PB nativo

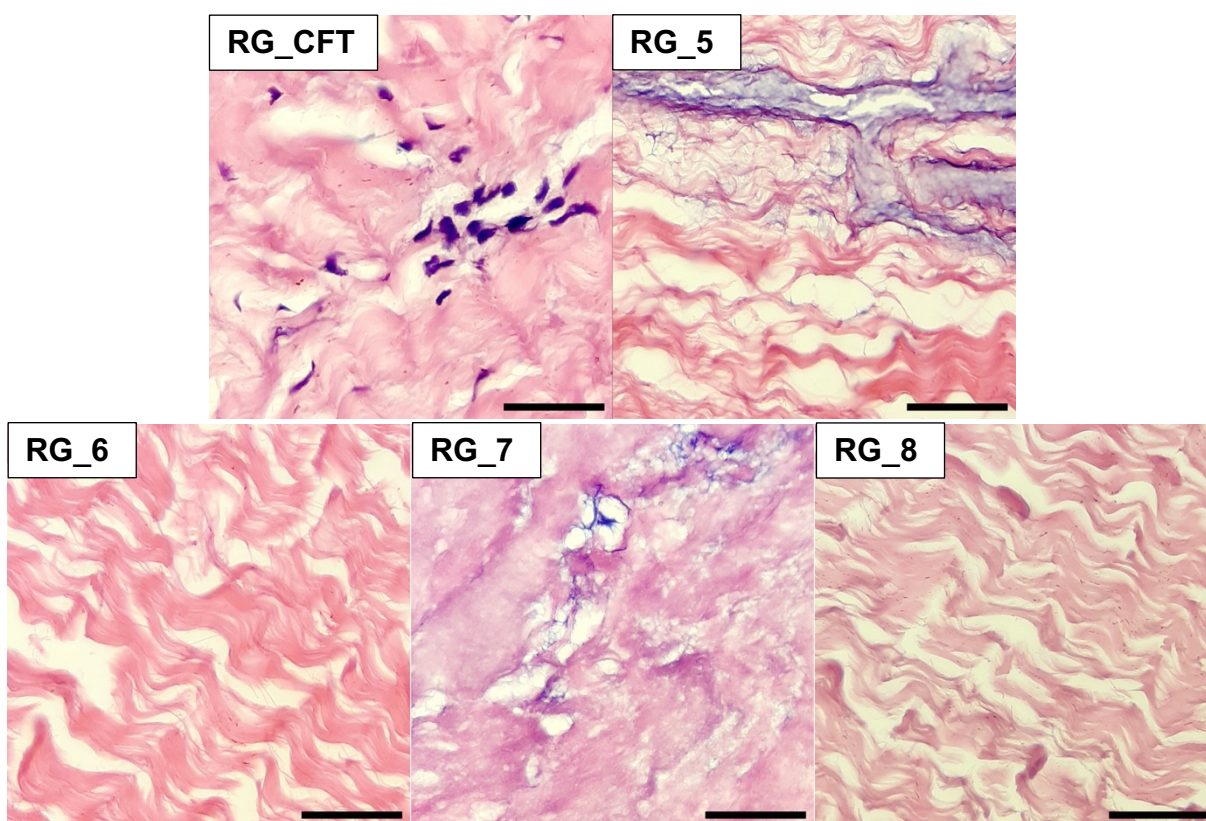
Barra: 50 µm



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Figura 16 – Histologia com coloração H&E (Protocolo 2). Lâminas histológicas do material PB após protocolos de descelularização com pré-tratamento de congelamento por 72 horas seguido de tratamento de agitação em solução de: (RG_5) SD 1,0%; (RG_6) SD 0,1%; (RG_7) SDS 1,0%; (RG_8) SDS 0,1%. Pós-tratamento de agitação em PBS por 48h para todas as amostras. Amostra RG_CFT consiste em PB nativo após congelamento e descongelamento

Barra: 50 μ m



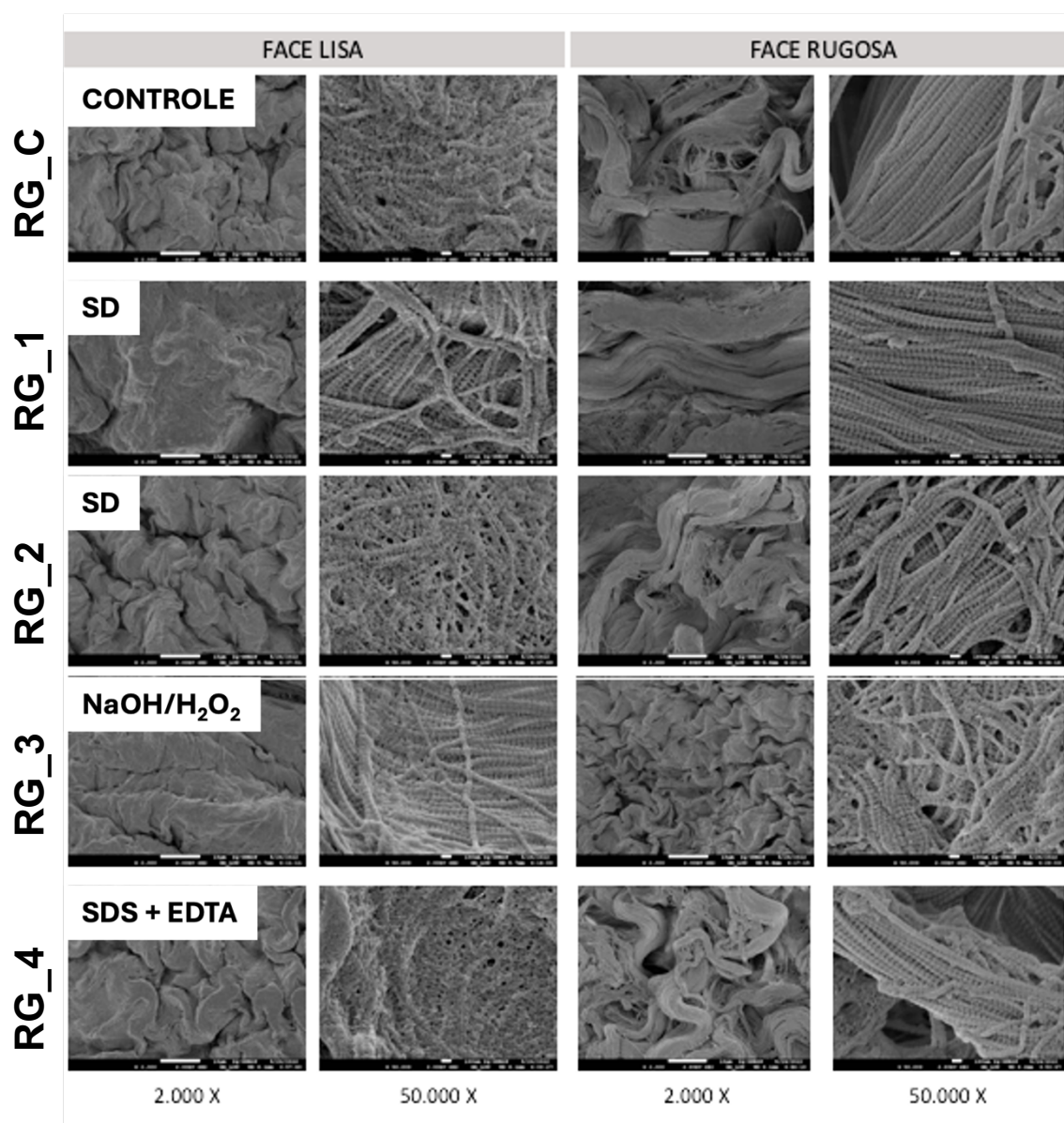
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A análise histológica indicou ineficiência no Protocolo 1 em provocar a lise celular, e sobretudo, que a etapa de pós-tratamento, com álcool 70% e a subsequente lavagem das membranas com PBS por 96 horas não foram suficientes para remover material celular preso à matriz. O Protocolo 2 mostrou dois resultados de maior eficiência na remoção de células da matriz, somado à preservação das fibras colagênicas em uma configuração semelhante à amostra de PB nativo sem tratamento. O tratamento de descelularização da amostra RG_7 causou danos irreversíveis, possivelmente relacionados à concentração de SDS em 1,0%, que causou danos irreversíveis ao colágeno (Figura 16).

Em relação às amostras do Protocolo 2, a aplicação de diversos tratamentos às matrizes de colágeno permitiu avaliar a eficácia dos protocolos de descelularização que empregavam métodos físicos e químicos em busca de uma sintonia entre a eficiente remoção de material celular adicionada à preservação da MEC em toda extensão. Os detergentes que obtiveram os melhores resultados foram o desoxicolato de sódio (SD) e o dodecil sulfato de sódio (SDS). Em destaque, o método de congelamento-descongelamento seguido pelo uso de detergentes de baixa concentração (0,1% SD e 0,1% SDS) demonstrou resultados notáveis, que acarretaram uma descelularização de maior alcance no Pericárdio Bovino, quando comparadas às soluções dos mesmos detergentes usadas em concentrações mais altas (1,0% SD e 1,0% SDS).

Microscopia Eletrônica de Varredura – Protocolo 1: O tecido tratado por qualquer um dos protocolos de descelularização manteve a densa rede de colágeno observada no tecido nativo. Na superfície lisa, interna, há maior orientação das fibras. Na superfície rugosa, face externa, as fibras de colágeno apresentam-se orientadas aleatoriamente e empilhadas em camadas. Não foi possível identificar danos às fibras através dos tratamentos empregados (Figura 17).

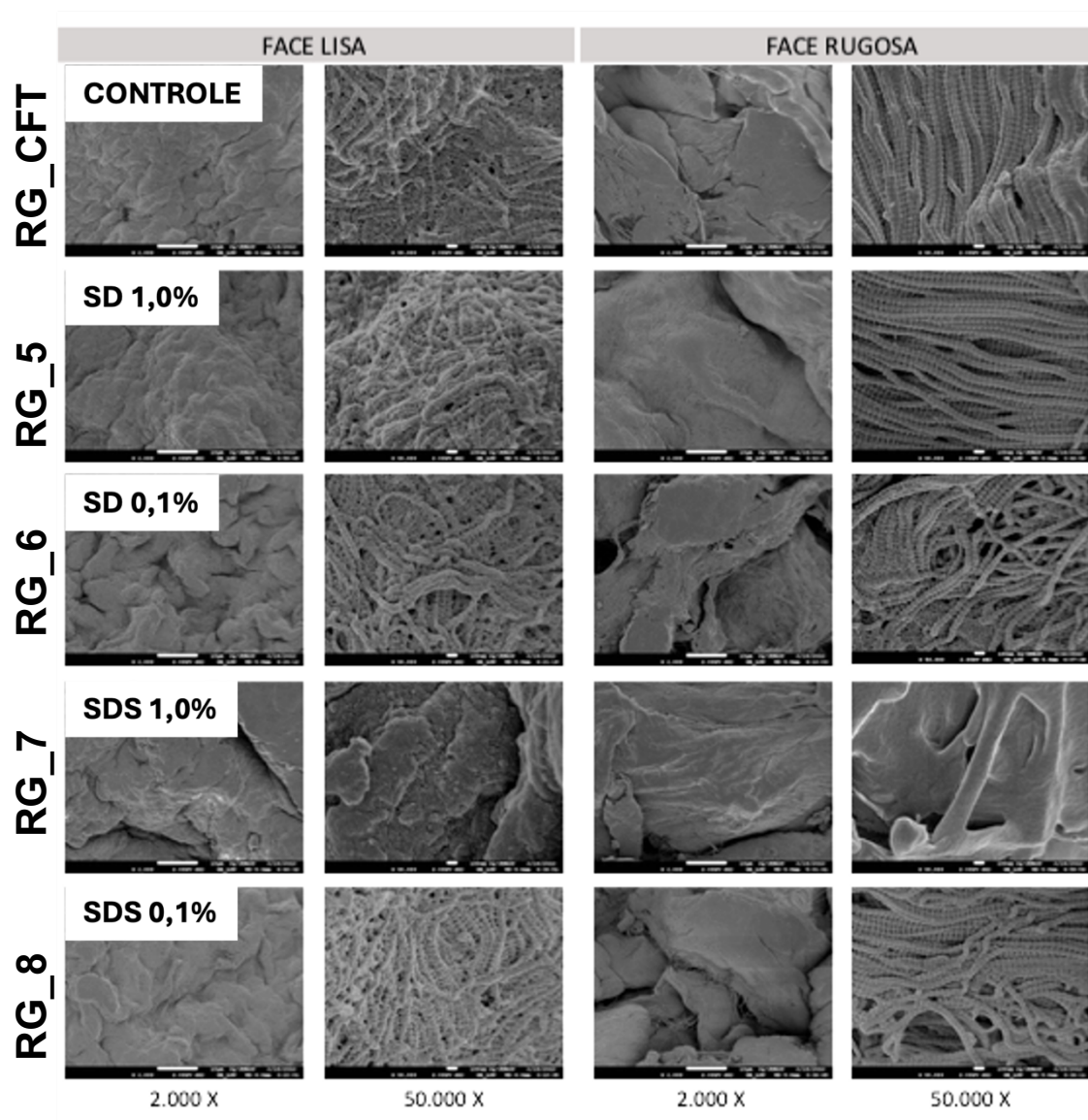
Figura 17 – Micrografias representativas das superfícies lisa e rugosa do Pericárdio Bovino em ampliações 2.000X e 50.000X (Protocolo 1)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Microscopia Eletrônica de Varredura – Protocolo 2: Na análise de MEV (Figura 18), o padrão fibrilar se manteve na maioria das amostras. Por esta técnica, foi possível identificar a deformação das fibras da amostra RG_7.

Figura 18 – Micrografias representativas das superfícies lisa e rugosa do Pericárdio Bovino em ampliações 2.000X e 50.000X (Protocolo 2)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

As imagens de MEV e histologia da amostra RG_7 evidenciaram danos irreversíveis às fibras da MEC, causada pela interação com detergente SDS em concentração de 1,0%, em contraste, a amostra que passou por tratamento com detergente SDS de concentração 10 vezes menor, não apresentou os mesmos danos (Figura 18). A análise por MEV revelou que a maioria dos tratamentos empregados às amostras não causaram maiores alterações na estrutura fibrosa, sendo possível notar a presença de cavidades ou a formação da estrutura tipo *scaffold*.

Determinação do Módulo de Young – Protocolo 1: Os resultados para Módulo de Young e Resistência à Tração estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Módulo de Young e Tração de Ruptura. Valores apresentados como média \pm desv. pad.

Grupo	Módulo de Young (MPa)	Tração de Ruptura (MPa)
RG_C	31,37 \pm 7,27	17,00 \pm 4,05
RG_1	28,09 \pm 10,28	14,89 \pm 6,78
RG_2	40,45 \pm 1,20	14,57 \pm 3,41
RG_3	32,10 \pm 0,85	11,10 \pm 2,3
RG_4	42,26 \pm 1,94	12,81 \pm 3,01

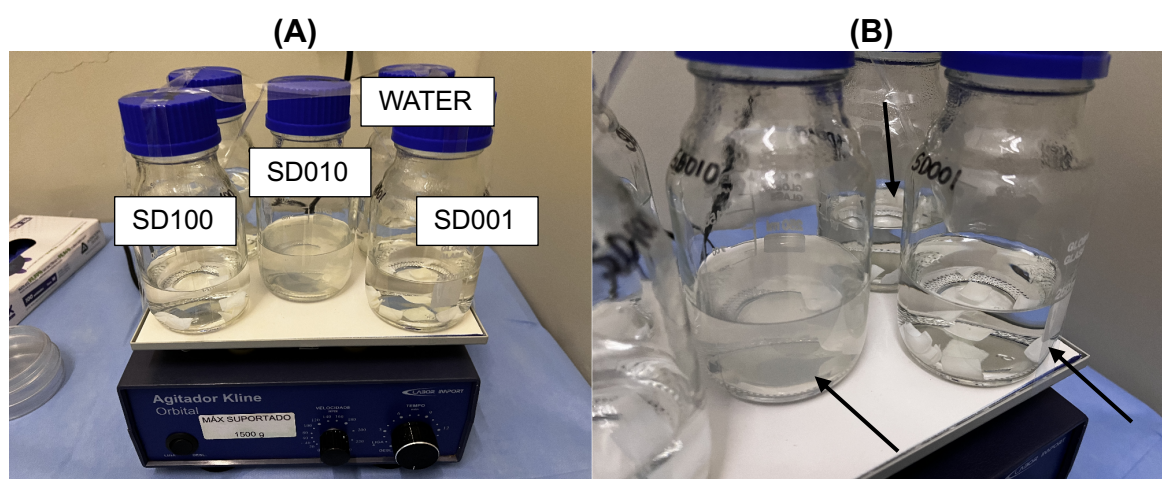
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Os testes de tração x deformação foram realizados apenas em amostras do Protocolo 1. Os resultados para estes parâmetros foram limitados à coleta de dados relacionados a estiramentos longitudinais, ou seja, quando a orientação preferencial das fibras se dava de sentido majoritariamente paralelo à aplicação da força de tração na máquina. Logo, dados de estiramentos longitudinais foram usados no cálculo dos parâmetros, em todos os grupos, sendo selecionados os gráficos com picos aparentes, indicando também o valor da Força Máxima suportada pelo material no respectivo teste e descartados gráficos com padrão de “escoamento”.

5.2 Fase 2

A eficácia do método combinado de descclularização proposto nesta fase foi avaliada. Curiosamente, após a agitação com detergente, foi observada uma solução mais turva no reservatório contendo o grupo SD010 (Figura 19). Em contrapartida, o *pool* contendo amostras de outros grupos permaneceu transparente. A fase de limpeza foi realizada em solução salina estéril. Com base no estudo de Cebotari *et al.*, foram estabelecidas três lavagens em solução salina, trocando a solução a cada 24 horas, o que influenciou de modo eficiente na eliminação do material celular do tecido.

Figura 19 – Fotografias: (A) configuração da fase de descclularização dos tecidos após 24 horas de interação com as soluções de descclularização apresentadas na imagem; (B) imagem aproximada do reservatório dos grupos de descclularização WATER, SD010 e SD001. As setas destacam o aspecto das soluções



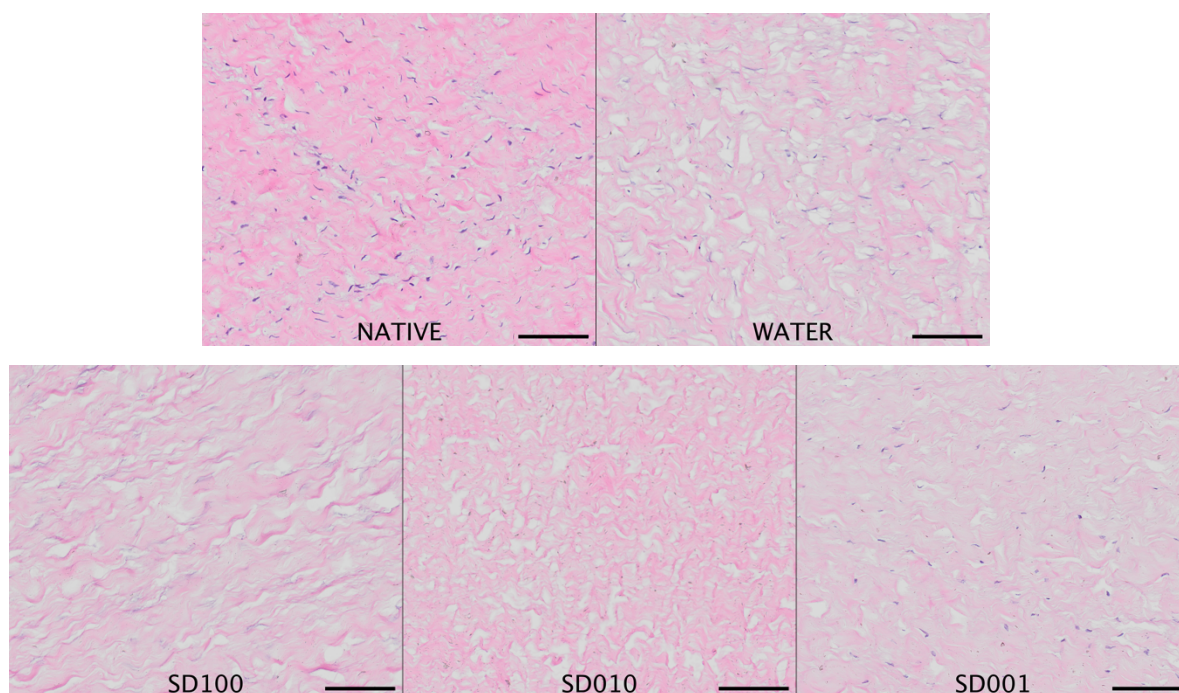
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Histologia: A Figura 20 ilustra o material nuclear e a conformação natural das fibras colagênicas da amostra NATIVE. As amostras SD100 e SD010, que passaram por tratamento com detergente SD 1,00% e SD 0,10%, não apresentam núcleos intactos em grande extensão, sendo identificados núcleos fracamente corados, azul claro. As amostras WATER e SD001 revelam núcleos após os tratamentos, indicando menor eficiência na descclularização do pericárdio bovino. As imagens reveladas pela análise histológica indicam diminuição na contagem de células para todos os protocolos de descclularização.

Figura 20 – Histopatologia do pericárdio bovino. Imagens representativas de fragmentos de amostras de pericárdio bovino sob coloração HE ampliadas em 400X.

PB descelarizado com pré-tratamento de congelamento-descongelamento, seguido de agitação por 24 horas em água pura (WATER), SD 1,00% (SD100); SD 0,10% (SD010), SD 0,01% (SD001) e amostra de PB nativo (NATIVE). O protocolo SD010 indicou preservação do padrão fibroso de colágeno e ausência de núcleos celulares, observados em azul

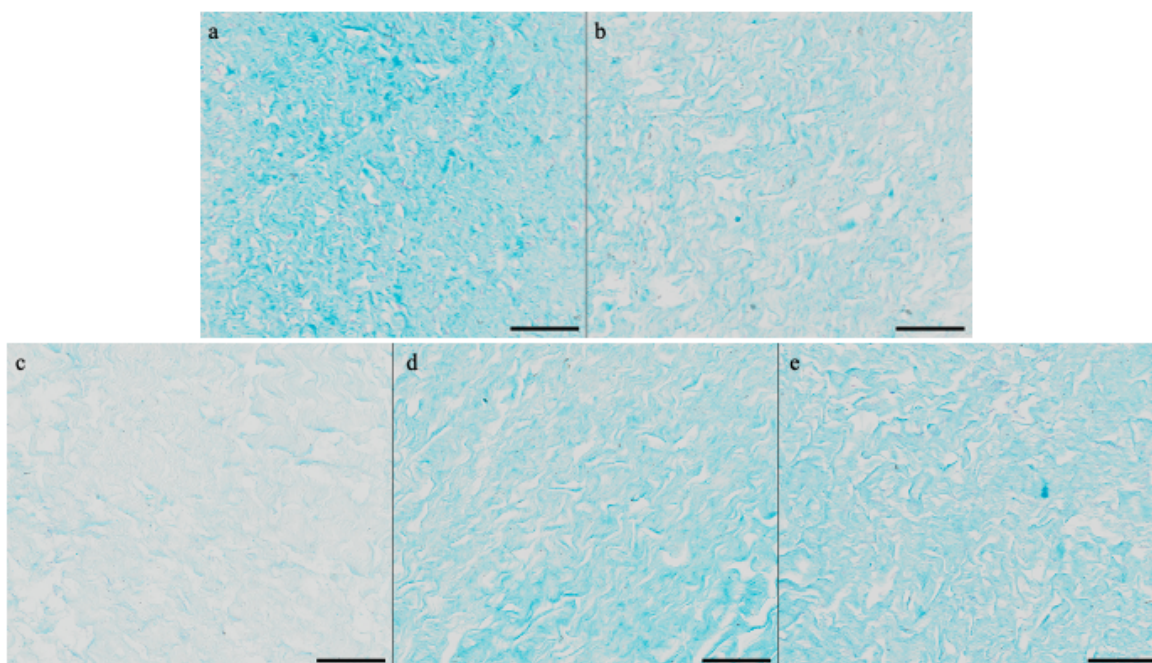
Barra: 100 μ m



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 21 – Exame histológico de glicosaminoglicanos sulfatados da MEC pela coloração AB de amostras de pericárdio bovino. Imagens representativas de fragmentos de amostras de pericárdio bovino ampliadas em 400X. a) NATIVE b) WATER c) SD100 d) SD010 e) SD001. O protocolo SD100 induziu maior redução dos GAG na MEC do pericárdio nativo em comparação aos outros tratamentos.

Barra: 100 μ m



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A histologia confirmou o padrão de colágeno e um aspecto natural dos GAG consistentes com a literatura. Notavelmente, os grupos SD100 e SD010 não possuíam núcleos intactos, possivelmente facilitados pela concentração de detergente em solução, enquanto os resultados foram menos significativos para os grupos WATER e SD001. Laker *et al.* demonstraram danos substanciais na MEC e na estrutura do colágeno devido a detergentes no pericárdio bovino, enquanto o material utilizado em nosso estudo conseguiu suportar tais danos como desnaturação ou intumescimento. Neste estudo, a coloração de lâminas histológicas com *alcian blue* revelou maior remoção de GAG em tecidos tratados com SD100 (Figura 21) e uma maior preservação de GAG em amostras tratadas com menores concentrações de detergente ou apenas água.

Tabela 3 – Quantificação de núcleos celulares em amostras histológicas de PB nativo e descelularizadas

Grupo	Células/mm²	valor-p
NATIVE	536.1 ± 65.2	-
WATER	235.2 ± 46.7	<0.0001
SD100	9.4 ± 11.8	<0.0001
SD010	2.6 ± 4.3	<0.0001
SD001	252.0 ± 41.9	<0.0001

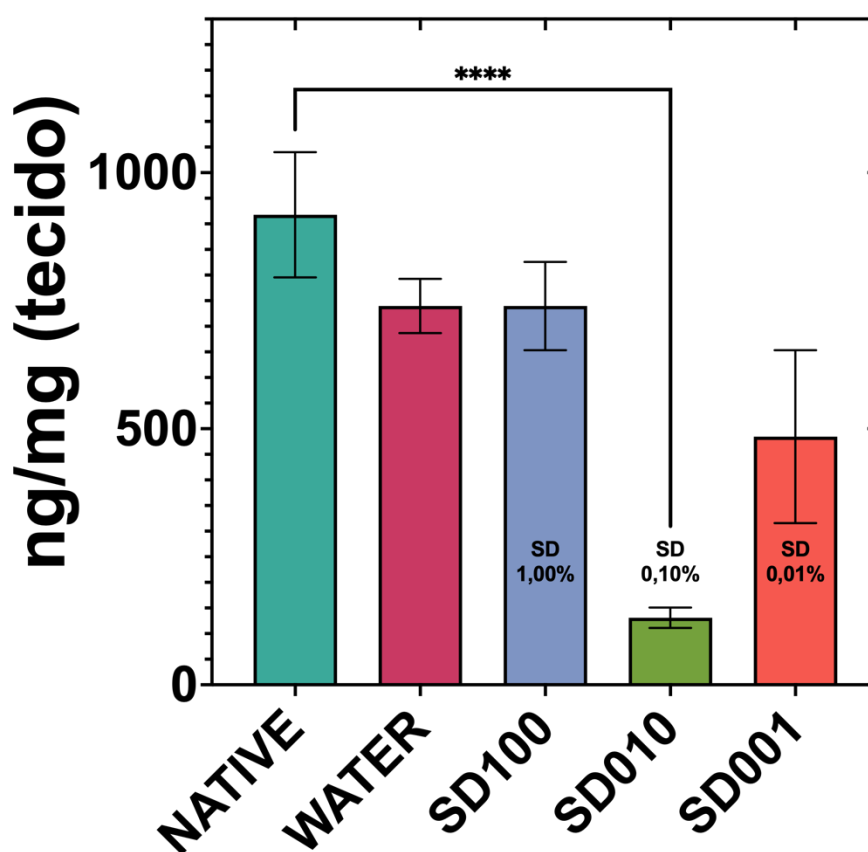
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

De acordo com a Tabela 3, dois níveis de eficácia em relação à ausência de núcleos celulares foram confirmados para as amostras de pericárdio bovino: uma redução de aproximadamente 99% ($p < 0,0001$) foi evidenciada nas amostras dos grupos SD100 e SD010 em comparação às amostras do grupo NATIVE. Em contrapartida, as amostras dos grupos WATER e SD001 resultaram em redução de aproximadamente 50% ($p < 0,0001$) em comparação com as amostras NATIVE. Logo, as lacunas observadas nas amostras que passaram por tratamento estão provavelmente relacionadas ao congelamento e descongelamento da matriz, e não à interação do detergente com a MEC.

Com relação à turbidez da solução contendo amostras do protocolo SD010, esta observação pode estar relacionada à maior depleção celular e de material nuclear experimentada pelo grupo SD010, devido à maior concentração de biopartículas na solução, correspondentes a debris ou substâncias dissolvidas, que podem influenciar diferentes graus de turbidez entre as soluções contendo amostras.

Quantificação de DNA: A quantificação do DNA das amostras controle e tratadas é mostrada na Figura 22. O método de descelularização reduziu **significativamente** o conteúdo de DNA no grupo SD010, com uma diminuição de 85,7% ($p < 0,0001$) no DNA detectável em comparação ao grupo NATIVE ($917,8 \pm 122,2$ ng/mg para $131,0 \pm 19,99$ ng/mg de tecido seco) e redução de 34,4% ($p = 0,0016$) para o grupo SD001 ($484,5 \pm 168,7$ ng/mg). Amostras do grupo SD100 apresentaram uma diminuição de 19,4% ($p = 0,2910$) no valor médio de DNA, indicando alteração **não significativa** em comparação ao grupo NATIVE.

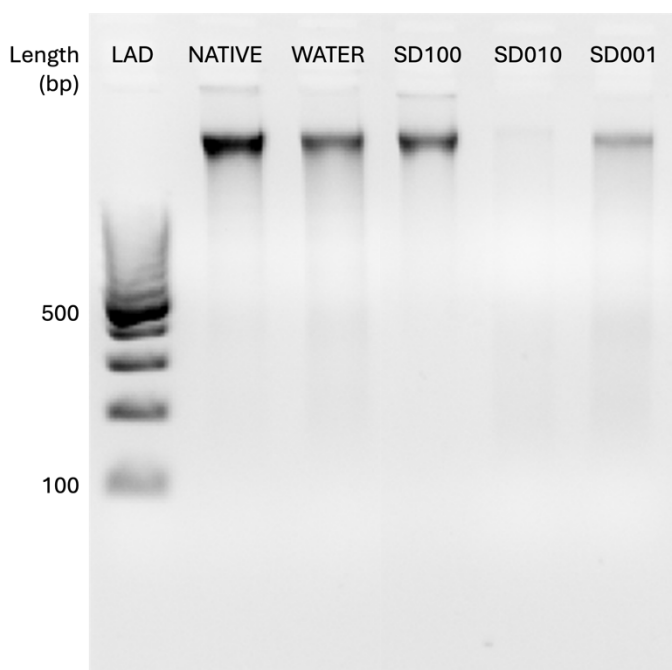
Figura 22 – DNA em amostras de PB descelularizadas em comparação à amostra de PB nativo. O grupo SD010 exibiu maior diferença significativa com redução de 85,7% (**** ou $p < 0,0001$) de DNA



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Eletroforese: A análise do peso molecular das amostras de pericárdio bovino submetidas aos tratamentos de descélularização obteve o seguinte resultado apresentado na Figura 23.

Figura 23 – Imagem representativa da extensão (*Length*) em pares de base (BP) do DNA de pericárdio bovino por eletroforese em gel de agarose. (LAD = padrão para identificação do peso molecular)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A análise da extensão do DNA remanescente por eletroforese em gel de agarose revelou que, apesar das diferentes concentrações de detergente na fase de lavagem das amostras SD100, SD010 e SD001, as moléculas de DNA permaneceram em sua dimensão natural, sem fracionamentos ou deterioração. A ausência de um tratamento envolvendo enzimas teve efeito direto na quebra das moléculas de ácido nucleico.

Devido ao fato de realizarmos a corrida eletroforética em volumes iguais dos extratos das amostras, a intensidade das leituras das bandas de DNA correspondente à cada amostra corroborou com os resultados obtidos em relação à concentração dos remanescentes nucleares. Desta forma, é possível observar que a banda com maior intensidade está relacionada à amostra NATIVE e a de menor intensidade está

relacionada à amostra SD010. Foi possível caracterizar a intensidade das bandas destacadas na Figura 23 por Densitometria Óptica (Tabela 4), com auxílio do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, houve uma supressão de 97% na intensidade luminosa da banda referente à amostra NATIVE em comparação com a intensidade da amostra SD010. Este resultado reforça os valores obtido para quantificação de DNA, embora não seja um parâmetro quantitativo para a concentração de DNA remanescente no tecido.

Tabela 4 – Densitometria Óptica relativa à concentração de DNA no gel usado para eletroforese

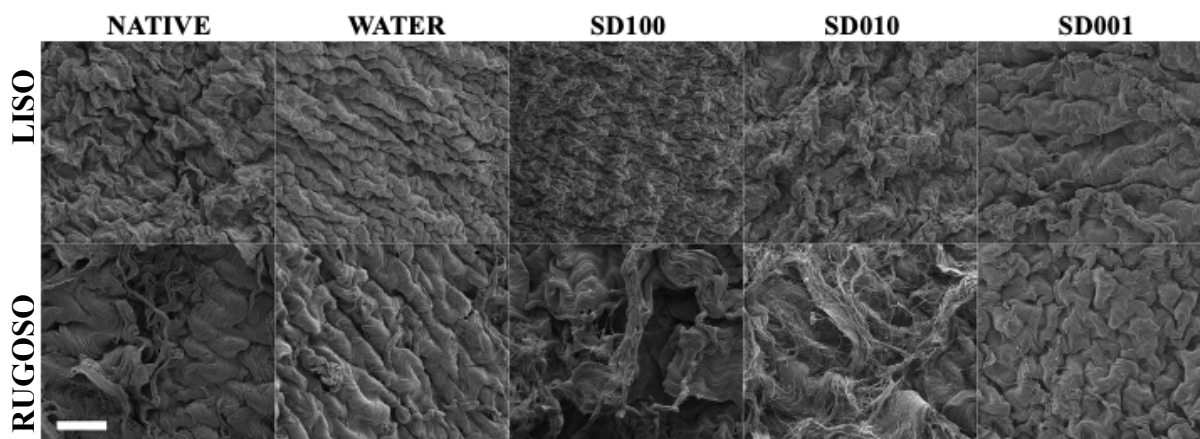
Amostra	Densidade Óptica (Normalizada)
NATIVE	100%
WATER	61%
SD100	60%
SD010	3%
SD001	25%

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Microscopia Eletrônica de Varredura: Amostras nativas e tratadas foram analisadas com MEV. A Figura 24 mostra fotomicrografias de superfície dos lados liso (interno) e rugoso (externo) do pericárdio nativo e descelularizado tratado com congelamento-descongelamento, seguido de água ou solução de desoxicolato de sódio. Uma estrutura consistente com feixes de fibras densamente dispostos é observada no lado liso da superfície do tecido bovino. Da mesma forma, o lado rugoso apresenta feixes relativamente mais soltos, contendo uma densa rede de fibras. Os destaques de aglomerados de fibras de colágeno e elastina oferecem resistência mecânica ao tecido (Figura 25). Nota-se que o tratamento de congelamento-descongelamento preservou eficazmente a integridade da rede de colágeno sem sinais de desnaturação, como evidenciado pela orientação das fibras de colágeno dentro das estruturas em camadas das amostras tratadas em comparação com o controle.

Figura 24 – MEV do pericárdio bovino. Fotomicrografias representativas de superfície de amostras de pericárdio bovino com aumento de 1000X. A análise abrangeu os dois lados da superfície da amostra. As micrografias das amostras que passaram por tratamento revelam a preservação do padrão superficial do pericárdio nativo e características específicas de ambas as faces da MEC

Barra 50 μ m

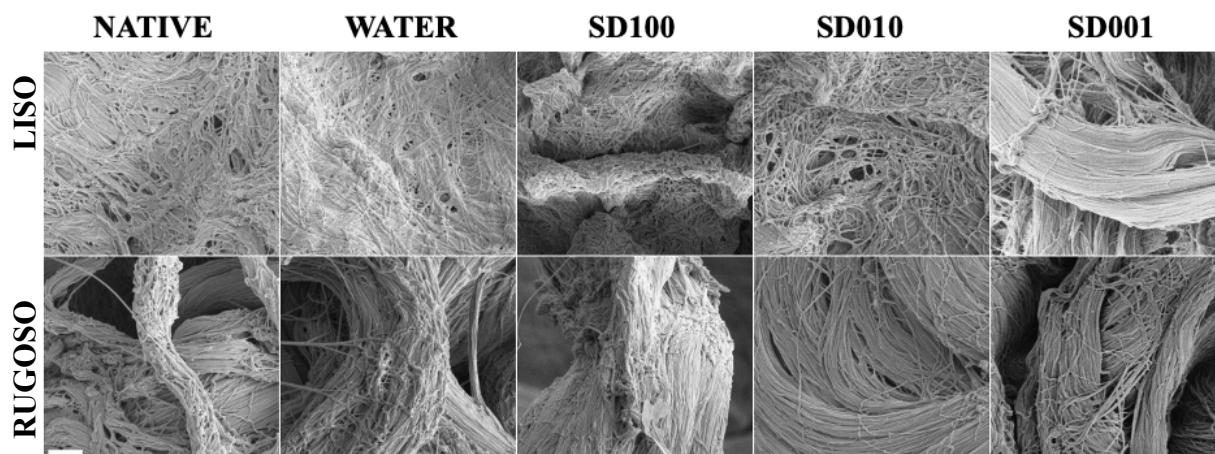


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 25 – MEV do pericárdio bovino. Fotomicrografias representativas do *scaffold* de ambas as superfícies de amostras de pericárdio bovino com aumento de 20.000X. As micrografias evidenciam fibrilas colágenas arranjadas em aglomerados e ausência de falhas ou rompimentos nas fibras das amostras que passaram por

tratamento

Barra: 1 μ m



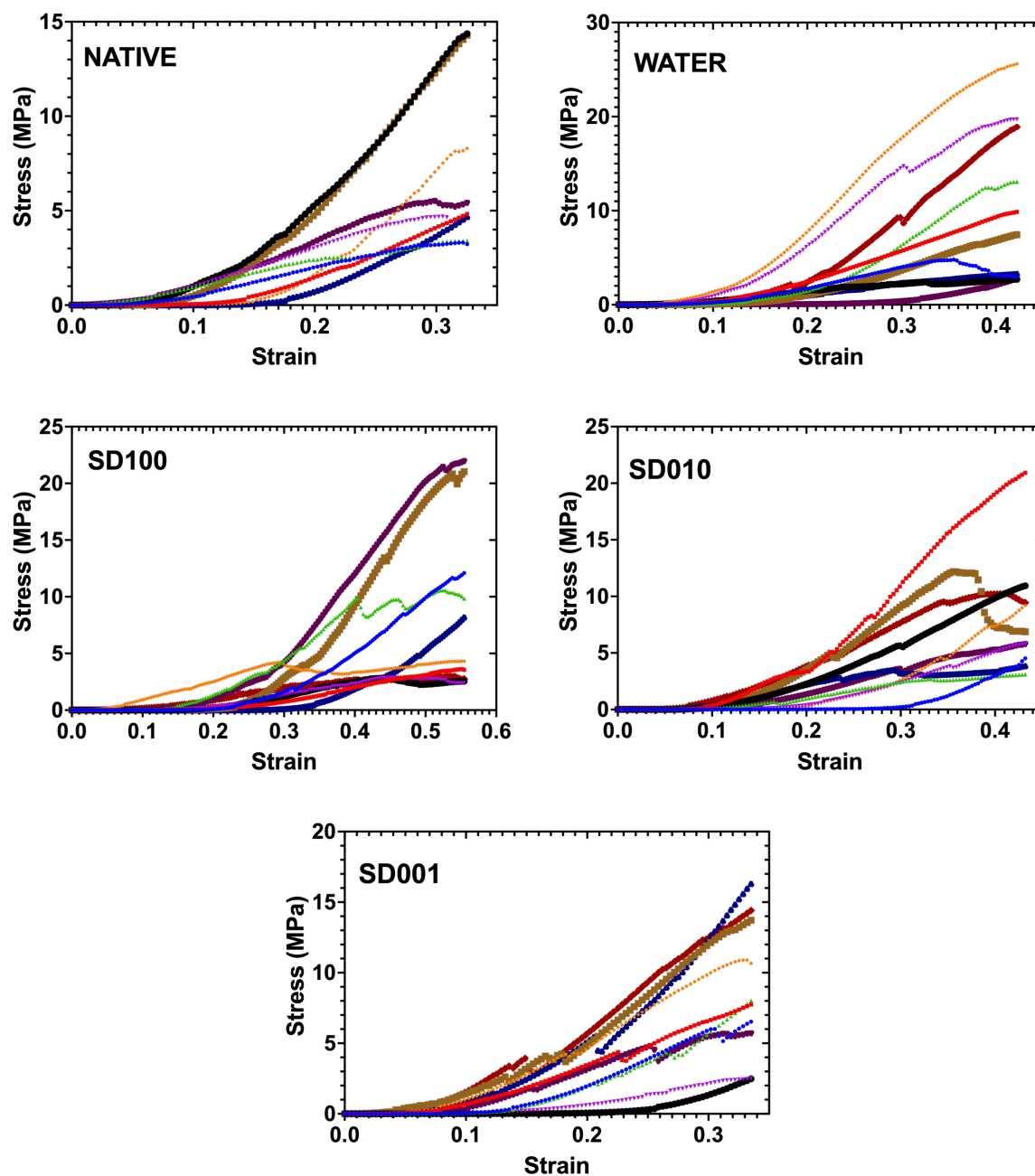
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Teste de Encurtamento: O teste de encurtamento (*shrinkage test*) foi conduzido para avaliar se os protocolos de descelularização levaram à desnaturação da proteína do colágeno. Os resultados indicaram disparidades insignificantes entre a amostra controle (NATIVA) e as amostras tratadas (WATER, SD100, SD010, SD001). Isto sugere que o processo de descelularização com uso de surfactantes não induziu a desnaturação do colágeno. A amostra controle apresentou temperatura de contração de $66,3 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, enquanto as amostras tratadas não apresentaram diferença estatística significativa, variando entre $65,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e $67,0 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

Ensaio biomecânico: As Tabelas 5 e 6 apresentam os dados relativos aos ensaios de tração de acordo com a orientação das fibras. Esses dados destacam a influência da orientação (longitudinal ou transversal) nos valores do módulo de Young e da tração de ruptura (UTS). O parâmetro E foi maior para todos os grupos em comparação ao pericárdio nativo. O grupo WATER experimentou uma resistência mais distinta ao estresse longitudinalmente, refletindo valores mais elevados para o módulo de elasticidade e UTS se comparado ao NATIVE. No caso do grupo SD100, o módulo de elasticidade na direção transversal foi inferior ao do grupo NATIVE. Notavelmente, os grupos parcial e totalmente descelularizados (SD100, SD010 e SD001) exibiram módulo de Young consistente e valores UTS longitudinalmente, sem desvio estatisticamente significativo ao grupo NATIVE. As curvas de tração x deformação para todas as amostras são apresentados na Figura 26.

A resposta ao estresse determinou o módulo de elasticidade de Young, a resistência à tração e o alongamento para compreender se as condições físicas das fibras de colágeno após a interação com soluções de detergente ou com água pura sofreram alterações mensuráveis. Todos os grupos tratados com SD responderam de forma semelhante ao estresse em comparação com o material nativo (ver Tabelas 5 e 6). As curvas obtidas nesta análise mostram as diferentes inclinações que se relacionam ao alinhamento da fibra com o eixo de alongamento. Este resultado mostra que o protocolo não teve impacto significativo no material e não causou danos ou quebra das ligações internas da proteína colágeno. Os testes de temperatura de encurtamento confirmaram isso, consistente com estudos térmicos do colágeno proveniente de membranas, disponíveis na literatura.

Figura 26 – Teste de tração x deformação. Gráficos de resposta ao estresse de amostras de pericárdio bovino tracionadas uniaxialmente: controle (NATIVE) e descelularizadas pelos protocolos (WATER), (SD100), (SD010), (SD001). O aspecto das curvas e a Resistência à Tração (UTS) foram as duas principais indicações do alinhamento das fibras



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 5 – Resultados do ensaio biomecânico do PB na direção longitudinal (0°)

Grupo	Módulo de Young (MPa)	Resistência (MPa)	Elongação (%)
NATIVE	60.2 ± 10.1	14.5 ± 4.8	39 ± 4
WATER	72.6 ± 12.3	20.0 ± 3.9	45 ± 15
SD100	59.8 ± 21.9	14.2 ± 9.2	55 ± 10
SD010	61.3 ± 18.1	18.8 ± 6.7	54 ± 15
SD001	60.8 ± 11.5	17.9 ± 5.4	49 ± 16

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 6 – Resultados do ensaio biomecânico do PB na direção transversal (90°)

Grupo	Módulo de Young (MPa)	Resistência (MPa)	Elongação (%)
NATIVE	21.8 ± 6.8	5.2 ± 1.9	32 ± 8
WATER	19.9 ± 10.6	6.1 ± 2.9	42 ± 8
SD100	12.0 ± 3.2	3.9 ± 1.0	44 ± 9
SD010	22.3 ± 9.1	6.4 ± 2.3	46 ± 11
SD001	27.8 ± 9.8	6.4 ± 2.9	38 ± 5

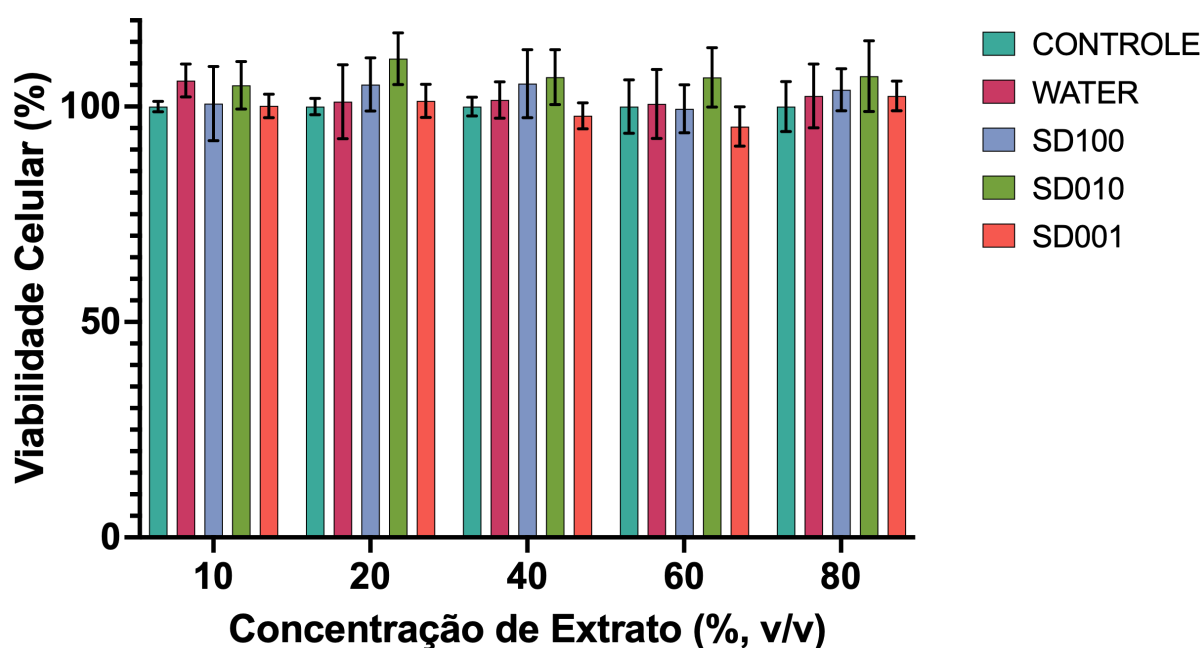
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Citotoxicidade: Os fibroblastos NIH/3T3 foram cultivados em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) de alta glicose suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0.25 µg/mL de anfotericina B). As células foram mantidas a 37 °C em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ (em ar) e foram empregadas nos estudos de citotoxicidade após 1:2 a 1:6 passagens.

Para mensuração da viabilidade celular utilizou-se o kit comercial *CellTiter96® AQueous One Solution*, produzido pela Promega Corporation (Fitchburg, EUA) e composto por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio (MTS) e etossulfato de fenazina (PES). Para obtenção dos extratos, os tecidos (5 g L⁻¹) foram incubados por 72 horas à 37 °C em DMEM suplementado com antibióticos, sob agitação orbital. Os fibroblastos NIH/3T3 foram previamente cultivados (dia anterior) em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10⁴ células/poço e, então, foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos (10 a 80%, v/v) diluídos em meio DMEM-antibióticos fresco. Após 24 horas de incubação, o meio foi retirado e as células receberam 100 µL de DMEM mais 20 µL da solução comercial de MTS/PES. Após 3 horas em incubação, mensurou-se a absorbância dos poços em 490 nm usando um leitor de microplacas da BioTek Instruments, modelo

ELx808 (Winooski, EUA). Por fim, expressou-se citotoxicidade das amostras em termos de viabilidade celular, tendo como referência as células tratadas somente com DMEM-antibióticos (100% viabilidade celular). Os extratos foram preparados em triplicata e cada uma foi avaliada duas vezes ($n = 6$).

Figura 27 – Teste de citotoxicidade por extrato MTS/PES. O gráfico mostra cinco proporções de diluição do extrato para as células cultivadas após 3 h de incubação, e a viabilidade celular (%) das amostras tratadas é expressa como percentagens de controle. A citotoxicidade foi relacionada à viabilidade celular nas diferentes concentrações do extrato.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os resultados apresentados na Figura 27 não indicam diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular para os grupos WATER, SD100 e SD001 em comparação com 100% de viabilidade celular considerada para o meio controle (DMEM-antibiótico) para criar os extratos. O extrato do solvente que esteve em contato com amostras do protocolo SD010 indicou maior média de proliferação de fibroblastos e valor $p=0,0002$ em relação ao controle, frente aos diferentes protocolos (Figura 27). Esta descoberta sugere que o biomaterial produzido no protocolo SD010 possa ser seguro para o crescimento e proliferação celular. É importante expor que o

teste de citotoxicidade se limitou a uma avaliação do solvente mantido em contato com o tecido tratado.

A literatura científica discute extensivamente a combinação de vários tratamentos para uma descclularização ideal. Repetições dos ciclos de congelamento-descongelamento são comumente usados para garantir a lise celular através da formação repetitiva de cristais de gelo ao redor das células. Ao aplicar choques térmicos, é fundamental considerar o tecido-alvo específico, pois diferentes tipos de tecidos respondem de maneira diferente aos tratamentos físicos e químicos. Ciclos repetidos de congelamento-descongelamento foram aplicados na descclularização de tendão equino (BURK *et al.*, 2014), menisco suíno (STAPLETON *et al.*, 2008), artéria bovina (CHENG; WANG; GU, 2019) e pericárdio suíno (GAUVIN *et al.*, 2013). No desenvolvimento desta pesquisa, o uso de uma única flutuação térmica no tecido foi apropriado para quebrar e separar remanescentes celulares da estrutura, como evidenciado pela aparência picnótica do núcleo em amostras parcialmente descclularizadas. Portanto, o nível adequado de choque térmico e de concentração de detergente deve ser determinado para cada caso. A consideração adequada do tipo de tecido pode ajudar a prevenir danos ou outros efeitos adversos. Os processos enzimáticos têm sido empregados como referência para remover detritos celulares e catalisar a hidrólise de RNA e DNA para facilitar a remoção da MEC, por exemplo, no estudo de Yu *et al.* para a descclularização de válvulas porcinas por tratamento enzimático, cumprindo os requisitos propostos pelo grupo de Crapo, entretanto, nos estudos de Gardin *et al.* com protocolo enzimático de descclularização de pericárdio bovino resultou em leitura de DNA de 142 ng/mg (tecido seco), Mendoza-Novelo *et al.* aplicou diferentes protocolos enzimáticos para pericárdio bovino, resultando em leituras de DNA de 75 ng/mg a 125 ng/mg (tecido seco) e o estudo de Ozeki *et al.* a descclularização de estrutura do esôfago rendeu valores de 140 ng/mg (tecido seco). Heuschkel *et al.* com protocolo à base de detergente para pericárdio bovino (não-enzimático), resultou em leitura de DNA de 198 ng/mg (tecido seco). É importante notar que nossos resultados não estavam completamente de acordo com o consenso discutido sobre materiais descclularizados proposto pelo grupo de Crapo para que enxertos provoquem reações imunológicas baixas, particularmente devido ao limite de 50 ng de DNA por mg de tecido na forma seca. No entanto, esta questão ainda é abordada com ressalvas quanto ao uso final do xenoenxerto e ao tipo de tecido a ser

isolado, enquanto outras variáveis, como a presença de epítomos alfa-gal, também podem ser responsáveis por desencadear reações imunológicas adversas em enxertos heterólogos. Além disso, todos os dispositivos médicos estão sujeitos a testes cuidadosos de biocompatibilidade para aprovação clínica (SUSS *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2007). No estudo de Suss *et al.* os protocolos de descélularização resultaram em remanescentes de DNA acima de 275 ng/mg, fragmentos de comprimento abaixo de 100 pb e nenhuma citotoxicidade foi encontrada. Cramer e Badylak afirmam que não existem critérios universais para produzir estruturas de MEC, e um estudo comparando muitos materiais disponíveis comercialmente mostrou que eles tinham reduzido, mas ainda se encontravam acima de 50 ng/mg (tecido) de remanescentes de DNA, não atendendo a todos os critérios (CRAMER; BADYLAK, 2020). No entanto, a exposição às soluções de nuclease pode afetar negativamente a MEC pericárdica (GARDIN *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2005). A literatura é limitada sobre procedimentos não enzimáticos combinados com tratamento de congelamento e descongelamento. Cheng *et al.* usaram três ciclos de congelamento seguidos de agitação em solução a 1,0% de Triton X-100 para descélularizar as artérias carótidas com evacuação total de núcleos em amostras histológicas (CHENG; WANG; GU, 2019). Gao *et al.* usaram três ciclos de congelamento e descongelamento e dez dias de agitação com detergente (1,0% SDS) para descélularizar a cartilagem articular. Li *et al.* utilizaram cinco ciclos de congelamento e descongelamento e agitação com detergente (1,0% Triton e 0,5% SD combinados) para descélularizar membranas de pericárdio bovino. Além disso, durante o desenvolvimento deste estudo, não foram encontradas evidências na literatura de uma abordagem de baixo custo envolvendo um único ciclo de congelamento e descongelamento e, subsequente, interação com uma solução detergente de baixa concentração para eliminar completamente as células do pericárdio bovino. Foi evidenciado neste trabalho que um ciclo de congelamento-descongelamento foi suficiente para desvitalizar as células do pericárdio bovino e auxiliar na sua erradicação ao longo da fase de lavagem.

Em relação aos valores da concentração de DNA de amostras do grupo SD100, Meezan *et al.* propuseram que o uso de SD sem enzimas durante tratamentos de descélularização pode causar aglutinação de DNA nas superfícies dos tecidos (MEEZAN *et al.*, 1975) e tal aglutinação do DNA pode ser evidenciada em imagens imuno-histoquímicas de *scaffolds* (CHEN *et al.*, 2023; YU *et al.*, 2013). Os resultados

de histologia com H&E em conjunto com a quantificação de DNA indicam que o protocolo SD100 pode ter induzido o DNA das amostras a se ligar à matriz colágena mais fortemente que através do protocolo SD010. Nas amostras submetidas ao protocolo SD010, cerca de 86% de DNA foram eliminados das amostras, enquanto o protocolo SD100 eliminou cerca de 20% de DNA. No entanto, a aglutinação de DNA só poderia ser verificada através da análise por imuno-histoquímica, limitando a discussão a respeito da eficiência da lavagem pós-tratamento na remoção dos remanescentes nucleares da matriz.

Os protocolos de descclularização podem variar amplamente com base no tipo de tecido e nas aplicações. Para órgãos inteiros, soluções de SD com concentrações de até 4,0% foram usadas para interações químicas, enquanto a descclularização de tecidos e membranas frequentemente utiliza 1,0% de SD. O fator diferenciador do presente estudo entre os quatro protocolos de descclularização foi a concentração de detergente nos três grupos, sendo parcelas de um estoque SD de 1,0% (m/v), e o grupo WATER não utilizou detergente. SD é um detergente aniônico com cabeça hidrofílica e carregada negativamente, o que favoreceu a dissolução das membranas nucleares. Esta propriedade impacta potencialmente a estabilidade do colágeno e as propriedades mecânicas dentro das membranas pericárdicas. Além disso, os GAG fornecem domínios hidrofílicos à estrutura, potencialmente explicando o aumento observado no módulo de elasticidade para o grupo WATER, particularmente na direção longitudinal (ver Tabela 6). Os resultados histológicos a respeito dos GAG remanescentes enfatizam o papel da concentração de desoxicolato de sódio (SD) no controle da interação entre a descclularização e a remoção do glicosaminoglicanos sulfatados. O protocolo SD010 preservou o conteúdo de glicosaminoglicanos e permitiu a eficiente eliminação de DNA com uma interação mais amena que o protocolo SD100, que ficou evidente nas fotomicrografias com corante *alcian blue* (Figura 21). Em contrapartida, o protocolo SD100, com maior concentração de SD, exibiu uma interação mais forte com a ligação entre GAG e unidades de colágeno dentro da matriz extracelular, resultando em eficácia reduzida na manutenção de glicosaminoglicanos na estrutura.

A fim de se constatar a efetiva contribuição do pré-tratamento que envolvia o congelamento e descongelamento do PB a -80°C, um grupo de amostras denominada NOFTSD010 foi preparado a partir de um protocolo que ignorou a fase inicial de congelamento (pré-tratamento), mantendo a sequência de tratamento e a

concentração de detergente nas mesmas condições da amostra SD010, bem como a etapa de lavagem das amostras com solução salina. A quantificação de DNA das amostras NOFTSD010 resultou em $306,0 \pm 25,85$ ng/mg, o que indicou uma redução significativa ($p < 0,0001$), embora tais valores estejam muito acima do estipulado para materiais que são considerados efetivamente descelularizados. As análises de quantificação de DNA demonstraram a importância da combinação dos parâmetros físicos e químicos, ou seja, da sequência de congelamento-descongelamento do material seguido da interação com soluções detergentes no tratamento do pericárdio bovino para eliminação do DNA e preservação total dos componentes da matriz extracelular. Este resultado significa que há contribuição de ambos os tratamentos, físico e químico, no entanto, a combinação destes tratamentos aliada a uma sintonia fina da concentração de micelas de detergente em solução, evidenciou a potencialidade do protocolo SD010 em produzir *scaffolds* de colágeno com níveis baixos de DNA, comparáveis a tratamentos enzimáticos, com a vantagem do baixo custo associado a esta produção.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta um método não-enzimático para descélularização do pericárdio bovino, no qual obtivemos resultados comparáveis a métodos que utilizam enzimas. O protocolo SD010, envolvendo uma sequência de etapas – um único ciclo de congelamento do PB, seguido de agitação em solução de desoxicolato de sódio a 0,1% e limpeza intensiva por 72 horas em solução salina –, alcançou a eliminação substancial de DNA e a extensa preservação da matriz extracelular.

Embora os resultados exibidos neste estudo sejam positivos, com base nos critérios de Crapo, o valor obtido para a quantificação de DNA ficou aquém do esperado. Esperamos que ajustes no tempo de lavagem com solução salina possam favorecer a eliminação e a possível aglutinação de DNA na matriz extracelular. Biomateriais precisam ser esterilizados previamente ao uso, portanto protocolos de esterilização deste material serão avaliados. Além disso, aplicações deste material futuramente na ortodontia, sugerem que sejam realizados testes de citotoxicidade por contato com cultura de osteoblastos humanos diretamente no pericárdio tratado e esterilizado.

As atividades conjuntas deste projeto se voltaram para soluções sustentáveis e aplicações inovadoras na gestão de resíduos. Fora do laboratório, nossas descobertas têm congruência com a Engenharia de Tecidos e na utilização de xenoenxertos na medicina regenerativa. O pericárdio é um subproduto da indústria alimentícia com vasta aplicabilidade na área da saúde. Finalmente, nosso estudo permitiu o desenvolvimento de uma abordagem eficiente para eliminar o DNA nativo do pericárdio bovino.

Espera-se que as oportunidades e aplicações que surgiram desta parceria sejam exploradas no futuro. A empresa PFBr tem como princípio a fabricação de produtos que possam melhorar a vida dos pacientes que sofrem de patologias cardíacas. Sendo assim, a partir dos resultados apresentados em laboratório, foi possível entender o alcance da contribuição para o campo da Engenharia de Tecidos, que podem ser extrapolados ao mercado de biopróteses.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). **Transplante de Tecido Musculoesquelético**. Disponível em: <https://site.abto.org.br/transplante-de-tecido-musculoesqueletico/>, acesso em: 29 fev. 2024.
- BADYLAK, S. F. et al. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. **Journal of Surgical Research**, v. 47, n. 1, p. 74–80, 1 jul. 1989.
- BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal Behavior of in Vitro Mineralized Anionic Collagen Matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 945–949, 2009.
- BECHTOLD, J. E. et al. The Effects of Freeze-drying and Ethylene Oxide Sterilization on the Mechanical Properties of Human Patellar Tendon. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 22, n. 4, p. 562–566, 1 jul. 1994.
- BECKER, M. J. Etruscan Gold Dental Appliances: Three Newly “Discovered” Examples. **American Journal of Archaeology**, v. 103, n. 1, p. 103, 1999.
- BOZEC, L.; ODLYHA, M. Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 1, p. 228–236, 6 jul. 2011.
- BURK, J. et al. Freeze-Thaw cycles enhance decellularization of large tendons. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 20, n. 4, p. 276–284, 1 abr. 2014.
- BURNS, W. T. et al. Gingival Recession Treatment Using a Bilayer Collagen Membrane. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 8, p. 1348–1352, ago. 2000.
- CALISKAN, E. et al. Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. **Nature Reviews Cardiology**, v. 17, n. 3, p. 155–169, 1 mar. 2020.
- CATERSON, B.; MELROSE, J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. **Glycobiology**, v. 28, n. 4, p. 182–206, 1 abr. 2018.
- CEBOTARI, S. et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: Toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artificial Organs**, v. 34, n. 3, p. 206–210, 2010.
- CHELU, M.; MUSUC, A. M. Advanced Biomedical Applications of Multifunctional Natural and Synthetic Biomaterials. **Processes**, v. 11, n. 9, 1 set. 2023.
- CHEN, T. A. et al. Detergent-Based Decellularization for Anisotropic Cardiac-Specific Extracellular Matrix Scaffold Generation. **Biomimetics**, v. 8, n. 7, 1 nov. 2023.

- CHENG, J.; WANG, C.; GU, Y. Combination of freeze-thaw with detergents: A promising approach to the decellularization of porcine carotid arteries. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 30, n. 2, p. 191–205, 2019.
- COBURN, J.; PANDIT, A. Development of Naturally-Derived Biomaterials and Optimization of Their Biomechanical Properties. **Topics in Tissue Engineering**, v. 3, p. 1–33, 2007.
- COLIGAN, J. E. Commonly used detergents. **Current protocols in protein science**, v. Appendix 1, p. Appendix 1B, 2001.
- COLLATUSSO, C. et al. Decellularization as a method to reduce calcification in bovine pericardium bioprosthetic valves. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 29, n. 2, p. 302–311, 1 ago. 2019.
- COSTA, A. et al. Biologic scaffolds. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 9, 1 set. 2017.
- CRAMER, M. C.; BADYLAK, S. F. Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 48, n. 7, p. 2132–2153, 1 jul. 2020.
- CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, abr. 2011.
- CRUZ, L. G. B. Use of acellular dermal matrix xenograft in reconstructive plastic surgery. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery**, v. 31, n. 1, p. 88–94, 2016.
- DAHL, S. L. M. et al. Decellularized Native and Engineered Arterial Scaffolds for Transplantation. **Cell Transplantation**, v. 12, p. 659–666, 2003.
- DAVID JOÃO DE MASI, E. C. et al. A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas de ratas. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 5, p. 512–521, 2016.
- DEEKEN, C. R. et al. Differentiation of biologic scaffold materials through physicommechanical, thermal, and enzymatic degradation techniques. **Annals of Surgery**, v. 255, n. 3, p. 595–604, mar. 2012.
- DURAND, F. How to improve long-term outcome after liver transplantation? **Liver International**, v. 38, n. November 2017, p. 134–138, 2018.
- ELEBRING, E. et al. Cold-perfusion decellularization of whole-organ porcine pancreas supports human fetal pancreatic cell attachment and expression of endocrine and exocrine markers. **Journal of Tissue Engineering**, v. 8, p. 2041731417738145, 1 jan. 2017.

- EMAMI, A. et al. Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 109, n. 1, p. 19–32, 1 jan. 2021.
- FERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; AHEARNE, M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- FONSECA, G. G. **ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA ATÍPICA: CARACTERIZAÇÃO E IMPLICAÇÕES PARA O SISTEMA DE PREVENÇÃO NO BRASIL**. [s.l: s.n.].
- FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 3, p. 397–407, 2005.
- 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.
- FREYMAN, T. **United States Patent: 7326571 Decellularized Bone Marrow Extracellular Matrix**. United States of America, 2003.
- FUNAMOTO, S. et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3590–3595, maio 2010.
- GARDIN, C. et al. Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 20 jul. 2015.
- GAUVIN, R. et al. 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. 552–565, nov. 2013.
- GEISTLICH. **GEISTLICH website**. Disponível em: <https://www.geistlich.com.br/pt/dentistas/substitutos-osseos/bio-oss/linha-de-produtos>; acesso em: 19 fev. 2024.
- GILBERT, T. W. et al. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix. **Biomaterials**, v. 29, n. 36, p. 4775–4782, dez. 2008.
- GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675–3683, jul. 2006.
- GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

- GILPIN, S. E. et al. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: Bringing the matrix to clinical scale. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 33, n. 3, p. 298–308, mar. 2014.
- GONÇALVES, A. C. et al. Decellularization of Bovine Pericardium for Tissue-Engineering by Targeted Removal of Xenoantigens. **Journal of Heart Valve Disease**, v. 14, n. 2, p. 212–217, 2005.
- GRANT, D. S.; KLEINMAN, H. K. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. **Regulation of Angiogenesis**, v. 79, p. 317–333, 1997.
- GROTH, C. G. The potential advantages of transplanting organs from pig to man: A transplant surgeon's view. **Indian Journal of Urology**, v. 23, n. 3, p. 305–309, 2007.
- GUILLAUME, O. et al. Multilayer, degradable coating as a carrier for the sustained release of antibiotics: Preparation and antimicrobial efficacy in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 3, p. 492–501, 2012.
- HARDING, K.; SUMNER, M.; CARDINAL, M. A prospective, multicentre, randomised controlled study of human fibroblast-derived dermal substitute (Dermagraft) in patients with venous leg ulcers. **International Wound Journal**, v. 10, n. 2, p. 132–137, abr. 2013.
- HARNER, C. D. et al. Allograft Versus Autograft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: 3- to 5-Year Outcome. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 324, 1996.
- HASHIMOTO, Y. et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 3941–3948, 2010.
- HAWKINS, J. A. et al. Class I and class II anti-hla antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 119, n. 2, p. 324–330, 2000.
- HENKEL, J. et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions-A 21st Century Perspective. **Bone Research**, v. 1, p. 216–248, 25 set. 2013.
- HENROTIN, Y. et al. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 2, n. 6, p. 335–348, 4 out. 2010.
- HEUSCHKEL, M. A. et al. In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering. **Xenotransplantation**, v. 26, n. 2, 1 mar. 2019.

HODDE, J.; HILES, M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. **Biotechnology and bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 211–216, jul. 2002.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, abr. 2013.

HUNG, S. H. et al. Larynx Decellularization: Combining Freeze-Drying and Sonication as an Effective Method. **Journal of Voice**, v. 27, n. 3, p. 289–294, maio 2013.

HUSSEIN, K. H. et al. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering C**, v. 67, p. 766–778, 1 out. 2016.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 697–706, 1995.

HWANG, J. et al. Molecular assessment of collagen denaturation in decellularized tissues using a collagen hybridizing peptide. **Acta Biomaterialia**, v. 53, p. 268–278, 15 abr. 2017.

IORIO, V.; TROUGHTON, L. D.; HAMILL, K. J. Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 250–263, 2015.

JAMES, N. L. et al. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. **Biomaterials**, v. 12, n. 9, p. 801–809, 1991.

JANIS, A. D. et al. Structural characteristics of small intestinal submucosa constructs dictate in vivo incorporation and angiogenic response. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 8, p. 1013–1033, maio 2012.

JOYCE, K.; ROCHEV, Y.; RAHMANI, S. Assessment of the uniaxial experimental parameters utilised for the mechanical testing of bovine pericardium. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 96, p. 27–37, 1 ago. 2019.

JUNGEBLUTH, P. et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 138, n. 3, p. 586–593, set. 2009.

KAHYA, N. Protein-protein and protein-lipid interactions in domain-assembly: Lessons from giant unilamellar vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1798, n. 7, p. 1392–1398, 2010.

KARTHIK, S. et al. Validation of Tissue Hydrolysis Methods for Quantification of Collagen in Bovine Pericardium. **Int J Med Lab Res**, v. 2, n. 2, p. 1–12, 2017.

KASRAVI, M. et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials Research**, v. 27, n. 10, p. 1–24, 1 dez. 2023.

KIM, B.-S.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 224–230, 1998.

KLEBE, R. J. Cell Attachment to collagen: The requirement for energy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 86, n. 2, p. 231–236, 1975.

KOLSET, S. O.; GALLAGHER, J. T. Proteoglycans in haemopoietic cells. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 1032, n. 2–3, p. 191–211, 1990.

KOONS, G. L.; DIBA, M.; MIKOS, A. G. Materials design for bone-tissue engineering. **Nature Reviews Materials**, v. 5, n. 8, p. 584–603, 1 ago. 2020.

KROPP, B. P. et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. **Urology**, v. 52, n. 1, p. 138–142, 1998.

KUSUMA, G. D. et al. Transferable Matrixes Produced from Decellularized Extracellular Matrix Promote Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Facilitate Scale-Up. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 5, p. 1760–1769, 14 maio 2018.

LAKER, L.; DOHMEN, P. M.; SMIT, F. E. Synergy in a detergent combination results in superior decellularized bovine pericardial extracellular matrix scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 108, n. 6, p. 2571–2578, 1 ago. 2020.

LANTZ, G. C. et al. Small Intestinal Submucosa as a Small-Diameter Arterial Graft in the Dog. **Journal of Invasive Surgical Research**, v. 3, p. 21–28, 1990.

LAURENCIN, C. T.; EL-AMIN, S. F. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 16, n. 1, p. 4–8, 2008.

LI, C. et al. Label-Free Assessment of Collagenase Digestion on Bovine Pericardium Properties by Fluorescence Lifetime Imaging. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 46, n. 11, p. 1870–1881, 15 nov. 2018.

MCFETRIDGE, P. S. et al. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 70A, n. 2, p. 224–234, 2004.

MEEZAN, E. et al. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. **Life Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1721–1732, dez. 1975.

- MENDIBIL, U. et al. Tissue-specific decellularization methods: Rationale and strategies to achieve regenerative compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 1–29, 1 ago. 2020.
- MENDOZA-NOVELO, B. et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1241–1248, 2011.
- MESSIER, C.; TEUTENBERG, K. The Role of Insulin, Insulin Growth Factor, and Insulin-Degrading Enzyme in Brain Aging and Alzheimer's Disease. **Neural Plasticity**, v. 12, p. 791067, 2005.
- MIN, B. J. et al. Histologic characteristics and mechanical properties of bovine pericardium treated with decellularization and α -galactosidase: A comparative study. **Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 45, n. 6, p. 368–379, 2012.
- MIRSADRAEE, S. et al. Development and Characterization of an Acellular Human Pericardial Matrix for Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 4, p. 763–773, 1 abr. 2006.
- MUIZNIEKS, L. D.; WEISS, A. S.; KEELEY, F. W. Structural disorder and dynamics of elastin. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, n. 2, p. 239–250, 2010.
- NAZARI, M.; KURDI, M.; HEERKLOTZ, H. Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order. **Biophysical Journal**, v. 102, n. 3, p. 498–506, 2012.
- NECAS, J. et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni medicina**, v. 53, n. 8, p. 397–411, 2008.
- NERLICH, A. G. et al. Department of medical history Ancient Egyptian prosthesis of the big toe. **The Lancet**, v. 356, p. 2176–2179, 2000.
- NGUYEN, M. T. N.; DOAN, V. N.; TRAN, H. L. B. In vitro study on chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells on treated bovine pericardium. **Turkish Journal of Biology**, v. 43, n. 6, p. 360–370, 2019.
- OSWAL, D. et al. Biomechanical Characterization of Decellularized and Cross-Linked Bovine Pericardium. **The Journal of Heart Valve Disease**, v. 16, n. 2, p. 165–174, 2007.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863–1887, 2010.
- PETERSEN, T. E. et al. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: Three types of internal homology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 1 I, p. 137–141, 1983.

PORZIONATO, A. et al. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

PRODUCTS AND FEATURES. **PF website**. Disponível em: www.productsandfeatures.com, acesso em: 31 jan. 2024.

REDDY, M. S. B. et al. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. **Polymers**, v. 13, n. 7, p. 1–51, 1 abr. 2021.

ROBERTS, T. S. et al. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts: Two year results in thirty-six patients. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 19, n. 1, p. 35–41, 1 jan. 1991.

RODERJAN, J. G. et al. Structural assessments in decellularized extracellular matrix of porcine semilunar heart valves: Evaluation of cell niches. **Xenotransplantation**, v. 26, n. 3, 1 maio 2019.

SAKUDO, A. et al. Fundamentals of prions and their inactivation (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 27, n. 4, p. 483–489, abr. 2011.

SCARRITT, M. E.; PASHOS, N. C.; BUNNELL, B. A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. 43, p. 1–17, 2015.

SCHITTY, J. C.; YURCHENCO, P. D. Terminal Short Arm Domains of Basement Membrane Laminin Are Critical for Its Self-assembly. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 3, p. 825–832, 1990.

SCHMITT, A. et al. Optimized protocol for whole organ decellularization. **European Journal of Medical Research**, v. 22, n. 1, 8 set. 2017.

SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: Progress toward understanding and prevention. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 79, n. 3, p. 1072–1080, 2005.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1666, n. 1–2, p. 105–117, 2004.

SEZER, S. et al. Dialysis as a bridge therapy to renal transplantation: Comparison of graft outcomes according to mode of dialysis treatment. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 2, p. 485–487, 2011.

SIGMA-ALDRICH. **SIGMA-ALDRICH website**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/substance/sodiumdeoxycholate41455302954>, acesso em: 29 jan. 2024.

- SISTEMA NACIONAL DE TRANSPLANTE. **Relatório de Transplantes Realizados (Brasil) - Evolução 2001 - 2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt>, acesso em: 18 set. 2023.
- SKORSTENGAARD, K. et al. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 441–453, 1986.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA DERMATOLÓGICA. **Enxertos e Retalhos**. Disponível em: <https://www.sbcd.org.br/procedimentos/cirurgicos/enxertos-e-retalhos/>, acesso em: 19 fev. 2024.
- SODHI, H.; PANITCH, A. Glycosaminoglycans in tissue engineering: A review. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 1 jan. 2021.
- SONG, J. J.; OTT, H. C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 8, p. 424–432, ago. 2011.
- SPECKE, V. et al. Virus safety in xenotransplantation: First exploratory in vivo studies in small laboratory animals and non-human primates. **Transplant Immunology**, v. 9, n. 2–4, p. 281–288, 2002.
- STAPLETON, T. W. et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A.**, v. 14, n. 4, p. 505–518, 1 abr. 2008.
- STEWART, B. L. et al. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3501–3506, 2004.
- STROMBERG, D. D.; WIEDERHIELM, C. A. Viscoelastic description of a collagenous tissue in simple elongation. **JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY**, v. 26, n. 6, p. 857–862, 1969.
- SUSS, P. H. et al. Comparative study of decellularization techniques to obtain natural extracellular matrix scaffolds of human peripheral-nerve allografts. **Cell and Tissue Banking**, v. 23, n. 3, p. 511–520, 1 set. 2022.
- SYAZWANI, N. et al. Decellularization of aorta tissue using sonication treatment as potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 35, n. 2, p. 258–269, 1 abr. 2015.
- SYED, O. et al. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 12, p. 5043–5054, dez. 2014.
- THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.
- TRANSPLANT OBSERVATORY. **GODT**. Disponível em: <https://www.transplant-observatory.org/summary/>, acesso em: 31 jan. 2024.

- USHIKI, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. **Archives of Histology and Cytology**, v. 65, n. 2, p. 109–126, 2002.
- VAVKEN, P.; JOSHI, S.; MURRAY, M. M. TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 12, p. 1612–1618, dez. 2009.
- VIG, K. et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.
- WANG, S. et al. Infections and human tissue transplants: Review of FDA MedWatch reports 2001–2004. **Cell and Tissue Banking**, v. 8, n. 3, p. 211–219, set. 2007.
- WESTPHAL, G. A. et al. Guidelines for the assessment and acceptance of potential brain-dead organ donors. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 28, n. 3, p. 220–255, 2016.
- WHITE, L. J. et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 207–219, 1 mar. 2017.
- WIEDERHIELM, C. A. Distensibility characteristics of small blood vessels. **Federation proceedings**, v. 24, n. 5, p. 1075–1084, 1965.
- WOLLMANN, L. et al. Characterization of decellularized human pericardium for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 1, p. 11–17, 1 jul. 2019.
- WOO, J. W. et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 5, p. 879–887, jul. 2008.
- WOOD, F. M.; KOLYBABA, M. L.; ALLEN, P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn wounds: Eleven years of clinical experience. **Burns**, v. 32, n. 5, p. 538–544, ago. 2006.
- WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Final Report 2013**. [s.l.: s.n.].
- YANG, M. et al. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 91, n. 1, p. 354–361, out. 2009.
- YANG, M. et al. Preseeding of human vascular cells in decellularized bovine pericardium scaffold for tissue-engineered heart valve: An in vitro and in vivo feasibility study. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 100 B, n. 6, p. 1654–1661, ago. 2012.
- YU, B.-T. et al. Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic

valves. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 17, n. 16, p. 2179–2184, 2013.

YURCHENCO, P. D. et al. Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 12, p. 7636–7644, 1985.

ZHANG, X. et al. Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. **Journal of Leather Science and Engineering**, v. 2, n. 1, 1 dez. 2020.

ZHOU, J. et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. **Biomaterials**, v. 31, n. 9, p. 2549–2554, 2010.

ZIOUPOS, P.; BARBENEL, J. C. Mechanics of native bovine pericardium. I. The multiangular behaviour of strength and stiffness of the tissue. **Biomaterials**, v. 15, n. 5, p. 366–373, 1994a.

ZIOUPOS, P.; BARBENEL, J. C. Mechanics of native bovine pericardium. II. A structure based model for the anisotropic mechanical behaviour of the tissue. **Biomaterials**, v. 15, n. 5, p. 374–382, 1994b.

ZOUHAIR, S. et al. A comprehensive comparison of bovine and porcine decellularized pericardia: New insights for surgical applications. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, 1 mar. 2020.

ZVAROVA, B. et al. Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 22, n. 5, p. 418–428, 1 maio 2016.

ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO

Waste and Biomass Valorization
<https://doi.org/10.1007/s12649-024-02465-9>

ORIGINAL PAPER



Physicochemical Decellularization of Bovine Pericardium: Effects on DNA Elimination, Extracellular Matrix Preservation, and Biocompatibility

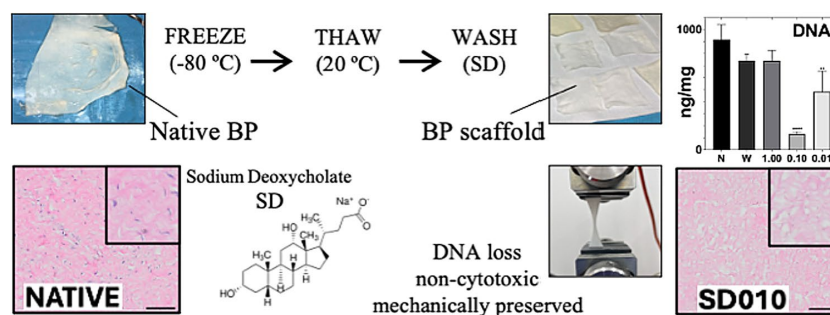
Rui C. Giorgi Filho¹ · André Miguel Martinez Junior² · Marilia F. Calmon³ · Marcio José Tiera² · Dayane S. Alvares⁴ · Guilherme Agreli⁴ · José G. Nery¹

Received: 14 September 2023 / Accepted: 10 February 2024
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Bovine pericardium (BP) is an abundant waste biomass with applicability in tissue engineering, and decellularization is a requisite in enabling biocompatibility and suitability for medical applications. This study aimed to optimize bovine pericardium decellularization by integrating physical and chemical parameters while evaluating their effects on DNA elimination, extracellular matrix (ECM) preservation, and biocompatibility. Tissue-specific adaptations of known decellularization protocols were applied to enhance their efficacy and broaden their applicability in regenerative medicine and tissue engineering. The SD010 protocol, comprising freeze-thawing, agitation in a low-concentration (0.1% w/v) sodium deoxycholate (SD) solution, and thorough saline cleansing, emerged as a promising candidate for effective decellularization. Histological analysis revealed successful removal of cellular components, with SD010 exhibiting complete decellularization. DNA quantification indicated a significant reduction of DNA content in SD010-treated samples (85.7%). Scanning electron microscopy affirmed the preservation of ECM architecture posttreatment. Mechanical tests demonstrated minimal impact on the mechanical properties of treated tissues. The SD010 protocol's potential for xenograft applications was supported by biocompatibility tests, as evidenced by increased cell proliferation *in vitro*. The results indicate a potentially efficient method for bovine pericardium decellularization, highlighting its utility for repurposing biomass waste materials produced by the food and health industry.

Graphical Abstract



Keywords Decellularization · Bovine Pericardium · Extracellular matrix preservation · Biocompatibility

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 23 March 2024

Springer