

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

MADAÍ CRUZ LOPES DE OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS
PARA DESCELULARIZAÇÃO DE VEIAS HUMANAS**

PORTO ALEGRE

2015

MADAÍ CRUZ LOPES DE OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS
PARA DESCELULARIZAÇÃO DE VEIAS HUMANAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre pelo programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva
Co-orientadora: Prof(a) Dra. Denise Cantarelli

PORTO ALEGRE

2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO

O48c Oliveira, Madaí Cruz Lopes de

Comparação de diferentes metodologias para descelularização de veias humanas / Madaí Cruz Lopes de Oliveira. Porto Alegre: PUCRS, 2015.

35 f.: il.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Braga Silva.

Co-orientadora: Prof(a) Dra. Denise Cantarelli.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

1. ACELULARIZAÇÃO. 2. BIOMATERIAL. 3. TRANSPLANTE. 4. BIOTECNOLOGIA. 5. POLÍMEROS NATURAIS. 6. SCAFFOLDS. 7. ESTUDO LABORATORIAL EXPERIMENTAL. I. Silva, Jefferson Braga. II. Cantarelli, Denise. III. Título.

CDD 620.8

CDU 57.08(043.3)

NLM TP 248.13-248.65

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

MADAÍ CRUZ LOPES DE OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS
PARA DESCELULARIZAÇÃO DE VEIAS HUMANAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de mestre pelo programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 27 de Março _____ de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal - PUCRS

Prof. Dr. Salvador Gullo Neto - PUCRS

Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese - PUCRS

PORTO ALEGRE
2015

Dedicatória

Dedico esse mestrado aos sempre especiais D. Rosely (*in memoriam*) e Dr. Aristides sem os quais certamente eu não estaria onde estou.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e sabedoria para conseguir ir adiante a cada obstáculo enfrentado, que não foram pequenos.

Agradeço meu esposo que está sempre comigo e abriu mão de tudo para virmos para tão longe em busca desse meu sonho de vida.

Agradeço meus pais por seus suportes, cada um a seu modo, inclusive pelos quais se eu não tivesse talvez nem estivesse mais aqui, obrigada pai por garantir meu suporte de saúde.

Agradeço meus avós por sua ajuda e sabedoria, amo vocês.

Agradeço a PUCRS e seus colaboradores pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

RESUMO

Introdução: Tecidos não vivos tem se mostrado uma importante fonte de biomateriais, apresentando vantagens como hidrofiliidade, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade, além de boa adesão e multiplicação celular. Contudo, para que esses biomateriais sejam utilizados, técnicas de descelularização vêm sendo utilizadas para que sejam menos antigênicos e também para que sirvam como *scaffolds*. **Objetivos:** O presente estudo tem o objetivo de comparar diferentes agentes de descelularização quanto aos parâmetros citados acima, utilizando detergentes reconhecidamente eficazes para esses processos. **Materiais e Métodos:** As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de veias safenas de sete indivíduos doadores, em tratamento de cirurgia de revascularização do miocárdio e fornecidas pela equipe de cirurgia cardiovascular do Hospital São Lucas da PUCRS, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Nessas amostras foram testados simultaneamente três diferentes detergentes, sódio dodecil sulfato (SDS), TRITON-X e tripsina, além de um grupo controle, contendo Phosphate-Buffered Saline (PBS) e um controle “a fresco”. Após o processo de descelularização e previamente à determinação da celularidade, as amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% durante 24 horas, incluídas em parafinas, seccionadas (5 μ) e coradas com hematoxilina e eosina. O número de núcleos presentes foi quantificado em um raio de 0,025 mm (objetiva 40x), em duplicata, correspondente a oito campos, com o auxílio do software Image Pró-Plus 4.5.1. Os dados foram analisados em modelo de análise de variância de medidas repetidas (blocos casualizados) com ajuste de comparações múltiplas pelo procedimento de Finner. **Resultados:** Dos resultados avaliados todos os tratamentos mostraram um decréscimo no número de células, sendo o SDS o agente com maior descelularização. O TRITON-X e a Tripsina obtiveram valores similares e não houve diferença entre eles, para esse processo. **Conclusão:** Dessa forma, demonstrou-se que todos os detergentes empregados agem como descelularizadores em veias humanas, e mostram-se como promissores agentes de remoção celular.

Palavras chaves: Descelularização, biomaterial, biotecnologia, polímeros naturais, *scaffolds*.

ABSTRACT

Introduction: Non-living tissues have shown to be an important source of biomaterials, with advantages such as hydrophilicity, low toxicidade, low immunogenicity, in addition to good adherence and cell multiplication. However, for these biomaterials to be used, techniques of descellularization is being used to make it less antigenic and also to serve as scaffolds. **Objectives:** The present study aims to compare different agents of descellularization regarding the above mentioned parameters, using detergents known to be effective for these processes. **Materials and Methods:** The samples used in this study were obtained from saphenous veins of seven individuals donors, in treatment of myocardial revascularization surgery and provided by the team of cardiovascular surgery of Hospital São Lucas da PUCRS, after signing the informed consent form. These samples were tested simultaneously three different detergents, sodium dodecyl sulfate (SDS), TRITON-X and trypsin, in addition to a control group containing Phosphate-Buffered Saline (PBS). After the process of descellularization and prior to the determination of cellularity, the samples were fixed in buffered formalin 10% during 24 hours, included in paraffin, sectioned (5 μ) and stained with hematoxylin and eosin. The number of cores was quantified in a radius of 0.025 mm (objective 40x), in duplicate, corresponding to eight fields, with the aid of the software Image Pró-Plus 4.5.1. Data were analyzed using a model of analysis of variance for repeated measures (randomized blocks) with adjustment for multiple comparisons procedure of Finner's procedure were used. **Results:** The results evaluated all treatments showed a decrease in the number of cells, and the SDS the agent with greater descellularization. The TRITON-X and the Trypsin obtained similar values and there was no difference between them, for this process. **Conclusion:** In this way, it could be demonstrated that all detergents used, and the methodology it self, acts as agentes of descellularization in human veins and proved to be a promising agents to remove cells.

Keywords - Descellularization, biomaterials, biotechnology, natural polymers, scaffolds

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. HIPÓTESE	8
3. OBJETIVOS.....	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 Delineamento	10
4.2 Amostra.....	10
4.3 Preparo das amostras	10
4.4 Descelularização	11
4.5 Preparo das lâminas	13
Inclusão em parafina	13
Microtomia em parafina	13
Desparafinização e hidratação.....	13
Coloração com Hematoxilina/Eosina (H&E).....	13
4.6 Análise histológica.....	14
4.7 Análise estatística	14
4.8 Aspectos éticos	15
5. RESULTADO e DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

A medicina já não é vista apenas como um meio de curar patologias. Cada vez mais, transforma-se em um meio de criar alternativas para que pessoas tenham longevidade, porém com qualidade. Sendo assim a medicina moderna é um campo de tecnologia e não mais apenas uma racionalidade científica ligada a evidências clínicas¹. Para isso diversos campos vêm se desenvolvendo e recebendo grandes investimentos tais como a genética e a biotecnologia, contribuindo com impressionantes avanços, e com uma elevada emergência vemos um campo que vem se destacando, que é a engenharia de tecidos¹.

Pode-se afirmar que o objetivo principal da engenharia de tecidos é reconstruir tecidos ou órgãos, com o intuito de substituir áreas danificadas do corpo, de forma a se criar sistemas e ambientes adequados para que se promova a formação e maturação de tecidos¹. Isso passa pelo estabelecimento de uma nova tecnologia clínica, que torne possível tratar tais danos ou doenças onde ainda não existe cura, ou desenvolver novos e mais eficazes tratamentos².

Tal tecnologia vem sendo largamente utilizada para criar arcabouços de suporte, conhecidos como *scaffolds* em 3D, que estabeleçam estruturas de forma que novas células cresçam e sejam guiadas, formando, assim, um novo tecido com características e funcionalidades específicas, correspondentes ao que se deseja desenvolver. Esse suporte contextualiza a célula em um espaço idêntico ao que se tem *in vivo* e permite melhorar as propriedades funcionais, mantendo as interações inter e intracelulares. Enquanto muitos desses *scaffolds* são sintetizados quimicamente, outros são derivados de tecidos não vivos e ambos podem atuar como ancoragem para a proliferação e

¹ RODRIGUES, B. F. F. S.; FERRAZ, M. P. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele; retrospectiva e perspectivas futuras** [Dissertação de tese de mestrado].Porto:Universidade Fernando Pessoa; 69p. 2012

² SOUSA, A. M. M.; et al. **Stimulus responsive smart supports and scaffold/cell constructs for bone tissue engineering**:[Dissertação de tese de doutorado]. Porto:Universidade do Minho; 265p. 2009

crescimento celular, bem como o estabelecimento de um novo suprimento sanguíneo^{3 4}
5.

Desse modo, os tecidos não vivos mostram-se como uma importante fonte de biomateriais para possíveis transplantes. Diversos polímeros naturais vêm sendo estudados para servirem como fonte na produção de diversos tipos de *scaffolds* baseados em tecidos não vivos. Como descrito, as vantagens desses polímeros seriam hidrofília, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade, além de boa adesão e multiplicação celular⁶.

Outras importantes fontes de biomateriais são aquelas formadas por matriz extracelular (MEC), amplamente utilizadas como estratégia na regeneração tecidual e formação de *scaffolds* biológicos. Tal alternativa tem mostrado que essa matriz encontra-se em estado de reciprocidade dinâmica com as células originais em resposta a alterações no microambiente. Esse tipo de *scaffolds* tem sido importante para fornecer sinais que afetam a migração, proliferação e diferenciação celular^{3,6}.

Contudo, para que esses biomateriais possam ser empregados na engenharia de tecidos, técnicas de descelularização têm sido utilizadas na tentativa de desenvolver biomateriais com menor antigenicidade e que também sirvam como *scaffolds* para diversos tipos de tecidos. Esse processo constitui-se de um tratamento que remove mais completamente os componentes celulares do material³. Porém as técnicas mais eficazes para a descelularização dependem de muitos fatores, incluindo a celularidade (por exemplo, fígado vs tendão), a densidade (ex. derme vs tecido adiposo), composição de lipídios (por exemplo, o cérebro vs bexiga urinária) e a espessura (por

³ VAVKEN, P. TRITON-X Is Most Effective among Three Decellularization Agents for ACL Tissue Engineering. **Journal of orthopaedic research**, v. 27, n. 12, p. 1612-1618. 2009

⁴ WU, Shaofeng et al. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 5, p. 1317-1326, 2011.

⁵ MONTOYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

⁶ CORREIA, T. R. **Production of electrospun nanofibers for tissue engineering and other biotechnologic applications; Produção de nanofibras para aplicação na engenharia de tecidos e noutras aplicações biotecnológicas**; [Dissertação de tese de mestrado]. Covilhã: Universidade da Beira Interior; 70p. 2012

exemplo, derme vs pericárdio) do tecido. Deve ser entendido que cada agente de remoção de células e cada método irá alterar a composição da MEC e causar algum grau de perturbação estrutural. Assim, mesmo que a descelularização não seja completa, a minimização destes efeitos indesejáveis é fundamental^{7 8}.

Os processos que ocorrem para que se possam utilizar as membranas extra celulares são descelularização, desinfecção e esterilização, métodos que podem influenciar marcadamente a resposta de remodelação do tecido e seu resultado funcional⁹. É importante ressaltar que a MEC contém várias moléculas bioativas, que em sua distribuição espacial original geram um reservatório de sinais biológicos que são difíceis de reproduzir artificialmente. Notavelmente, embora estas biomoléculas estejam presentes dentro da MEC em quantidades muito pequenas, elas agem como moduladoras potentes do comportamento das células. Contudo a MEC fornece suporte estrutural para as células e regula a comunicação intercelular, além do comportamento dinâmico da célula¹⁰.

Além disso, não se deve esquecer que a estrutura e a composição de um biomaterial atuam tanto na sinalização quanto na mediação de fatores de crescimento, por isso na reconstrução de *scaffolds* com novas células há de se levar em conta sua formação original e também o que deverá ser mantido para servir como base de origem de recultivo¹¹. Entre os agentes utilizados para tal finalidade os mais utilizados são os

⁷ CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

⁸ GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

⁹ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of vascular surgery**.v. 40, n. 1, p. 146-153. 2004

¹⁰ BAPTISTA, P.M.; Orlando, G.; Mirmalek-Sani, S.-H.; Siddiqui, M.; Atala, A.; Soker, S., "Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering". In: 31st Annual International Conference of the IEEE - **Engineering in Medicine and Biology Society**; Minnesota, p.6526,6529. 2009

¹¹ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009.

químicos, enzimáticos e físicos^{12 13}. O mais conhecido entre os agentes enzimáticos para a remoção de células é a tripsina, a qual tem sido utilizada com sucesso em ortopedia e outras aplicações. Apesar da sua elevada eficácia, a tripsina também pode perturbar a estrutura original do biomaterial, por isso o tempo de exposição deve ser cuidadosamente equilibrado. O triton-X é um detergente não-iônico que tem sido utilizado com sucesso para descélularização de válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, assim como tendões e ligamentos. Já o dodecil sulfato de sódio (SDS), é um detergente iônico com uma longa história na engenharia de tecidos descélularizados, que além de ser de fácil utilização tem a capacidade de lisar as células uniformemente dentro de todas as camadas de tecido^{14 15}.

Assim a eficácia de todo processo de descélularização precisa ser medida por três parâmetros: a remoção da totalidade das células, a preservação da natureza estrutural e a composição do tecido, além da capacidade de repovoamento¹⁶. Desta forma a escolha do biomaterial a ser utilizado para cada tipo de transplante irá depender do que se quer substituir e não apenas do que se tem disponível para o fornecimento de um *scaffold*¹⁷.

Ainda há de se considerar que a resposta do hospedeiro a estes materiais varia muito e depende de fatores tais como a espécie de origem (por exemplo, humano,

¹² CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

¹³ GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

¹⁴ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009

¹⁵ KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771-1781, 2012.

¹⁶ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009

¹⁷ SOUSA, A. M. M. D., Reis, R. L.; Alves, C. V. M., et al. Stimulus responsive smart supports and scaffold/cell constructs for bone tissue engineering; [Dissertação de tese de doutorado]. Porto: Universidade do Minho; 265p. 2009

porcino, equino ou bovino), o tecido a partir do qual a MEC é isolada (por exemplo, derme, intestino delgado, ou pericárdio), características mecânicas a serem regeneradas e os fatores ambientais no qual o *scaffold* estará exposto pós-implantação. A descclularização, desinfecção, esterilização e métodos utilizados durante o processo de fabricação podem influenciar significativamente a resposta de remodelação do tecido e seu resultado funcional¹⁸.

Diversos estudos têm sido executados em diferentes tipos de materiais de origem e para vários fins. Estudos com porcos como modelos são bem descritos e alguns de seus resultados tem se mostrado importantes e promissores^{19 20 21 22 23}, Vavken,²⁴ et al realizou-se análises em ligamentos dos animais, que foram submetidos a descclularização por diferentes detergentes, recultivados com fibroblastos humanos, apresentando resultados significativos em decréscimo celular. Além disso, dados indicam que as características de estabilidade do tecido foram preservadas ou reestabilizadas. Esse estudo encontrou indícios de que para tal tecido o detergente Triton-x foi o agente com melhor resultado. Neste caso, encontrou-se uma maior descclularização, com melhor resposta do tecido pós-reimplante.

¹⁸ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of vascular surgery**, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

¹⁹ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009

²⁰ GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

²¹ BAPTISTA, P.M.; Orlando, G.; Mirmalek-Sani, S.-H.; Siddiqui, M.; Atala, A.; Soker, S., “**Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering**”. In: 31st Annual International Conference of the IEEE - Engineering in Medicine and Biology Society; Minnesota, p.6526,6529. 2009

²² ARENAS-HERRERA, J. E. et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 1, p. 014106, 2013.

²³ SULLIVAN, David C. et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. **Biomaterials**, v. 33, n. 31, p. 7756-7764, 2012.

²⁴ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009

Estudos em ratos são abrangentes, englobando desde laringes²⁵ até fígados²⁶. Em *Ruina, M²⁷ et al* os resultados descritos foram significativos, onde não somente o processo de descclularização mostrou-se eficiente mas também seu processo de reimplante, onde foi avaliado que tal tecido demonstrava rejeição imunológica muito reduzida após o tratamento. Em *Shupe, T²⁸ et al* fígados de ratos foram descclularizados utilizando Triton-x e SDS e seus resultados igualmente indicaram que esses detergentes são importantes agentes de remoção celular.

Contudo, resultados em animais muitas vezes são significativamente diferentes quando tais testes são realizados em fontes humanas, e por isso estudos envolvendo tecidos humanos são de grande importância. Em *Baiguera, S²⁹ et al* laringes descclularizadas foram obtidas com sucesso por agentes de remoção celular e testes de integridade do material mostram que esses biomateriais são potenciais opções para futuros transplantes. Já em *Schaner, P³⁰ et al* veias safenas foram igualmente usadas nas avaliações de descclularização, bem como na análise da integridade do material obtido. Mais uma vez fica descrita a eficácia do processo, além da importância das avaliações serem feitas em tecidos de mesma origem daqueles que se quer reimplantar.

²⁵ MA, Ruina et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1790-1798, 2013.

²⁶ LU, Hongxu et al. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2489-2499, 2011.

²⁷ MA, Ruina et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1790-1798, 2013.

²⁸ SHUPE, Thomas et al. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 134-136, 2010.

²⁹ BAIGUERA, Silvia et al. Development of bioengineered human larynx. **Biomaterials**, v. 32, n. 19, p. 4433-4442, 2011.

³⁰ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of vascular surgery**, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

Assim, vantagens potenciais para o uso de veias safenas incluem sua pronta disponibilidade, facilidade de aquisição de doadores de tecidos, diminuição das complicações imunogênicas associadas aos tecidos do xenoenxerto, além de ter o comprimento e diâmetro apropriados para os procedimentos de bypass, uma parede vascular fina que torna mais fácil a decelularização, e uma matriz menor que permite a migração de células receptoras autólogas^{31 32}. Com isso percebe-se que vários fatores incluindo a escolha de materiais originados da mesma espécie, biomateriais reconhecidamente eficazes, que possam ser descclularizados sem a perda das características estruturais originais, são promissores não somente para serem utilizadas para regeneração de tecido de mesma origem, mas também como *scaffolds* para a substituição de outros tecidos ou estruturas distintas.

³¹ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of vascular surgery**, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

³² KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771-1781, 2012.

2. HIPÓTESE

H_0 – O tipo de detergente não altera o percentual de descclularização das veias.

H_1 – Existe diferença significativa entre tipo de detergente e o percentual de descclularização das veias.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar três diferentes detergentes para obtenção de matrizes descelularizadas a partir de veias humanas, identificando a de melhor resultado.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a descelularização de veias safenas humanas.
2. Comparar o efeito dos diferentes tratamentos no percentual de descelularização de veias safenas humanas
3. Analisar a estrutura do tecido de veias safenas humanas após o processo de descelularização
4. Avaliar a metodologia empregada em relação ao material utilizado e aos tratamentos realizados

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Essa pesquisa é um estudo experimental laboratorial.

4.2 Amostra

As amostras utilizadas neste estudo foram veias safenas obtidas de sete indivíduos sob tratamento de revascularização do miocárdio. A atividade de retirada da veia safena para tratamento de revascularização do miocárdio faz parte da rotina da equipe de cirurgia cardíaca do Hospital São Lucas da PUCRS e a doação ocorreu apenas quando um segmento for excedente após o procedimento, sendo estas então doadas para serem utilizadas no processo de descelularização.

Após o recebimento das veias, as mesmas foram transportadas em frascos contendo solução fisiológica 0,9% a temperatura de 4°C até o Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica ou Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS para processamento.

4.3 Preparo das amostras

As veias foram dissecadas com o auxílio de um microscópio de dissecação microcirúrgica (D.F.Vasconcellos, São Paulo, Brasil), a fim de retirar toda a camada de tecido adiposo circunjacente à mesma. Cada veia foi dividida em quatro segmentos tubulares de um cm de comprimento.

4.4 Descelularização

Cada segmento de veia (1cm) recebeu um tratamento de dissociação específico: sódio dodecil sulfato (SDS), TRITON-X, tripsina, grupo controle (PBS) e um controle “a fresco”. Os métodos empregados para cada tratamento e os controles estão descritos a seguir, *Vavken, P³³, et al:*

- Tratamento I - SDS
O segmento de veia dissecada foi tratado com 0,1% de sódio dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), à 37 °C com agitação mecânica (banho-maria) durante 24 horas.
- Tratamento II – TRITON-X
O segmento de veia dissecada foi tratado com 0,25% de TRITON-X (The Dow Chemical Company) , à 37 °C com agitação mecânica (banho-maria) durante 24 horas.
- Tratamento III – Tripsina
O segmento de veia dissecada foi tratado com 0,1% de Tripsina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), à 48 °C com agitação mecânica (banho-maria) durante 48 horas.
- Controle – PBS
O segmento de veia dissecada foi imerso em solução tampão fosfato salina (PBS), à 37°C com agitação mecânica (banho-maria) durante 48 horas.
- Controle – “a fresco”
O segmento de veia dissecada foi imediatamente fixado em formalina (10%) por 24h.

³³ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009

A Figura 1 mostra o diagrama esquemático das etapas e tratamentos do estudo.

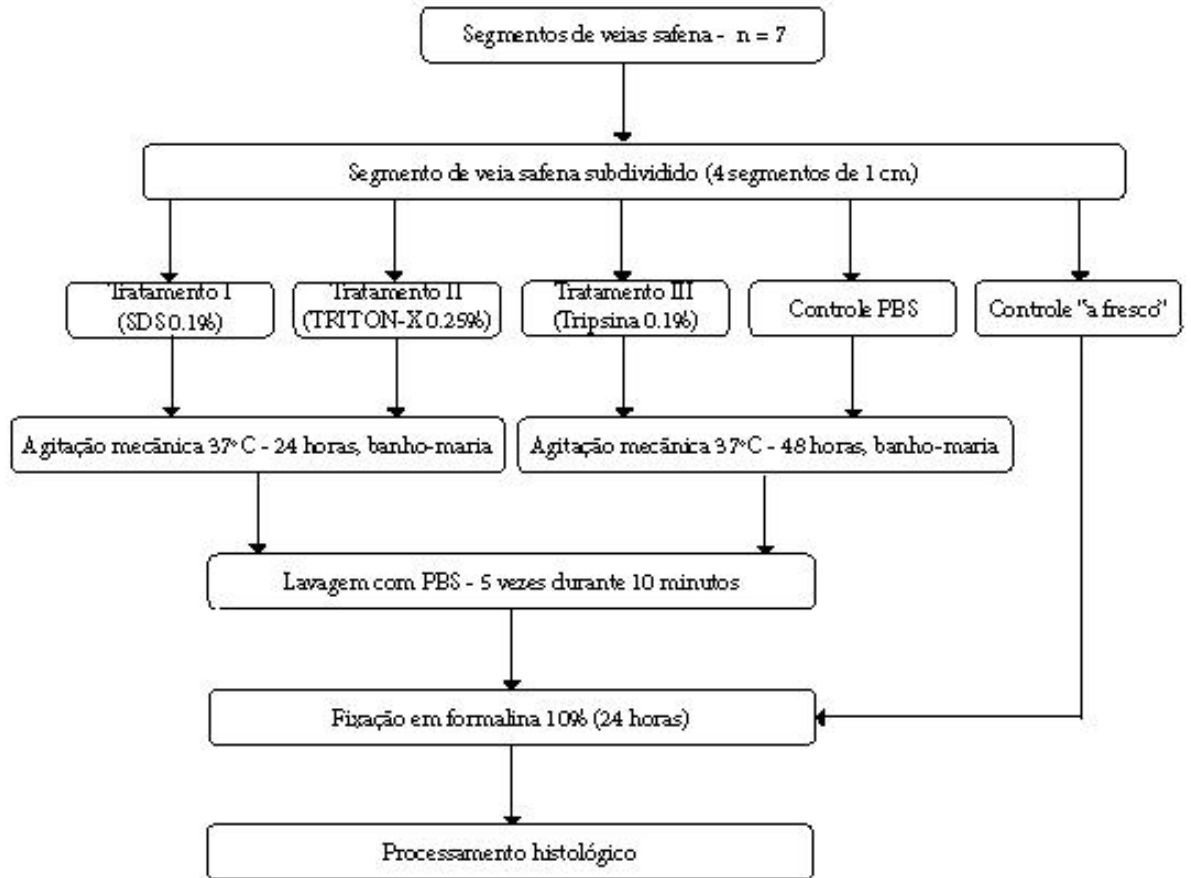


Figura 1. Diagrama esquemático das etapas do experimento.

4.5 Preparo das lâminas

Após o processo de descelularização, as amostras foram fixadas em formalina tamponada 10% (v/v) por 24 horas. Após a fixação, as peças foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo, desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina/eosina conforme descrito a seguir:

Inclusão em parafina

Após a fixação, o material foi lavado com álcool 70° e deixado nessa concentração por duas horas, seguido de três passagens de duas horas em séries alcoólicas de 96°, 99° e 99°, respectivamente.

As amostras foram incubadas por uma hora em três banhos de xilol. Seguido por três banhos parafina líquida à 60°C de uma hora cada.

Inclusão do material.

Microtomia em parafina

Para cada amostra de cada tratamento foram preparadas quatro lâminas com secções seriadas de 4 µm de espessura obtidas com o auxílio de um micrótomo (Leica, mod. RM 2125).

Desparafinização e hidratação

Nessa etapa as lâminas passaram por xilol 1 por 10 minutos, xilol 2 por 10 minutos, seguidas por álcool 99° por 5 minutos, álcool 95° por mais 5 minutos e finalmente álcool 70° por um período de 5 minutos.

Foram então lavadas em água corrente e coradas.

Coloração com Hematoxilina/Eosina (H&E)

As lâminas foram coradas durante 5 minutos com hematoxilina de Harris. Em seguida foram lavadas em água corrente por 10 minutos, coradas pela eosina por três minutos e passadas em álcool absoluto por dois minutos.

E finalmente passaram pela bateria de desidratação: onde foram colocadas rapidamente em álcool absoluto, por quatro vezes, e posteriormente por xilol 1 e xilol 2 e então montadas.

4.6 Análise histológica

O número de núcleos presente foi quantificado com o auxílio em um raio de 0,025 mm (objetiva 40x, em microscópio de luz ligado a um sistema de análise de imagem digital), correspondente a quatro campos, em duplicata, totalizando oito campos, com o auxílio do software Image Pró-Plus 4.5.1. O percentual de descelularização foi calculado conforme a fórmula:

$$\% \text{ descelularização} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ núcleos "a fresco"} - \text{n}^{\circ} \text{ núcleos tratamento}}{\text{n}^{\circ} \text{ núcleos "a fresco"}} \times 100$$

4.7 Análise estatística

Considerando um nível de significância $\alpha=0,05$, foi estimado que seriam necessárias sete unidades experimentais por grupo para um poder estatístico de 90% na detecção de diferenças com magnitude $\geq 1,5$ unidades de desvio-padrão (d de Cohen) entre os 4 tratamentos.

Os dados foram analisados em modelo de análise de variância de medidas repetidas (blocos casualizados) com ajuste de comparações múltiplas pelo procedimento de Finner. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$. O processamento dos cálculos foi realizado com o programa SPSS versão 21.0.

4.8 Aspectos éticos

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 466/12), bem como com a diretriz número 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (*Council for International Organizations of Medical Sciences, CIOMS; 2002*).

Essa pesquisa foi realizada no Laboratório de Habilidades Médicas e Pesquisa Cirúrgica e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS e teve início somente após aprovação pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pareceres nº 519.680 e nº 673.136.

5. Resultados e Discussão

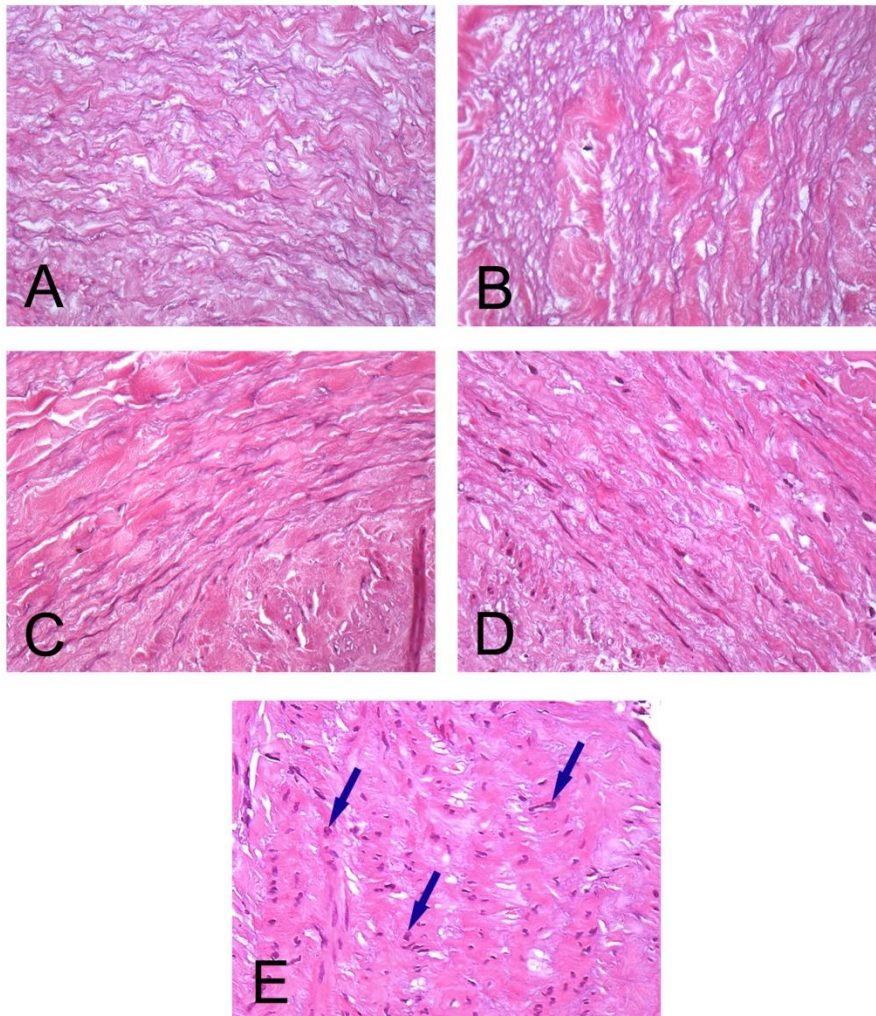
As análises histológicas foram realizadas a partir de 1cm de veia pós-tratamento e as mesmas foram processadas em seguida para sua avaliação de quantitativo celular.

Os resultados encontrados mostram que os agentes de remoção celular testados são eficientes e todos geraram descclularização das veias. Os percentuais de descclularização variaram entre os tratamentos, chegando aos seus maiores valores no tratamento com o agente SDS, que foi o agente, em uma análise comparativa entre todos, que melhor realizou a descclularização. Contudo na análise de manutenção das estruturas originais dessas veias, pode se verificar, com as análises das lâminas de H&E, que elas sofreram certo grau de perturbação e a desorganização do tecido fica evidente. Já o tratamento com Tripsina foi onde menos se verifica essa perturbação do tecido original, contudo também foi onde ficou demonstrado o menor percentual de remoção celular. O tratamento com Triton-x ficou bem similar ao tratamento com Tripsina, onde houve um decréscimo significativo no quantitativo de celularidade e também onde não se verificam muitas alterações no tecido das veias.

Analisando os controles, podemos verificar que nas veias incubadas com PBS houve certa perda celular e isso gera duas possibilidades, que precisam ser avaliadas em outro momento, a de que a metodologia em si traz algum grau de remoção celular, ou a de que o PBS pode ser um agente, mesmo que não intencionalmente, de remoção celular, porém a manutenção da estrutura do tecido sem grandes alterações corrobora com outros resultados que mostram que essa metodologia é bem aceita para descclularização desse tipo de material.

A análise histológica, com H&E, de celularidade das veias avaliadas demonstrou que houve um decréscimo importante no número de células presentes nos tecidos em todos os tratamentos (figura 2 – A,B,C,D,E,). Também verifica-se que no tratamento com SDS (A) foi onde obtivemos maior nível de descclularização e o menor nível é possível verificar em C, no tratamento com Tripsina. Nas lâminas também pode se inferir que os tecidos das veias foram relativamente mantidos e suas matrizes preservadas.

Em A- SDS pode-se visualizar uma maior desorganização da membrana, já em C-Tripsina essa alteração não é visível e a integridade da veia mostra-se bem preservada, se comparada com os controles, tanto com o PBS -D, com o controle de veias “a fresco”-E.



SETAS INDICANDO CELULARIDADE

Figura 2 – Fotomicrografia de cortes histológicos de veias descelularizadas por meio de diferentes tratamentos corados com Hematoxilina/eosina. (A): Tratamento com SDS; (B): tratamento com Triton-X; (C): Tratamento com Tripsina; (D): Controle PBA; (E): Controle “a fresco”.

Na análise estatística pôde se verificar diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos quando comparados aos controles, PBS e “veia a fresco” (tab 1). Entre os tratamentos Tripsina vs Triton-X não pode se considerar grandes diferenças ($p < 0,194$), contudo a comparação entre os tratamentos Tripsina vs SDS e o controle PBS mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) e ($p < 0,017$) respectivamente. O tratamento SDS comparado a todos os outros níveis de tratamento mostrou-se estatisticamente significativo.

Tal resultado demonstra-se com os seguintes índices de significância, SDS vs Tripsina ($p < 0,001$) SDS vs Triton-x ($p < 0,001$), SDS vs PBS ($p < 0,001$). Dados demonstrados na tab 2. Os mesmos encontram-se ajustados pelo método de Finner.

Tratamento	p ñ aj.	p aj. Finner
SDS vs Tripsina	< 0,001 (0,000051)	< 0,001
SDS vs Triton-x	< 0,001 (0,000148)	< 0,001
SDS vs PBS	< 0,001 (0,000018)	< 0,001
Tripsina vs triton-x	0,194	0,194
Tripsina vs PBS	0,014	0,017
Triton-x vs PBS	0,009	0,014

Tabela 2 – Índices de significância para a comparação entre os detergentes testados. Taxas ajustadas pelo método de Finner's

Dos resultados dos percentuais de remoção celular o tratamento SDS mostrou-se eficiente chegando ao seu maior percentual < 92%, e uma média de mais de 89%, demonstrando alto grau de remoção celular. Para os tratamentos de Tripsina e Triton-x os resíduos celulares ainda se encontram em quantidades significativas, contudo houve descelularização. A Tripsina gerou seus maiores percentuais de descelularização em 76% o que é uma redução significativa, contudo esses resíduos ainda podem ser potencialmente imunogênicos e avalia-se que possa ser necessário um segundo agente para remoção mais efetiva das células nas veias.

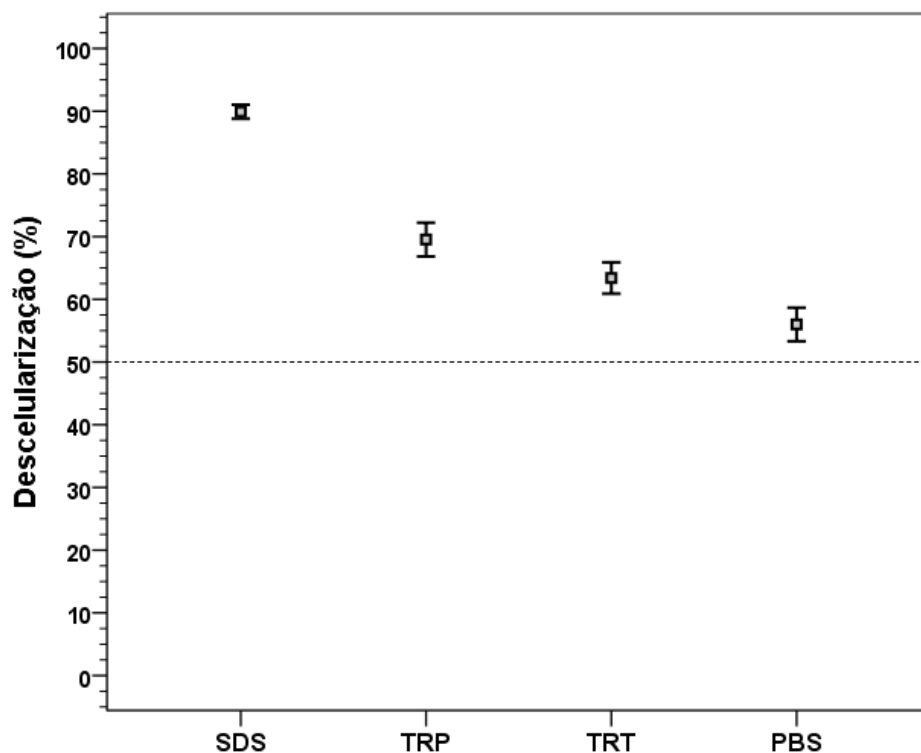
Da mesma forma o Triton-X, que em seu maior percentual de descelularização removeu 69%, mostrando-se igualmente eficaz, mas também fica demonstrada a necessidade de

um segundo agente de remoção celular para completar o processo a que esse método se propõe. Os percentuais de descclularização de cada tratamento estão demonstrados na figura 3 e na tabela 1.

Percentuais de descclularização de veias safena

Trat.	Resultado	Erro padrão	95% Intervalo de confiança	
			Limite inferior	Limite superior
1 – SDS	89,291	1,127	87,165	92,678
2 – Tripsina	69,531	2,693	62,941	76,122
3 - Triton-X	63,383	2,504	57,262	69,516
4 – PBS	55,991	2,678	49,439	62,543

Tabela1 - Valores dos percentuais de descclularização de veias humanas tratadas e seu controle (PBS), representados com erro padrão



Figuras 3 – Percentuais de descclularização de veias humanas pós-tratamento

Assim, desde 1974 estudos na área de engenharia de tecidos tem buscado novas alternativas para que se possam criar meios de suprir a necessidade de substituição de tecidos que precisam ser removidos para serem usados em seu próprio doador ou em outrem, além de meios de cultivo de células em massa³⁴. Contudo o biomaterial ideal deve cumprir alguns requisitos, como ter capacidade de proliferação rápida e eficaz, além de ter uma estrutura que dê suporte para tais intervenções³⁵.

Tecidos descelularizados são fontes de *scaffolds* bem sucedidas por seus sinais bioespecíficos embutidos encontrados dentro de suas estruturas de proteínas³⁶, porém seus componentes celulares tem se mostrado como as principais fontes de resposta imunitária quando implantados em hospedeiros autólogos³⁷.

Dessa forma a obtenção de biomateriais não imunogênicos, como os descelularizados, parecem ser a resposta para que esses tecidos possam ser empregados largamente nas intervenções que necessitam de repor ou substituir tecidos ou órgãos. Dentre as metodologias disponíveis para tal procedimento é que encontramos grandes diferenças. Dessa forma, na avaliação metodológica mais eficaz a ser determinada para cada tecido, precisamos analisar não só os resultados de descelularização, mas também a manutenção das características originais do tecido, pois alguns procedimentos por si só podem gerar danos a MEC, como mostrado por *Vavken, P³⁸, et al*, onde pôde se verificar diminuições em componentes específicos da membrana.

³⁴ PECK, Marissa et al. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. **Cells, tissues, organs**, v. 195, n. 1-2, p. 144-158, 2011.

³⁵ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009.

³⁶ PECK, Marissa et al. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. **Cells, tissues, organs**, v. 195, n. 1-2, p. 144-158, 2011.

³⁷ GILBERT, T. W. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 2006. Vol.27,n.19, p.3675-3683

³⁸ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009.

Além disso, alguns estudos tem demonstrado que a permeabilidade da membrana estudada também influencia na permeabilização do detergente. Da mesma forma, o tempo de exposição tem grande influência, porém o que é necessário para que esse agente tenha eficiência também é o que gera danos na MEC ³⁹.

A escolha dos detergentes foi embasada em estudos que mostram serem eles os mais eficazes para esse processo ^{40 41}, porém há a necessidade de se avaliar sua utilização especificamente para o material que se deseja usar.

Gilbert, T⁴² et al, mostrou em um estudo que tecidos parcialmente descelularizados têm sido comercializados, pois apesar dos riscos que resquícios de DNA representam, uma remoção completa gera muitos danos a composição do biomaterial. *Montoya, C⁴³ et al* verificou em estudo similar que tempos de exposição e procedimentos como a própria agitação mecânica podem promover alterações na composição na MEC e assim comprometer a utilização do material. Assim sendo é de suma importância que se avalie as metodologias e suas características para cada tipo de material.

Em *Shupe, T⁴⁴ et al* outra característica importante dessas metodologias foi analisada, a de que muitas vezes apenas um agente descelularizante não é capaz de fazer a completa remoção celular, corroborando assim com os achados deste estudo que

³⁹ MONTROYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

⁴⁰ VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009.

⁴¹ KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771-1781, 2012.

⁴² GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

⁴³ MONTROYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

⁴⁴ SHUPE, Thomas et al. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 134-136, 2010.

mostrou um decréscimo menor do que o esperado em alguns dos tratamentos. Pode-se inferir então que existe a necessidade de complementação do processo de remoção celular e que tais agentes são sim muito eficazes, contudo são mais ainda quando associados entre eles. Na revisão de *Crapo, P⁴⁵ et al*, onde foram analisados diversos estudos que fizeram o processo de descélularização em órgãos maciços, fica evidente a necessidade da utilização de mais de um agente de remoção celular e que estes, como mostrado neste estudo, não são tão eficazes quando em seu uso isolado.

No caso de veias e artérias, ainda existem outros cuidados a serem levados em conta quando da recomendação no uso desses biomateriais, um deles seria o risco de geração de coágulos no interior desses materiais^{46 47 48}. Porém, o resultado de estudos onde se verificou o reimplante desses tecidos mostrou-se promissor e não houve casos de formação desses trombos no interior de artérias descélularizadas e reimplantadas⁴⁹.

Fontes de materiais para se substituir tecidos não são escassas, contudo no caso de veias, seus substitutos ainda são imunogênicos, menos duradouros ou exigem que o paciente se submeta a procedimentos invasivos para sua obtenção⁵⁰.

Além disso, estudos sobre a disponibilização de tais veias ainda são escassos⁵¹ e dessa forma estudos que busquem alternativas para novas fontes de obtenção desses

⁴⁵ CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

⁴⁶ MONTOYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

⁴⁷ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of vascular surgery*, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

⁴⁸ KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, v. 33, n. 6, p. 1771-1781, 2012.

⁴⁹ MONTOYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

⁵⁰ QUINT, Clay et al. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 22, p. 9214-9219, 2011.

⁵¹ SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of vascular surgery*, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

tecidos são de grande valia e por esse motivo essa avaliação mostra-se significativa e seus resultados valiosos para a evolução de novos tratamentos.

Os achados nesse estudo, quando comparados a estudos similares, mostram que os detergentes Triton-X e Tripsina quando usados sozinhos, para o caso das veias safena, não são considerados como efetivamente descelularizantes, pois apesar de terem obtido um decréscimo importante, ainda podem ser responsáveis por respostas do sistema imune no hospedeiro. Já o SDS mostrou-se eficaz e os resquícios que podem ser encontrados, de acordo com alguns autores⁵², não interfeririam em sua adaptação e reintegração ao receptor desse tecido.

Contudo, a necessidade de uma posterior avaliação de manutenção da MEC mostra ser de grande valia e pode permitir que se tenham mais informações a respeito desse processo de análise dos agentes de remoção celular isoladamente e da manutenção do tecido usado como *scaffold*. Da mesma forma uma segunda técnica de análise de restos celulares também parece ser de grande importância pois técnicas diferentes permitem que sejam confirmados resultados obtidos por um meio apenas. Além disso, as análises geradas podem ser utilizadas como referência para posteriores testes em veias humanas.

⁵² GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

6. Conclusão

A partir dos resultados obtidos e levando em conta as limitações do estudo, pode-se concluir que na avaliação de descelularização das veias humanas estudadas, encontraram-se diferenças significativas entre os tratamentos, e houve remoção celular em todos os tratamentos.

O tratamento com SDS foi que melhor promoveu a descelularização, tanto quando comparado com os demais tratamentos quanto comparado com os controles.

A metodologia aplicada foi adequada para promover a remoção celular em veias safenas humanas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENAS-HERRERA, J. E. et al. Decellularization for whole organ bioengineering. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 1, p. 014106, 2013.

BAIGUERA, Silvia et al. Development of bioengineered human larynx. **Biomaterials**, v. 32, n. 19, p. 4433-4442, 2011.

BAPTISTA, P.M.; Orlando, G.; Mirmalek-Sani, S.-H.; Siddiqui, M.; Atala, A.; Soker, S., "Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering". In: 31st Annual International Conference of the IEEE - **Engineering in Medicine and Biology Society**; Minnesota, p.6526,6529. 2009

CORREIA, T. R., et al **Production of electrospun nanofibers for tissue engineering and other biotechnologic applications; Produção de nanofibras para aplicação na engenharia de tecidos e noutras aplicações biotecnológicas**;[Dissertação de tese de mestrado].Covilhã:Universidade da Beira Interior; 70p. 2012

CRAPO, Peter M.; GILBERT, Thomas W.; BADYLAK, Stephen F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

GILBERT, Thomas W.; SELLARO, Tiffany L.; BADYLAK, Stephen F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-3683, 2006.

GUI, Liqiong et al. Novel utilization of serum in tissue decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 2, p. 173-184, 2009.

KEANE, Timothy J. et al. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1771-1781, 2012.

LU, Hongxu et al. Autologous extracellular matrix scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2489-2499, 2011.

MA, Ruina et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1790-1798, 2013.

MONTOYA, Carolina Villegas; MCFETRIDGE, Peter S. Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 15, n. 2, p. 191-200, 2009.

PECK, Marissa et al. The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. **Cells, tissues, organs**, v. 195, n. 1-2, p. 144, 2011.

PELLEGATA, Alessandro F. et al. A novel device for the automatic decellularization of biological tissues. **The International journal of artificial organs**, v. 35, n. 3, p. 191-198, 2012.

QUINT, Clay et al. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 22, p. 9214-9219, 2011.

RODRIGUES, B. F. F. S., Ferraz, M. P. **Engenharia de tecidos para regeneração da pele; retrospectiva e perspectivas futuras** [Dissertação de tese de mestrado]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2012

SCHANER, Patrick J. et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. **Journal of vascular surgery**, v. 40, n. 1, p. 146-153, 2004.

SHUPE, Thomas et al. Method for the decellularization of intact rat liver. **Organogenesis**, v. 6, n. 2, p. 134-136, 2010.

SOUSA, A. M. M. D.; et al. **Stimulus responsive smart supports and scaffold/cell constructs for bone tissue engineering**; [Dissertação de tese de doutorado]. Porto:Universidade do Minho; 265p. 2009

SULLIVAN, David C. et al. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. **Biomaterials**, v. 33, n. 31, p. 7756-7764, 2012.

TOTONELLI, Giorgia et al. Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration. **Pediatric surgery international**, v. 29, n. 1, p. 87-95, 2013.

VAVKEN, Patrick; JOSHI, Shilpa; MURRAY, Martha 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, 2009.

WU, Shaofeng et al. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 5, p. 1317-1326, 2011.