

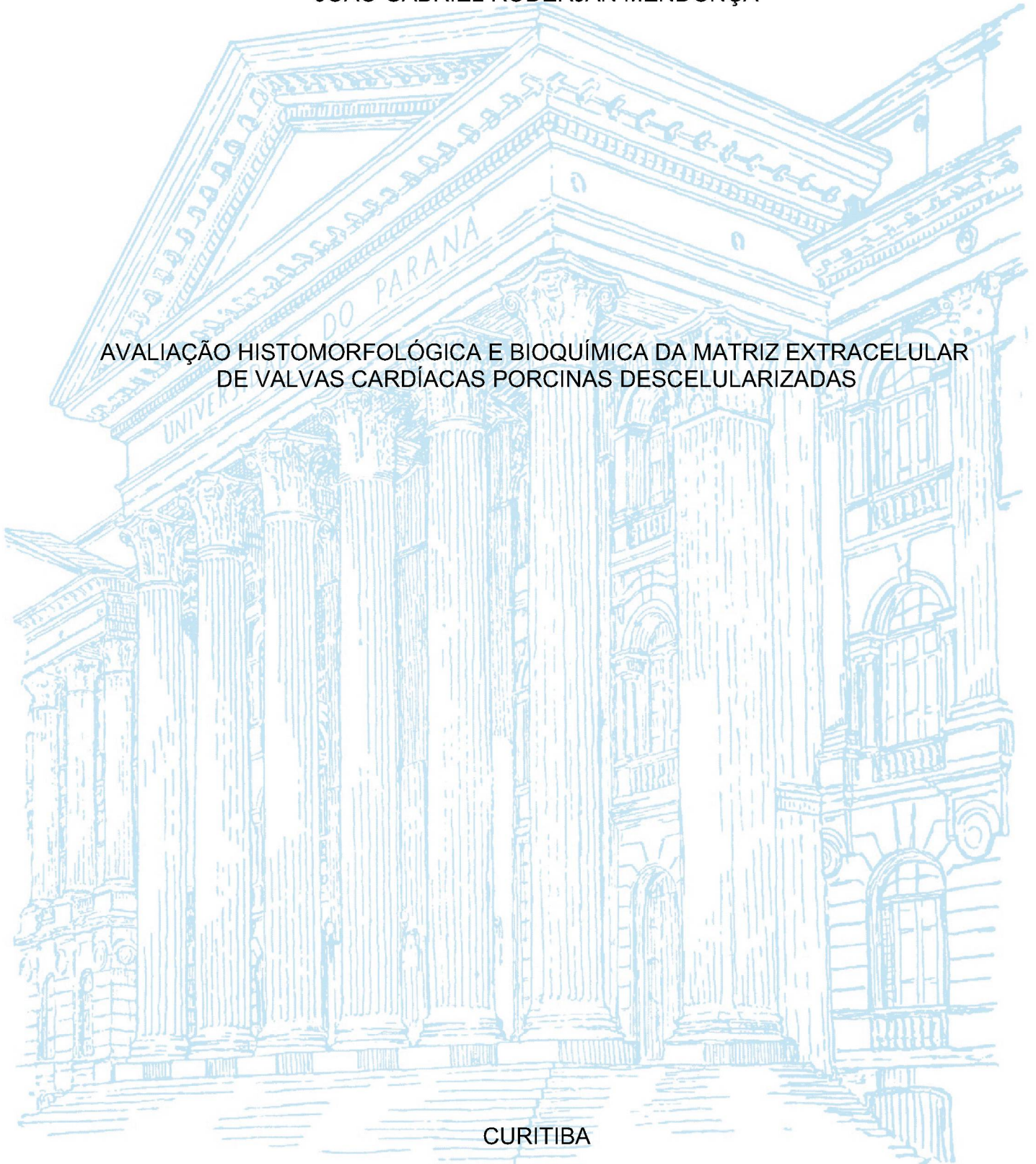
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO GABRIEL RODERJAN MENDONÇA

AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA MATRIZ EXTRACELULAR
DE VALVAS CARDÍACAS PORCINAS DESCELULARIZADAS

CURITIBA

2015



JOÃO GABRIEL RODERJAN MENDONÇA

AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA MATRIZ EXTRACELULAR
DE VALVAS CARDÍACAS PORCINAS DESCELULARIZADAS

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Medicina
Interna, Setor de Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna da Universidade Federal do Paraná

Orientador: Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno

Co-Orientador: Dr. Francisco Diniz Affonso da
Costa

CURITIBA

2015

R688 Roderjan, João Gabriel

Avaliação histomorfológica e bioquímica da matriz extracelular de valvas cardíacas porcinas descelularizadas [recurso eletrônico] / João Gabriel Roderjan – Curitiba, 2015.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa

1. Valvas cardíacas. 2. Matriz extracelular. 3. Dodecil sulfato de sódio. I. Bueno, Ronaldo da Rocha Loures. II. Costa, Francisco Diniz Afonso da. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WG 169

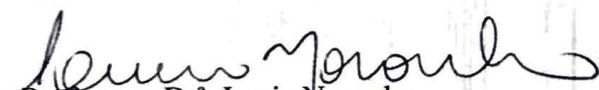
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991

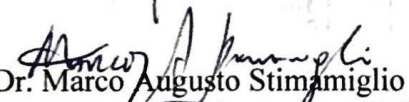


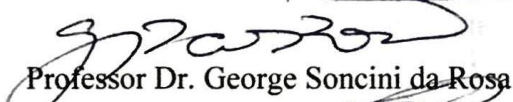
Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos seis dias do mês de abril do ano de dois mil e quinze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr^a. Lucia Noronha (PUC), Dr. Marco Augusto Stimamiglio (Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Carlos Chagas – Pr), Dr. George Soncini da Rosa (UFPR), Dr. Cláudio Leinig Pereira da Cunha (UFPR) e Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno (UFPR) - orientador, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **JOÃO GABRIEL RODERJAN MENDONÇA** do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Doutorado da Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **“AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DA MATRIZ EXTRACELULAR DE VALVAS CARDÍACAS PORCINAS DESCELULARIZADAS”**. A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação** sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutor em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


Professora Dr^a. Lucia Noronha


Professor Dr. Marco Augusto Stimamiglio


Professor Dr. George Soncini da Rosa


Professor Dr. Cláudio L. Pereira da Cunha


Professor. Dr. Ronaldo da Rocha Loures Bueno

AGRADECIMENTOS

A todos que apoiaram, auxiliaram, contribuíram e enriqueceram este trabalho.

A minha mãe Maria Consuelo Effco Roderjan pela dedicação incansável.

A minha esposa Fernanda Navarro Bianchini pelo afeto e apoio incondicional.

Ao Dr. George Soncini pela paciência dedicação a pesquisa e formação de opinião.

A Dr^a Lúcia de Noronha pelos ensinamentos práticos nas análises realizadas.

A Ana Paula e Marina pelo suporte no laboratório de Patologia Básica.

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do seu coordenador Dr. Hélio Teive.

Prof. Dr. Francisco Diniz Affonso da Costa, pelo crédito e confiança .

Aos Professores Dr. Ney Mattoso e Dra. Célia Regina, pelas contribuições e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

As secretárias Lúcia e Valéria, por estar sempre prontas a cooperar.

“A disciplina é mais forte do que o número; a disciplina, isto é, a perfeita cooperação, é um atributo da civilização.”

John Stuart Mill

RESUMO

As valvopatias comprometem a função valvar por deterioração estrutural, demandando uma substituição da valva acometida. Para recuperação da função valvar o substituto valvar deve apresentar desempenho fisiológico e longa durabilidade. Apresentando anatomia semelhante, baixo potencial imunogênico e disponibilidade, as válvulas cardíacas porcinas descelularizadas figuram como o melhor candidato. Um método de descelularização baseado em dodecil sulfato de sódio (SDS) pode produzir um arcabouço de matriz extracelular (MEC) de válvulas aórtica e pulmonar porcina. Este estudo visa avaliar o impacto do método de descelularização sobre a arquitetura de MEC da válvula aórtica porcina descelularizada (VAPD) e da válvula pulmonar porcina descelularizada (VPPD), comparando com válvulas nativas aórtica e pulmonar (VAPN e VPPN), respectivamente. A análise histológica revelou uma ausência de núcleos nas cúspides e condutos das DAPV e DPPV, demonstrando a remoção célula. A análise histomorfológica mostraram a preservação de fibras de MEC, mantendo as estruturas das cúspides e condutos nas VAPD e VPPD. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revela a semelhança da arquitetura de MEC descelularizadas à nativa. Pela avaliação de Microespectroscopia Raman (MR) demonstrou a integridade das estruturas químicas dos componentes da matriz extracelular, sugerindo a conservação do conteúdo de colágeno e glicosaminoglicanos (GAGs). A preservação da lâmina basal nas estruturas das VAPD e VPPD indica a integridade da estrutura organizacional. Estes resultados demonstram que o método de descelularização proposto neste estudo remove células mantendo a arquitetura de MEC da válvula, sugerindo a semelhança de propriedades biológicas às de uma válvula natural saudável.

Palavras-chave: descelularização, SDS, substitutos valvares, matriz extracelular, valvas cardíacas.

ABSTRACT

Heart valve disease compromises the valve function caused by the structural deterioration, requiring a valve replacement. For recovery of valve function the heart valve substitute should present physiological performance and long durability. Featuring anatomy similar, low immunogenic potential and availability, porcine decellularized heart valves stand as the best candidate. A method of decellularization based on sodium dodecyl sulphate (SDS) can produce an extracellular matrix scaffold (ECM) of porcine aortic and pulmonary valves. This study aim to evaluated the impact of decellularization method on the ECM architecture of the decellularized aortic porcine valve (DAPV) and decellularized pulmonary porcine valve (DPPV), comparing with native aortic and pulmonary valves (NAPV and NPPV), respectively. Histological analysis revealed an absence of nuclei in the cusps and conduits of DAPV and DPPV groups demonstrating cell removing. The histomorphological analysis showed the preservation of ECM fibres, maintaining the structures of the cusps and conduits in DAPV and DPPV. Scanning electron microscopy (SEM) reveal the similarity of ECM architecture of decellularized to native. Raman Microspectroscopy (RM) demonstrated the integrity of chemical structures of ECM components, suggesting the conservation of the collagen content and glycosaminoglycans (GAGs). The preservation of basal lamina in the decellularized tissue confirms the integrity of the organizational structure. These results demonstrate that the decellularization method proposed in this study removes cells keeping the ECM architecture of the valve, suggesting similarity of biological properties to those of a healthy native valve.

Keywords: decellularization, SDS, heart valves substitutes, extracellular matrix, heart valves

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MÉTODO DE AMOSTRAGEM EMPREGADO NAS VALVAS CARDÍACAS.....	23
FIGURA 2. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA AÓRTICA COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VAPN A VAPD	31
FIGURA 3. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA PULMONAR COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VPPN A VPPD.....	33
FIGURA 4. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA AÓRTICA COMPARAÇÃO DOS CONDUTOS DA VAPN A VAPD.	35
FIGURA 5. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA PULMONAR COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VPPN A VPPD.	37
FIGURA 6. A ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DA MEC DA VALVA AÓRTICA.....	40
FIGURA 7. A ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DA MEC DA VALVA PULMONAR.....	42
FIGURA 8. ESPECTROS RAMAN DE CÚSPIDE E DO CONDUTO DE VALVAS AÓRTICAS DESCELULARIZADAS (VAPD) COMPARANDO AS NATIVAS (VAPN).....	44
FIGURA 9. ESPECTROS RAMAN DE CÚSPIDE E DO CONDUTO DE VALVAS PULMONARES DESCELULARIZADAS (VPPD) COMPARANDO AS NATIVAS (VPPN).....	46
FIGURA 10. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CÚSPIDES DE VALVAS AÓRTICAS NATIVAS E DESCELULARIZADAS.....	48
FIGURA 11. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CÚSPIDES DE VALVAS PULMONARES NATIVAS E DESCELULARIZADAS.	49
FIGURA 12. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CONDUTOS DE VALVAS AÓRTICAS NATIVAS E DESCELULARIZADAS.....	50
FIGURA 13. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CONDUTOS DE VALVAS PULMONARES NATIVAS E DESCELULARIZADAS.....	51
FIGURA 14. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE	

CÚSPIDE DE VALVA AÓRTICA NATIVA (VAPN)	53
FIGURA 15. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA AÓRTICA DESCELULARIZADA (VAPD).....	54
FIGURA 16. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO VALVA AÓRTICA NATIVA (VAPN).....	55
FIGURA 17. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO DE VALVA AÓRTICA DESCELULARIZADA (VAPD).....	56
FIGURA 18. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA PULMONAR NATIVA (VPPN).....	58
FIGURA 19. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA PULMONAR DESCELULARIZADA (VPPD).....	59
FIGURA 20. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO VALVA PULMONAR NATIVO (VPPN)	60
FIGURA 21. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO DE VALVA PULMOANR DESCELULARIZADO (VPPD).....	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA FLUORESCÊNCIA DE DAPI PARA MARCAÇÃO DE NÚCLEOS.....	38
TABELA 2. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PELO TESTE T DE STUDENT DE μ G HIDROXIPROLINA POR MG DE TECIDO EM VALVAS AÓRTICAS E PULMONARES NATIVAS COMPARADAS AS DESCELULARIZADAS.	64
TABELA 3. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PELO TESTE T DE STUDENT DE μ G GLICOSAMINOGLICANOS POR MG DE TECIDO EM VALVAS AÓRTICAS E PULMONARES NATIVAS COMPARADAS AS DESCELULARIZADAS.	65

LISTA DE SIGLAS

AMEC – arcabouço de matriz extracelular

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CME – Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR

COL IV – Colágeno tipo IV

DESC. – tecido descelularizado

GAGs – glicosaminoglicanos

HLA – *Human Leukocytes Antigens* – Antígenos leucocitários humanos

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

LAM – laminina

MEC – matriz extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

N – Normal

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

MR - Microespectroscopia Raman

VA – valva aórtica

VAPD - valva aórtica porcina descelularizada

VAPN - valva aórtica porcina nativa

VM – valva mitral

VP – valva pulmonar

VPPD - valva pulmonar porcina descelularizada

VPPN - valva pulmonar porcina nativa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVO.....	15
1.1.1	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>15</i>
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	PREPARO DOS CONDUTOS PARA OS ENSAIOS.....	23
3.2	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	24
3.2.1	<i>Análise morfométrica da fluorescência dos núcleos.....</i>	<i>24</i>
3.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	25
3.4	AValiação de por microespectroscopia RAMAN	25
3.5	IMUNOHISTOQUÍMICA PARA LÂMINA BASAL.....	26
3.6	IMUNOFLORESCÊNCIA.....	26
3.7	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	27
3.7.1	<i>Conteúdo de colágeno</i>	<i>27</i>
3.7.2	<i>Conteúdo de Glicosaminoglicanos (GAGs).....</i>	<i>28</i>
3.7.3	<i>Análises estatísticas das quantificações bioquímicas</i>	<i>28</i>
4	RESULTADOS	29
4.1	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	29
4.1.1	<i>Cúspide aórtica</i>	<i>29</i>
4.1.2	<i>Cúspide pulmonar</i>	<i>32</i>
4.1.3	<i>Conduto aórtico</i>	<i>34</i>
4.1.4	<i>Condutos pulmonares</i>	<i>36</i>
4.1.5	<i>Análise morfométrica da fluorescência dos núcleos.....</i>	<i>38</i>
4.2	AValiação da ultraestrutura da MEC – MEV	38
4.2.1	<i>Cúspides aórticas</i>	<i>38</i>
4.2.2	<i>Conduto aórtico</i>	<i>39</i>
4.2.3	<i>Cúspides pulmonares</i>	<i>40</i>
4.2.4	<i>Conduto pulmonar</i>	<i>41</i>
4.3	ANÁLISE POR MICROESPECTROSCOPIA RAMAN - MR	43
4.3.1	<i>Cúspides aórticas</i>	<i>43</i>

4.3.2	<i>Condutos aórticos</i>	43
4.3.3	<i>Cúspides pulmonares</i>	45
4.3.4	<i>Condutos pulmonares</i>	45
4.4	PRESERVAÇÃO DA LÂMINA BASAL - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA LÂMINA BASAL	47
4.4.1	<i>Imunohistoquímica</i>	47
4.4.2	<i>Imunofluorescência – co-localização de colágeno IV e laminina</i>	52
4.4.3	<i>Cúspide aórtica nativa</i>	52
4.4.4	<i>Cúspide aórtica descelularizadas</i>	54
4.4.5	<i>Conduto aórtico nativo</i>	55
4.4.6	<i>Conduto aórtico descelularizado</i>	56
4.4.7	<i>Cúspide pulmonar nativa</i>	57
4.4.8	<i>Cúspide pulmonar descelularizada</i>	59
4.4.9	<i>Conduto pulmonar nativo</i>	60
4.4.10	<i>Conduto pulmonar descelularizado</i>	61
4.5	ANÁLISE BIOQUÍMICAS	62
4.5.1	<i>Quantificação bioquímica de hidroxiprolina - Colágeno</i>	62
4.5.2	<i>Análise estatística das quantificações bioquímica</i>	63
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Diversas valvopatias, incluindo as de etiologia congênita, reumática, degenerativas e infecciosas, podem causar alterações estruturais das valvas nativas que, quando significativas, precisam ser tratadas cirurgicamente seja por meio de plastias valvares ou pela sua substituição completa com próteses valvares (CARABELLO, B. A., 2013; PRENDERGAST, B. D., 2013).

Os substitutos valvares incluem próteses mecânicas, próteses biológicas heterólogas com ou sem suporte (*stent*), além de enxertos valvares homólogos ou mesmo autólogos (DOHMEN, P. M., 2012b). As próteses mecânicas são duráveis, entretanto, estão associadas com elevada incidência de fenômenos tromboembólicos e necessitam de anticoagulação oral permanente (PANDURANGA, P. *et al.*, 2014). As próteses biológicas convencionais apresentam melhor perfil hemodinâmico e menor incidência de tromboembolismo, entretanto, estão sujeitos à degeneração progressiva e apresentam durabilidade limitada, especialmente em crianças e jovens (COSTA, F. *et al.*, 2007; FUNDER, J. A., 2012).

Os homoenxertos valvares, apresentam desempenho hemodinâmico fisiológico, incidência quase que desprezível de tromboembolismo e maior resistência a infecções. Porém sua disponibilidade é limitada e as técnicas de implante são mais complexas, limitando uso de homoenxertos em alguns grupos de pacientes (DAINESE, L. e BIGLIOLI, P., 2010).

Vários pesquisadores vem buscando aprimorar os substitutos valvares biológicos por meio da tecnologia de engenharia de tecidos. Com ela, pretende-se a obtenção de matrizes sintéticas ou naturais acelulares, que sejam imunologicamente inertes, com potencial de serem repovoadas "*in vitro*" ou "*in vivo*", tornando-se substitutos funcionais com capacidade regenerativa e de crescimento (BADYLAK, S. F., 2014; CHENG, C. W. *et al.*, 2014; HINDERER, S. *et al.*, 2014; IOP, L. *et al.*, 2014; JANA, S. *et al.*, 2014; MORONI, F. e MIRABELLA, T., 2014; PANIAGUA GUTIERREZ, J. R. *et al.*, 2014; XING, Q. *et al.*, 2014).

Uma das técnicas preconizadas envolve o processo de descelularização, a qual permite que tecidos biológicos homólogos e heterólogos sejam tratados por métodos enzimáticos e/ou com soluções detergentes, produzindo uma matriz extracelular (MEC) íntegra, com ausência de células e debris celulares, baixo potencial imunogênico, arquitetura preservada e susceptível de ser repovoada “*in vivo*” após o implante (SCHMIDT, C. E. e BAIER, J. M., 2000; KAJITANI, M. *et al.*, 2001; BOOTH, C. *et al.*, 2002; CEBOTARI, S. *et al.*, 2002; HODDE, J. P. *et al.*, 2002; GILBERT, T. W. *et al.*, 2006).

Homo e heteroenxertos valvares descelularizados já foram testados experimentalmente, com resultados bastante favoráveis (KIM, W. G. *et al.*, 2002; KOROSSIS, S. A. *et al.*, 2002; DA COSTA, F. D. *et al.*, 2014). O uso clínico de homoenxertos descelularizados, apesar de ainda limitado, tem apresentado resultados clínicos bastante promissores, conforme relatado por Costa *et al.* (2010), e Haverich *et al.* (2009), porém a limitação da disponibilidade direciona o desenvolvimento de heteroenxertos descelularizados.(DA COSTA, F. D. *et al.*, 2010; CEBOTARI, S. *et al.*, 2011)

Vários métodos de descelularização foram propostos para produção de xenoenxertos valvares com o propósito de manter as propriedades biológicas da matriz extracelular permitindo que a resposta seja o remodelamento pelas células do receptor. Desta forma regenerando a função valvar e aumentando a durabilidade a longo prazo (DAINESE, L. e BIGLIOLI, P., 2010; MORONI, F. e MIRABELLA, T., 2014).

Alterações de composição, devido a danos como perda de elementos, pode ser causado pelo processo de descelularização, especialmente a ação dos detergentes sobre as proteínas da MEC (CEBOTARI, S. *et al.*, 2010; HAYKAL, S. *et al.*, 2012). Danos as fibras da MEC causam perda da integridade da arquitetura do tecido, comprometendo o remodelamento por células do receptor, também reduzindo a durabilidade do substituto valvar (SYEDAIN, Z. H. *et al.*, 2013; IOP, L. *et al.*, 2014; PANIAGUA GUTIERREZ, J. R. *et al.*, 2014)

Diante deste fato avaliar a estrutura da MEC de valvas aórticas e pulmonares porcinas descelularizadas por um método baseado em Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

é o primeiro passo no desenvolvimento de um tecnologia de substitutos valvares para futura aplicabilidade clínica.

1.1 OBJETIVO

Demonstrar o efeito do processo de descelularização de valvas aórticas e pulmonares porcinas, avaliando a estrutura de matriz extracelular quanto a integridade, composição e arquitetura.

1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência da retirada de células e a preservação do arcabouço valvar utilizando métodos histomorfológicos e bioquímicos;
- Avaliar danos a componentes da MEC e possíveis alterações quanto a composição da MEC utilizando microscopia eletrônica de varredura e microsespectroscopia Raman;
- Avaliar a preservação da lâmina basal nas cúspides e condutos das valvas descelularizadas por marcação por imunohistoquímica e imunofluorescência para laminina e colágeno IV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As opções de substitutos valvares para tratamento das valvopatias ainda não atende aos diversos grupos de pacientes. Desta forma o desenvolvimento de um substituto valvar com todas as características desejáveis permite o adequado tratamento para cada tipo de paciente (LUCIANI, G. B. *et al.*, 2007).

Dentro das propostas da medicina regenerativa a engenharia de tecidos é voltada a criar substitutos de tecidos e órgãos, que quando aplicados passam a ser uma cura definitiva a patologias com degeneração estrutural (DAINESE, L. e BIGLIOLI, P., 2010). Visando o desenvolvimento biotecnológico de estruturas funcionais *in vitro*, a engenharia de tecidos aplica-se a ossos, tendões, pele, vasos sanguíneos e valvas cardíacas (SACKS, M. S. *et al.*, 2009).

Aplicadas aos enxertos cardiovasculares as técnicas de produção de tecidos focam no desenvolvimento de vasos sanguíneos e valvas cardíacas. Semelhantes anatomicamente com as estruturas a serem substituídas, os enxertos tornam-se funcionalmente ativos, com capacidade regenerativa e de crescimento, sendo na teoria uma reconstrução fisiológica e definitiva (HOPKINS, R. A., 2005).

A escolha das fontes de tecidos biocompatíveis adequados ainda é controversa. Diversos materiais naturais, sintéticos ou híbridos com uma configuração anatômica e passíveis de crescimento celular "*in vitro*" e/ou "*in vivo*", tem sido propostos (BADYLAK, S. F. *et al.*, 2006; MOL, ANITA *et al.*, 2006; CUMMINGS, I. *et al.*, 2012; DAINESE, L. *et al.*, 2012).

Devido a complexidade anatômica das valvas cardíacas, a qual possui organização e arquitetura específicas, relacionada com a função, limita o uso de matrizes sintéticas no desenvolvimento de substitutos cardiovasculares para uso clínico (WANG, R. *et al.*, 2014).

Comparadas as valvas cardíacas humanas e animais não possuem distinção anatômica e fisiológica. Também apresentam constituição bastante similar, formadas basicamente por células e matriz extracelular organizada em estruturas de cúspide e conduto (DALEY, W. P. *et al.*, 2008).

As questões que envolvem o uso de valvas humanas ou animais como substitutos valvares são encabeçadas pela incompatibilidade imune, seguidas pela biossegurança e conservação (RABKIN-AIKAWA, E. *et al.*, 2005; SACKS, M. S. *et al.*, 2009; MORONI, F. e MIRABELLA, T., 2014).

Os tecidos biológicos nativos como valvas aórticas e pulmonares humanas ou animais, desde que convenientemente tratadas, podem ter seu potencial imunogênico drasticamente reduzido, constituindo-se de estruturas de matriz extracelular anatomicamente perfeitas (GOLDSTEIN, S. *et al.*, 2000).

É bem estabelecido que a maior fonte de antigenicidade dos tecidos valvares se concentra nos seus elementos celulares. Células presentes no tecido do substituto valvar implantados resultam em uma resposta imune, degenerando a estrutura da valva (BADYLAK, S. F. e GILBERT, T. W., 2008).

No caso dos homoenxertos a presença de antígenos HLA (Human Leukocyte Antigens) nas células pode intensificar uma resposta imune aguda (ELKINS, R. C. *et al.*, 2001; ELKINS, R. C., 2003; HAWKINS, J. A. *et al.*, 2003)

O método de redução da antigenicidade mais aceito, ainda hoje utilizado, é a fixação por glutaraldeído. Proposta por Carpentier na década de 60, o glutaraldeído produz ligações cruzadas entre as estruturas proteicas, assim evita sua deterioração, consequentemente reduzindo a imunogenicidade. Porém quando implantado a toxicidade residual e a incompleta fixação pelo glutaraldeído, acaba por causar deterioração do substituto valvar, principalmente por calcificação distrófica (CARPENTIER, A. *et al.*, 1967; CARPENTIER, A., 1971; VYAVAHARE, N. R. *et al.*, 2000; SCHOEN, F. J. e LEVY, R. J., 2005; 2009).

Afim de reduzir a antigenicidade e aumentar a durabilidade dos substitutos cardiovasculares (artérias, veias e valvas) a remoção das células figura como uma das soluções que permite a integração ao receptor. Porém aplicada a descelularização a tecidos de origem animal ainda há necessidade de fixação química pela presença de xenoantígenos (SCHMIDT, C. E. e BAIER, J. M., 2000).

O uso de valvas de origem animal para confecção de substitutos valvares confere inerente risco de transmissão de doenças infecciosas, além da possibilidade

de reação imunológica, o que ainda representam desvantagens significativas para os heteroenxertos quando comparados aos homoenxertos (CEBOTARI, S. *et al.*, 2002).

Allaire et al. (1994) demonstram a antigenicidade da matriz extracelular de artérias inter e intraespécie, descelularizadas por SDS. A degradação das fibras elásticas dos xenoenxertos foi mediada por ação imunológica, possivelmente foi desencadeada por antígenos celulares residuais. Os enxertos arteriais descelularizados com SDS apresentavam degeneração aneurismática semelhante as artérias não descelularizadas, porém com importante redução da injúria imune. Os achados de Allaire et al. corroboram com a imunogenicidade mediada pelas células e restos celulares. (ALLAIRE, E. *et al.*, 1994).

No final da década de 90 Bader et al. (1998) demonstram a interatividade de células endoteliais humanas a matriz extracelular porcina, abrindo uma nova abordagem para tecidos valvares. Seguindo esta abordagem O'Brien et al. (1999) propuseram um heteroenxerto de valva porcina descelularizada, não fixada, chamado SynerGraft®. Dois fatores que contribuíram para que o SynerGraft® não apresentasse resultados clínicos animadores foram a incompleta descelularização e a presença do antígeno alfa Gal (Galactose-alpha-1,3-galactose), responsável pela reação imune hiperaguda (GALILI, U. *et al.*, 1984; AVILA, J. L. *et al.*, 1989; BADER, A. *et al.*, 1998; GALILI, U. *et al.*, 1999; TANEMURA, M. *et al.*, 2000; GALILI, U., 2001).

Paralelamente Elkins et al. (2001) demonstraram que a remoção efetiva das células de um homoenxerto, descrito pelos autores como aloenxerto (ELKINS, R. C. *et al.*, 2001).

A partir dos dados de O'Brien et al. (1999) diversos tratamentos químicos capazes de descelularizar as cúspides valvares e as paredes arteriais dos condutos tem sido propostos, incluindo o uso de tripsina, dodecil sulfato de sódio (SDS), octilphenoxietoxietanol (Triton X-100), ácido deoxicólico, soluções hipo e hipertônicas, enzimas como a RNase e DNase, etanol e o glicerol.(MORONI, F. e MIRABELLA, T., 2014) Independente da metodologia empregada, o objetivo final é o de se obter um tecido acelular, sem danificar os componentes da MEC, criando a condição de ser repovoada por células do hospedeiro (GILBERT, T. W. *et al.*, 2006).

Estudos experimentais *in vitro* demonstraram a capacidade de repovoamento de matrizes valvares descelularizadas. Já as análises *in vivo* sugerem que a MEC acelular é passível de remodelamento através de repovoamento e produção de novas fibras de MEC (ZELTINGER, J. *et al.*, 2001; BADYLAK, S. F., 2002).

Badylak (2004) descreve que a organização das fibras de MEC, em especial a lâmina basal, permite melhor adesão e proliferação de células endoteliais, resultando numa camada endotelial confluyente e uniforme. Isto demonstra a importância da interação dos diversos tipos celulares com a matriz extracelular, para a adequada funcionalidade tecidual (BADYLAK, S. F., 2004).

Hawkins et al. (2003) demonstraram que a conservação dos tecidos valvares pode influenciar na imunogenicidade de homoenxertos no uso clínico, resultado sustentado por Affonso da Costa et al. (2004) quando comparou homoenxertos descelularizados a criopreservados em carneiros, apresentando resultados de repovoamento e remodelamento dos homoenxertos descelularizados enquanto houve deterioração dos homoenxertos criopreservados (HAWKINS, J. A. *et al.*, 2003; AFFONSO DA COSTA, F. D. *et al.*, 2004).

Schenke-Layland *et al.* (2003) demonstram que a estrutura de MEC das valvas descelularizadas se mantém íntegra após o processo de descelularização, conservando as características funcionais como resistência mecânica (SCHENKE-LAYLAND, K. *et al.*, 2003).

Utilizando do conceito de tecidos heterólogos fixados estabelecido por Carpentier, Bailey et al. (2003) sugeriram a utilização de valvas descelularizadas fixadas em glutaraldeído, porém os resultados experimentais não foram satisfatórios apresentando calcificação distrófica, em médio prazo, causada possivelmente pela alteração na organização das fibras da MEC, em especial a elastina (BAILEY, M. T. *et al.*, 2003).

Um dos fatores que afeta diretamente a funcionalidade da valva cardíaca descelularizadas é a capacidade em ser remodelada integrando-se aos tecidos do receptor, sugerindo uma revitalização, a qual pode ser mediada pela adesão das células do receptor formando estruturas como microvasos e reorganização da camada

muscular (MEIER, L. A. *et al.*, 2014). A biocompatibilidade e imunogenicidade são parâmetros que podem interferir no remodelamento das valvas cardíacas descelularizadas (WILCOX, H. E. *et al.*, 2005; MACGROGAN, D. *et al.*, 2014).

As técnicas de engenharia de tecido concordam que a descelularização seguida do repovoamento *in vivo* configura a melhor opção para uma abordagem clínica (BADYLAK, S. F., 2014). Porém, permanece a questão principal de um substituto valvar descelularizado conservar as características anatômicas e histomorfológicas da MEC, mantendo uma estrutura susceptível ao repovoamento (SYEDAIN, Z. H. *et al.*, 2013).

As características essenciais ao substituto valvar relaciona-se diretamente com a estrutura e organização da MEC (FAULK, D. M. *et al.*, 2014). A avaliação funcional dos substitutos valvares é a mais relevante, porém outras avaliações podem ser preditivas do funcionamento valvar e do comportamento biológico, em especial a integridade da MEC (HAYKAL, S. *et al.*, 2012; MA, R. *et al.*, 2013; PARTINGTON, L. *et al.*, 2013; MOO, E. K. *et al.*, 2014; MORONI, F. e MIRABELLA, T., 2014)

A abordagem utilizada para remoção das células tem efeito direto no comportamento biológico dos tecidos descelularizados, em especial a resposta imune (KASIMIR, M. T. *et al.*, 2003; TAKAGI, K. *et al.*, 2006).

Schenke-Layland *et al.*, (2003) demonstraram o efeito da descelularização com tripsina na matriz extracelular de valvas cardíacas porcinas, evidenciando alterações estruturais que comprometeram a resistência biomecânica do tecido (SCHENKE-LAYLAND, K. *et al.*, 2003).

Rieder *et al.* (2004) observou que descelularização com SDS apresentava citotoxicidade nos testes de recelularização *in vitro*, demonstrando que a concentração de SDS e os resíduos interferem diretamente na atividade biológica do substituto de valva cardíaca (RIEDER, E. *et al.*, 2004).

Por outro lado Wilcox *et al.* (2005) comprovaram a biocompatibilidade *in vitro* de valvas porcinas descelularizados com SDS em baixa concentração e tripsina, sugerindo um potencial de rescelularização (WILCOX, H. E. *et al.*, 2005).

Já Liao *et al.* (2008) avaliaram a descelularização por detergentes associados

a tripsina em cúspides porcinas. Das combinações de tratamento realizadas, o processo que utilizou o SDS manteve as propriedades mecânicas e microestruturais da MEC, o que pode estar diretamente relacionado ao remodelamento e durabilidade da valva descelularizada (LIAO, J. *et al.*, 2008).

O comportamento biológico da MEC descelularizada pode ser observado Dohmen *et al.* (2005) sugere que não houve comprometimento das propriedades biológicas sendo repovoada por células, reforçando a expectativa de remodelamento (DOHMEN, P. M. *et al.*, 2005).

Os resultados clínicos de homoenxertos descelularizados demonstram a capacidade funcional da MEC descelularizada citada por Dohmen *et al.* (2011) avaliando o uso de valvas pulmonares obtidas por engenharia de tecidos em um seguimento de 10 anos(DOHMEN, P. M. *et al.*, 2011). Também Costa *et al.* descrevem a funcionalidade clínica de homoenxertos aórticos descelularizados a um segmento de 3 anos em termos de funcionalidade, ausência de calcificação e adequada hemodinâmica (DA COSTA, F. D. *et al.*, 2010).

As evidencias de funcionalidade clínica das valvas descelularizadas estão relacionadas a conservação e estabilidade da MEC descelularizada (WEBER, B. *et al.*, 2011). A identificação de alterações no arcabouço de MEC pode revelar limitações do *crosstalk* das células do receptor, reduzindo a durabilidade do substituto valvar (SUN, W. Q. *et al.*, 2013). Desta forma é possível criar uma estratégia par remover as células condicionando o arcabouço de matriz extracelular a ser repovoado por células do receptor(SYEDAIN, Z. H. *et al.*, 2013).

No desenvolvimento de um substituto valvar as avaliações *in vitro* devem fornecer informações suficientes para que possa compreender o comportamento biológico, evitando possíveis alterações que comprometam o funcionamento da válvula(NEUMANN, A. *et al.*, 2013; FAULK, D. M. *et al.*, 2014; LUO, J. *et al.*, 2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram obtidos 20 corações de porcos saudáveis, de ambos os sexos, com idades de 180 a 210 dias e peso entre 80,0 a 95,0Kg, de um abatedouro local (Frigo Mug, Bateias - PR). Após a sua retirada, os corações foram transportados até o laboratório em frascos contendo solução fisiológica isotônica com penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100µg/ml) (Sigma, St.Louis) à 4°C. No laboratório, as valvas aórtica e pulmonar foram dissecadas. Desta forma, foram obtidos valvas aórticas e pulmonares contendo as cúspides, seios de Valsalva e porção proximal da aorta ascendente, na valva aórtica, e porção do tronco da artéria pulmonar, na valva pulmonar. No processo de preparo dos condutos valvares, foi retirada parcialmente a camada adventícia, sendo em seguida, submersas em solução fisiológica isotônica a 4,0°C.

As valvas cardíacas foram então divididas em quatro grupos de 10 valvas cada, de acordo com o tipo de valva e processamento: Valva Porcina aórtica nativa (VAPN), Valva Porcina pulmonar nativa (VPPN), Valva Porcina aórtica descelularizada (VAPD) e Valva Porcina pulmonar descelularizada (VPPD).

Os grupos VAPN e VPPN foram mantidos por até 24 horas em solução fisiológica isotônica à 4,0°C, e em seguida encaminhadas aos estudos histomorfológicos e bioquímicos. Os grupos VAPD e VPPD, após a estocagem de 24 horas em solução isotônica, foram submetidos ao processo de descelularização baseado em dodecil sulfato de sódio (SDS) – patente brasileira PI800603-A2 (COLLATUSSO, C. *et al.*, 2011; COLLATUSSO, C. *et al.*, 2012). Este processo consistiu em colocar as valvas em solução hipotônica de SDS à 0,1% (p/v) (Sigma, St.Louis) contendo 0,02% de EDTA (p/v) (Sigma, St.Louis) durante 24 horas à temperatura ambiente, sob agitação de 150rpm em Shaker (agitador orbital), seguido de uma lavagem em etanol 70,0% à temperatura ambiente, sob agitação em Shaker, com posterior lavagem sequencial em solução fisiológica isotônica à 4,0°C. Terminado o processo as valvas descelularizadas foram armazenadas em solução fisiológica isotônica a 4,0°C por 24 horas e encaminhadas para os ensaios histomorfológicos e bioquímicos.

3.1 PREPARO DOS CONDUTOS PARA OS ENSAIOS

Na preparação das amostras para análise as valvas foram divididas longitudinalmente em 3 partes iguais, contendo cada uma, segmentos da musculatura proximal dos condutos, uma cúspide valvar e um segmento da parede arterial dos condutos (FIGURA 1). Para as análises histomorfológicas foi utilizado um corte longitudinal de 3,0mm de largura contendo segmento da cúspide, do conduto e do músculo. As amostras para análises bioquímicas foram retiradas do conduto com 15,0mm², e segmentos duas cúspides inteiras.

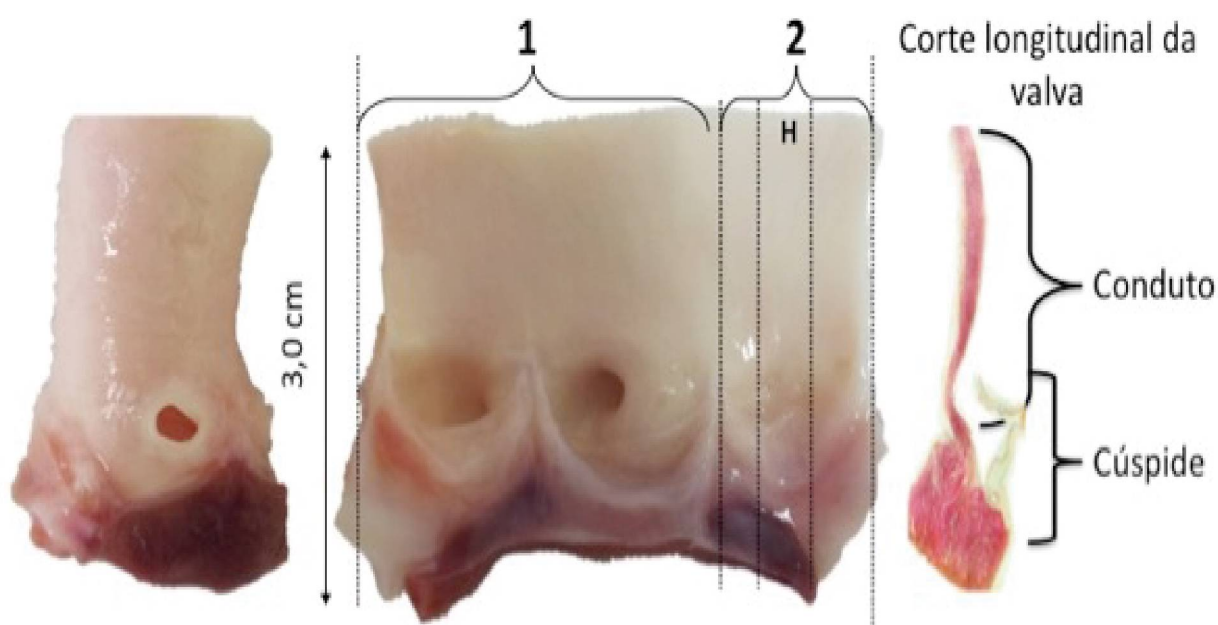


FIGURA 1 - MÉTODO DE AMOSTRAGEM EMPREGADO NAS VALVAS CARDÍACAS. ESTE MÉTODO TEM COMO OBJETIVO A AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS DA VALVA CARDÍACA NO TODO RESPEITANDO A ANATOMIA DO TECIDO. LINHAS PONTILHADAS INDICAM SECCÃO DO TECIDO. O SEGMENTO 1 FOI UTILIZADO PARA AS AMOSTRAS DA ANÁLISE BIOQUÍMICA E O SEGMENTO 2 FOI UTILIZADO PARA ANÁLISES HISTOMORFOLÓGICAS, MEV E MR. AS ANÁLISES FORAM CONCENTRADAS NAS ESTRUTURAS DE CÚSPIDE E CONDUTO.

Fonte: O AUTOR, 2014.

3.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Amostras longitudinais, contendo músculo, cúspide e conduto, foram fixadas em formaldeído tamponado à 10,0%, encaminhadas ao setor de Patologia experimental da PUCPR, onde foram processadas em banhos sequenciais de álcool, diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Cortes de 4,0µm foram montados em lâminas de vidro e corados para: hematoxilina e eosina (HE) para visualização de matriz extracelular e células; Picrosirius Red (PSR) para análise da distribuição e condição do colágeno (RABKIN, E. *et al.*, 2001); Pentacrômico de Russell-Movat (PRM)(American Mastertech Scientific, Lodi, CA - USA) (BOOTH, C. *et al.*, 2002) para visualização das fibras colágenas, elásticas e glicosaminoglicanos. Na avaliação comparativa das amostra nativas (VAPN e VPPN) e das amostras descelularizadas (VAPD e VPPD), foram observadas características estruturais do tecido, organização das fibras da matriz extracelular e presença das células, nas estruturas valvares cúspide e conduto, utilizando aumentos de 200x e 400x em microscópio ótico (Olympus BX-51).

3.2.1 Análise morfométrica da fluorescência dos núcleos

Foi utilizada a coloração de DAPI para visualização de núcleos das células presentes na cúspide e conduto, em microscópio ótico com campo escuro sob luz UV (Leica D4000) no aumento de 200x com objetiva plano cromática (DALLAN, L. A. *et al.*, 2005). Os cortes foram avaliados por morfometria, utilizando o software Image-Pro Plus 6.1, ferramenta de densidade ótica. Foram analisadas imagens sequenciais, sendo 10 imagens de cada cúspide e 20 imagens de segmento de conduto para de ambos grupos. A intensidade da emissão do DAPI e a exposição foram estabelecidos em um corte de tonsila humana corada com DAPI. Para estabelecer os parâmetros morfométricos de análise foi criada uma máscara a partir de 5 imagens das estruturas cúspide e conduto de valva nativa. A resolução das imagens capturadas foi de 300dpi.

Para comparação da fluorescência entre os grupos foi admitido 100% de fluorescência para as estruturas das valvas nativas, VAPN e VAPN, relacionando a fluorescência obtida das estruturas das valvas descelularizadas VAPD e VPPD.

3.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de cúspide e condutos, em cortes longitudinais e transversais, foram fixadas em Karnovski, lavadas em tampão de Cacodilato de Sódio à 0,1M e desidratadas em sequência graduada de álcoois do 50% ao 100%. Então as amostras foram desidratadas fisicamente em ponto crítico (BAL-TEC – CPD030 Dissecador em ponto crítico) para posterior metalização com ouro coloidal (Balzers Union – SDC030). A análise da ultraestrutura de arquitetura da MEC foi realizada por microscópio eletrônico de varredura JEOL 6360 (JEOL, Peabody, MA) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME).

3.4 AVALIAÇÃO DE POR MICROESPECTROSCOPIA RAMAN

A avaliação de superfície da MEC por microespectroscopia Raman foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME). Utilizando o método Raman, que mede a frequência do espalhamento inelástico de uma fonte de luz monocromático, foram obtidos os espectros de cada estrutura das valvas descelularizadas e nativas. A análise foi realizada com o microscópio confocal WiTEC 300R alpha com a objetiva planocromática de 100x, acoplado a um detector CCD ajustado para grade de difração de 600 *grooves*/mm, utilizando laser de diodo no comprimento de onda de 532nm como fonte de excitação. As avaliações foram realizadas em segmentos de valvas cardíacas conservadas em 0,9% de NaCl em

cutre longitudinal de 2,0mm montados sobre lâminas de vidro. Os espectros foram coletados utilizando o modo ponto com 30 segundos de exposição em uma variação de espectro entre 0 e 3800 cm^{-1} . As estruturas avaliadas foram cúspides e condutos nativos e descelularizados. A área da estrutura valvar foi focada nas fibras da MEC, sendo subtraído as células dos tecidos nativos, evitando a interferência nos espectros adquiridos. Os espectros resultantes foram comparados por similaridade.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA LÂMINA BASAL

Para avaliação da lâmina basal foi realizada marcação para laminina (Monoclonal – Dako, Hamburgo; Diluição 1:1600) e colágeno IV (Monoclonal – Abcam, Cambridge; Pré-diluído clone SPM131) com anticorpos monoclonais, incubados em cortes histológicos de 4,0 μm montados em lâminas eletricamente carregadas (Dako, Hamburgo), revelados com polímero (Envision®, Dako, Hamburgo) e contra corados com hematoxilina. Para o controle negativo foi utilizado apenas o polímero de reação sem anticorpo primário. A marcação positiva é indicada pela cor castanha, e o azul da hematoxilina é considerado negativo.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para os anticorpos primários do ensaio de imunofluorescência foram utilizados anti-laminina (monoclonal de coelho – *rabbit mAb* - Sigma) e anti-colágeno IV (monoclonal de camundongo – *mouse mAb* - Abcam, Cambridge - Reino Unido clone SPM131) no mesmo corte histológico. Após a incubação sequencial dos anticorpos primários os cortes foram enxaguados com TBST (137mM de cloreto de sódio, tampão Tris 20mM solução salina e 0,1% de Tween® 20, pH7,6). Então as secções foram

tratadas com anticorpos secundários – anti-IgG de coelho marcado com isotiocianato de anti fluorescein (Dako, Hamburgo, Alemanha) e logo após com IgG anti-IgG de camundongo marcado com tetrametilrodamina isotiocianato (Dako, Hamburgo, Alemanha). As lâminas foram enxaguadas e incubadas com DAPI, durante 15 minutos à temperatura ambiente, enxaguadas mais uma vez com TBST e montado com Fluoroshield® (Sigma, St. Louis). A análise foi realizada no microscópio em Leica D4000. As imunomarcações foram identificadas pelas cores: laminina – verde; colágeno IV – vermelho e núcleos (DAPI) – azul.

3.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Cúspides e segmentos de conduto foram retirados das valvas para análise bioquímica. As amostras foram secas e pesadas, sendo hidrolisadas em 2,0ml de ácido clorídrico 6,0N (Fluka) por 24 horas a 60,0°C, sendo neutralizados com solução de hidróxido de sódio 2,5N.

3.7.1 Conteúdo de colágeno

Os ensaios de quantificação de hidroxiprolina foram realizados por análise colorimétrica seguindo os procedimentos de Edwards&O'Brien, 1980 (EDWARDS, C. A. e O'BRIEN, W. D., JR., 1980), considerando que o conteúdo de hidroxiprolina do colágeno é de 14,0%, o resultado foi expresso em µg de colágeno por mg de tecido seco.

3.7.2 Conteúdo de Glicosaminoglicanos (GAGs)

O ensaio de quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados foi realizado por análise colorimétrica seguindo os procedimentos de Farndale e Murray (1986). Os resultados obtidos foram expressos em μg de glicosaminoglicanos por mg de tecido seco (FARNDALÉ, R. W. e MURRAY, J. C., 1986).

3.7.3 Análises estatísticas das quantificações bioquímicas

A análise estatística dos dados dos ensaios bioquímicos foram realizadas no software de estatística GraphPad Prism 5.0a (San Diego). Foram comparados os resultados das amostras nativas as amostras descelularizadas pelo teste de t de Student, considerando o $p < 0,05$ significativo.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

A análise histomorfológica foi realizada comparando cúspide e conduto das valvas aórtica nativa (VAPN) à valva aórtica descelularizada (VAPD), e valva pulmonar nativa (VPPN) à valva pulmonar descelularizada (VPPD) observando as presença ou ausência de núcleos, organização tecidual, distribuição e composição das fibras de MEC.

4.1.1 Cúspide aórtica

Na coloração de HE foi observado a disposição das células na MEC formando as estruturas da cúspide: fibrosa, esponjosa e ventriculares, nas VAPN (FIGURA 2B). Nas cúspides das VAPD não foram observados núcleos, e a mesma organização estrutural trilaminar (FIGURA 2C).

As fibras da MEC foram diferenciadas pela coloração de Pentacrômico de Rusell-Movat (PRM), corando em preto as fibras elásticas, amarelo as fibras colágenas e azul os glicosaminoglicanos (GAGs), permitindo uma avaliação da disposição, organização e interação entre as fibras. O padrão de arquitetura das fibras foi estabelecido pela observação das valvas nativas, VAPN (FIGURA 2D), servindo como referência para avaliação das valvas descelularizadas VAPD (FIGURA 2E)

Nas cúspides das VAPD (FIGURA 2E) foram observados os mesmos padrões de disposição e interação entre as fibras das VAPN (FIGURA 2D). Na organização trilaminar da cúspide foram observadas fibras colágenas em arranjo transversal interagindo com os GAGs criando tonalidades de verde na camada fibrosa. A camada esponjosa apresentou maior concentração de GAGs, e a camada ventriculares uma fina organização de fibras elásticas. Esta disposição foi preservada nas cúspides da

VAPD (FIGURA 2E) frente as VAPN (FIGURA 2D).

Para avaliação da organização das fibras colágenas foi utilizada a coloração de Picrosyrius Red (PSR) demonstrando a organização das fibras colágenas e sua disposição nas estruturas da cúspides. A organização das fibras foi realizada diferenciando colágeno fibrilar, corado em vermelho, de colágeno reticular, corado em verde, quando analisados os cortes sob luz polarizada. As cúspides das VAPD (FIGURA 2G), conservaram a organização de colágeno fibrilar entrelaçadas por colágeno reticular observadas nas cúspides das VAPN (FIGURA 2F).

A remoção dos elementos celulares, em especial o núcleo, foi avaliada pela coloração de DAPI, que quando observado a luz UV apresenta fluorescência. As cúspides das VAPN (FIGURA 2H) apresentaram diversos núcleos fluorescentes, o que não se repetiu nas cúspides das VAPD (FIGURA 2I). Nas estruturas VAPD e VPPD (FIGURAS 2I e 2I) não foram observadas estruturas fluorescentes com morfologia diferente de núcleos, indicando uma remoção completa de núcleos de células e restos nucleares.

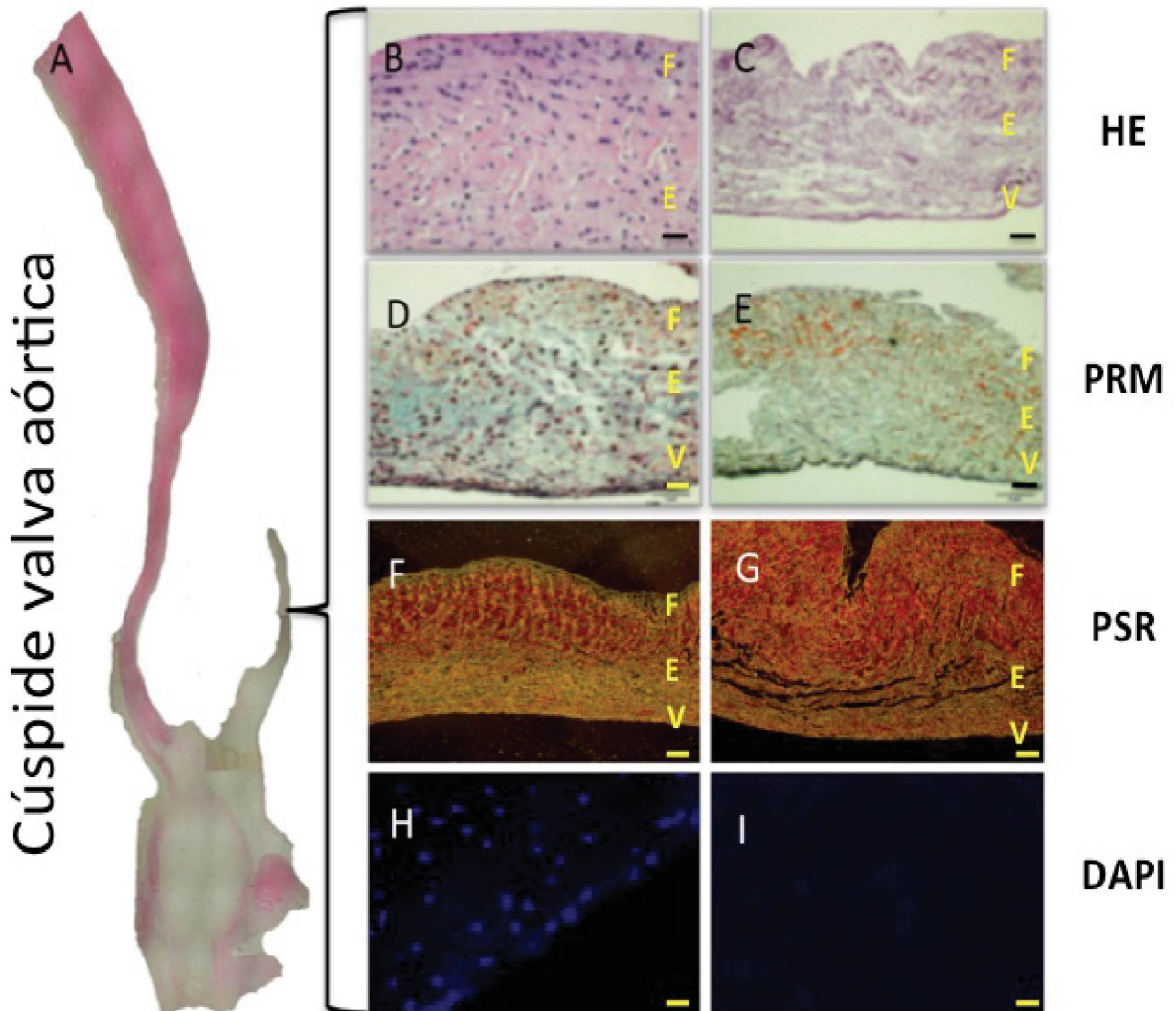


FIGURA 2. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA AÓRTICA (A). OS QUADRO DE B À I MOSTRAM A COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VAPN (B, D, F E H) A VAPD (C, E, G E I). F- CAMADA FIBROSA; E –ESPONGIOSA; V – VENTRICULARIS. NOTE-SE NA COLORAÇÃO DE HE (B E C) A EVIDENTE A REMOÇÃO DE CÉLULAS. QUANDO COMPARADAS AS ESTRUTURA DE MEC PELA COLORAÇÃO DE PRM (D E E) NOTA-SE QUE A ESTRUTURA DA CÚSPIDE DESCELULARIZADA DE MEC MANTÉM A MESMA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS (AMARELO) E ELÁSTICAS (PRETO). NÃO SÃO EVIDENCIADOS OS GAGS (AZUL). JÁ A DISTRIBUIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS, F E G, AVALIADAS PELA COLORAÇÃO DE PSR, DEMONSTROU SIMILARIDADE, APRESENTANDO SEMELHANTE DISPOSIÇÃO ENTRE COLÁGENO FIBRILAR E RETICULAR. A COLORAÇÃO DE DAPI (H E I) CONFIRMOU A REMOÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS PELAS FLUORESCÊNCIA DOS NÚCLEOS NA CÚSPIDE NATIVA (H) E AUSÊNCIA DE FLUORESCÊNCIA NA DESCELULARIZADA (I). AUMENTO DE 200X.
 FONTE: O AUTOR, 2014

4.1.2 Cúspide pulmonar

A valva pulmonar nativa (VPPN) apresenta a arquitetura íntegra, de uma valva saudável, com distribuição de células e organização das fibras de MEC em organização trilaminar: fibrosa, espongiosa e ventricularis. A valva pulmonar descelularizada (VPPD) comparada VPPN, observa-se a ausência de núcleos, mantendo semelhante organização das fibras de MEC. Na coloração de HE as características morfológicas semelhantes (FIGURA 3B e 3C).

A organização da MEC das cúspides das VPPN (FIGURA 3D) apresentam uma organização de fibras mais frouxa quando comparadas as cúspides aórticas (FIGURA 2D), com mais espaços entre as fibras, observados na coloração de PRM. As cúspides das VPPD (FIGURA 3E) apresentaram a mesma disposição de fibras elásticas e colágenas. Não foram observadas fibras rotas nas três estruturas fibrosa, espongiosa e ventriculares.

A coloração azul da camada espongiosa das cúspides das VPPN evidenciada a presença de GAGs, a qual não é evidenciada nas cúspides VPPD, sugerindo que os GAGs foram removidos pela descelularização (FIGURA 3D e 3E).

A organização das fibras colágenas nas cúspides das VPPD (FIGURA 3G) foi similar ao padrão observado de disposição entre colágeno fibrilar e reticular semelhante as cúspides das VPPN (FIGURA 3F), sugerindo que não houve alteração na condição do colágeno.

Em relação a presença de núcleos e material nuclear, avaliadas na coloração de DAPI, as cúspides das VPPN apresentaram de fluorescência e estruturas com morfologia de núcleo (FIGURA 3H), já as VPPD não apresentaram fluorescência, indicado a remoção das células (FIGURA 3I).

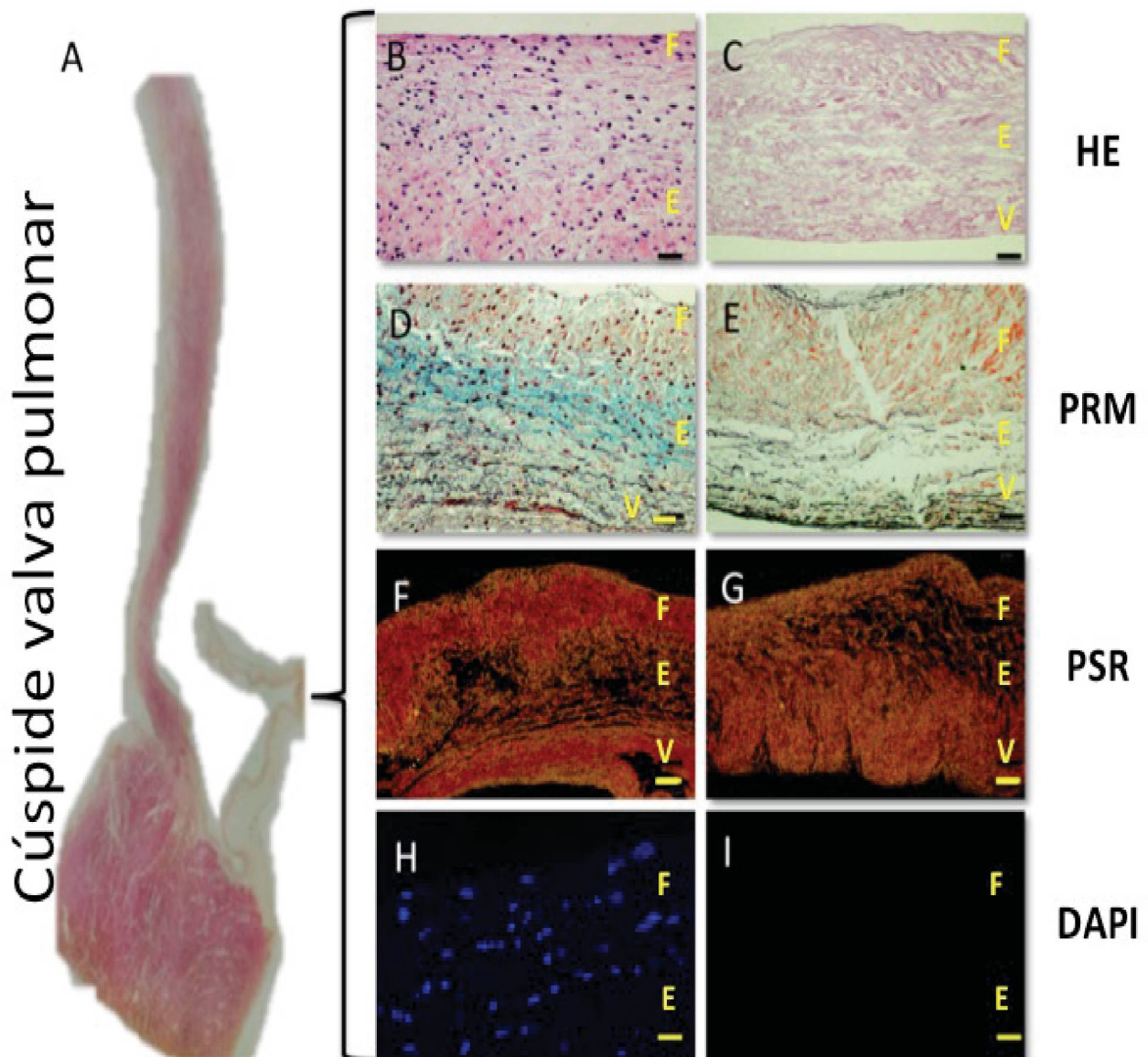


FIGURA 3. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA PULMONAR (A). OS QUADRO DE B À I MOSTRAM A COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VPPN (B, D, F E H) A VPPD (C, E, G E I). F - CAMADA FIBROSA; E - ESPONGIOSA; V - VENTRICULARIS. NOTE-SE NA COLORAÇÃO DE HE (B E C) A EVIDENTE A REMOÇÃO DE CÉLULAS DAS TRÊS CAMADAS DA CÚSPIDE. QUANDO COMPARADAS AS CÚSPIDES PELA COLORAÇÃO DE PRM (D E E) NOTA-SE QUE A ESTRUTURA DE MEC DA CÚSPIDE DESCELULARIZADA APRESENTA UMA ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS (AMARELO) E ELÁSTICAS (PRETO) SEMELHANTE A NATIVA. NÃO SÃO OBSERVADOS OS GAGS (AZUL). JÁ A DISTRIBUIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS F E G, AVALIADAS PELA COLORAÇÃO DE PSR, DEMONSTRÓU SIMILARIDADE ENTRE A CÚSPIDE DA VPPN À VPPD. A COLORAÇÃO DE DAPI (H E I) CONFIRMOU A REMOÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS PELAS FLUORESCÊNCIA DOS NÚCLEOS NA CÚSPIDE NATIVA (H) E AUSÊNCIA DE FLUORESCÊNCIA NA DESCELULARIZADA (I). AUMENTO DE 200X.

FONTE: O AUTOR, 2014.

4.1.3 Conduto aórtico

Os condutos das valvas aórticas compreendem seio de Valsalva e porção proximal da aorta ascendente, caracterizados por duas organizações de MEC. Na coloração de HE observa-se nas VAPN (FIGURA 4B) que a distribuição das células é mais esparsa no seio de Valsalva, quando comparada a porção da aorta ascendente. Quando observados os condutos das VAPD (FIGURA 4C) nota-se que a remoção das células foi evidente no seio de Valsalva e na porção da aorta, também preservando o padrão de organização das fibras da MEC.

As estruturas que formam o conduto foram observadas na coloração de Pentacrômico de Russel-Movat, podendo diferenciar as fibras elásticas e as fibras colágenas apresentando GAGs ligados. A disposição trilaminar do conduto foi alterada pela dissecação, onde foi removida a camada adventícia, restando as camadas íntima, delimitada pela camada elástica interna, e a camada média, que apresenta uma grande concentração de fibras elásticas, características de artérias elásticas.

Os condutos das VAPD (FIGURA 4E) apresentam semelhante distribuição das fibras elásticas e colágenas, mantendo o padrão ondulado na camada média com predominante sentido longitudinal das fibras elásticas, observados nas VAPN (FIGURA 4D).

O padrão de organização das fibras colágenas, observados na coloração de PSR, são semelhantes nos condutos das VAPN (FIGURA 4F) e das VAPD (FIGURA 4G), conservando a prevalência de colágeno fibrilar, arranjado em feixes e organizados por fibras reticulares.

A comparação realizada pela coloração de DAPI dos condutos VAPD aos condutos VAPN demonstra ausência de fluorescência compatível com núcleo nas VAPD (FIGURA 4I), sendo observados núcleos fluorescentes nas VAPN(FIGURA 4H).

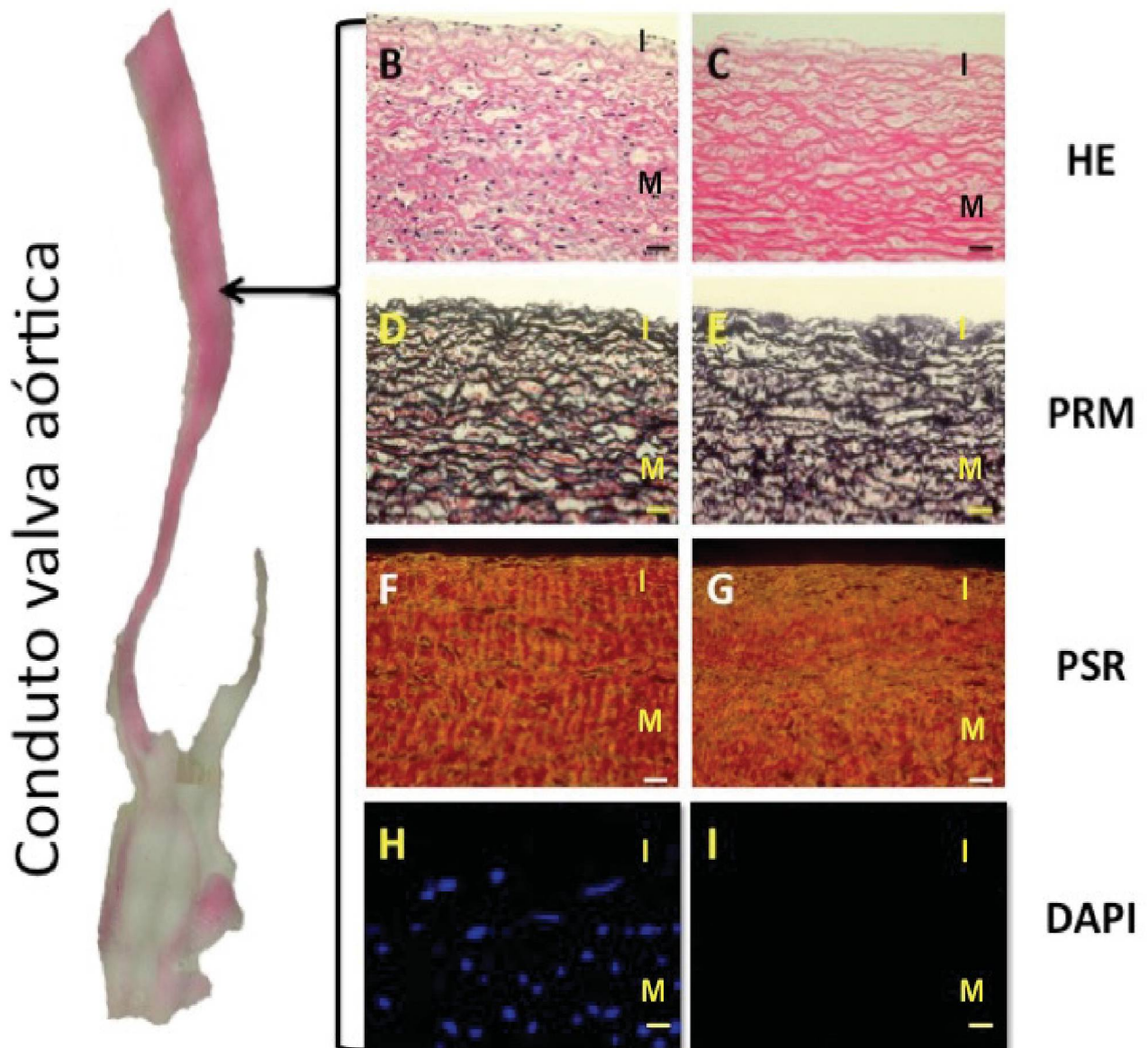


FIGURA 4. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA AÓRTICA (A). OS QUADRO DE B À I MOSTRAM A COMPARAÇÃO DOS CONDUTOS DA VAPN (B, D, F E H) A VAPD (C, E, G E I). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. NOTE-SE NA COLORAÇÃO DE HE (B E C) FICA EVIDENTE A REMOÇÃO DE CÉLULAS DO CONDUTO DA VAPD (C). QUANDO COMPARADAS AS ESTRUTURA DE MEC PELA COLORAÇÃO DE PRM (D E E) NOTA-SE QUE A ESTRUTURA DE MEC DO CONDUTO DESCELULARIZADO (E) MANTÉM SIMILAR ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS ELÁSTICAS (PRETO). NÃO É POSSÍVEL IDENTIFICAR AS FIBRAS COLÁGENAS (AMARELO) E A DISPOSIÇÃO DOS GAGS (AZUL). JÁ A DISTRIBUIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS (F E G), AVALIADAS PELA COLORAÇÃO DE PSR, DEMONSTRAM SIMILARIDADE ENTRE A VAPN E VAPD, CONSERVANDO A DISTRIBUIÇÃO NA VALVA DESCELULARIZADA. A COLORAÇÃO DE DAPI (H E I) CONFIRMOU A REMOÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS PELA FLUORESCÊNCIA DOS NÚCLEOS. NO CONDUTO NATIVO VAPD NOTA-SE A FLUORESCÊNCIA DOS NÚCLEOS (H) E AUSÊNCIA DE FLUORESCÊNCIA NO CONDUTO DESCELULARIZADO DA VAPD (I), INDICANDO A REMOÇÃO DAS CÉLULAS. AUMENTO DE 200X.

FONTE: O AUTOR, 2014

4.1.4 Condutos pulmonares

Os condutos pulmonares constituem por seios de Valsalva e porção proximal da artéria pulmonar. Por ser a continuidade de uma artéria elástica os condutos pulmonares possuem a mesma organização trilaminar de artérias elásticas: íntima média e adventícia. Durante a dissecação das valvas pulmonares foi removida a camada adventícia, restando apenas as camadas íntima e média.

A avaliação pela coloração de HE dos condutos das VPPN (FIGURA 5B) demonstrou a distribuição normal das células entre as camadas da MEC, a qual apresenta fibras mais frouxas quando comparada a MEC de conduto de valva aórtica. Distribuição das fibras da MEC semelhante foi observada nos condutos de VPPD (FIGURA 5C), com ausência de células.

A composição das fibras da MEC é observada pela coloração de PRM, diferenciando fibras elásticas, que predominam na camada média, a fibras colágenas que une feixes de fibras elásticas. Nos condutos das VPPN (FIGURA 5D) a lâmina elástica interna define os limites entre as camadas íntima e média, com feixes de fibras elásticas onduladas. Os condutos das VPPD (FIGURA 5E) apresentam semelhante organização, apresentando a distribuição das fibras elásticas em feixes na camada média, porém com um leve afastamento entre cada feixe.

Nos condutos a observação da coloração azul que indica os GAGs fica comprometida pela coloração preta das fibras elásticas, não sendo a metodologia mais adequada para avaliação dos GAGs.

A organização das fibras colágenas dos condutos das VPPN demonstram uma distribuição do colágeno fibrilar no sentido longitudinal na camada média e colágeno reticular na camada íntima (FIGURA 5F). Os condutos das VPPD demonstram semelhante organização colágena, indicando preservação da condição das fibras colágenas (FIGURA 5G).

Nas avaliação da remoção dos células e elementos pela coloração de DAPI os condutos das VPPN apresentavam núcleos fluorescentes (FIGURA 5H), enquanto os condutos das VPPD não apresentavam fluorescência, sugerindo a completa remoção

de núcleos. (FIGURA 5I).

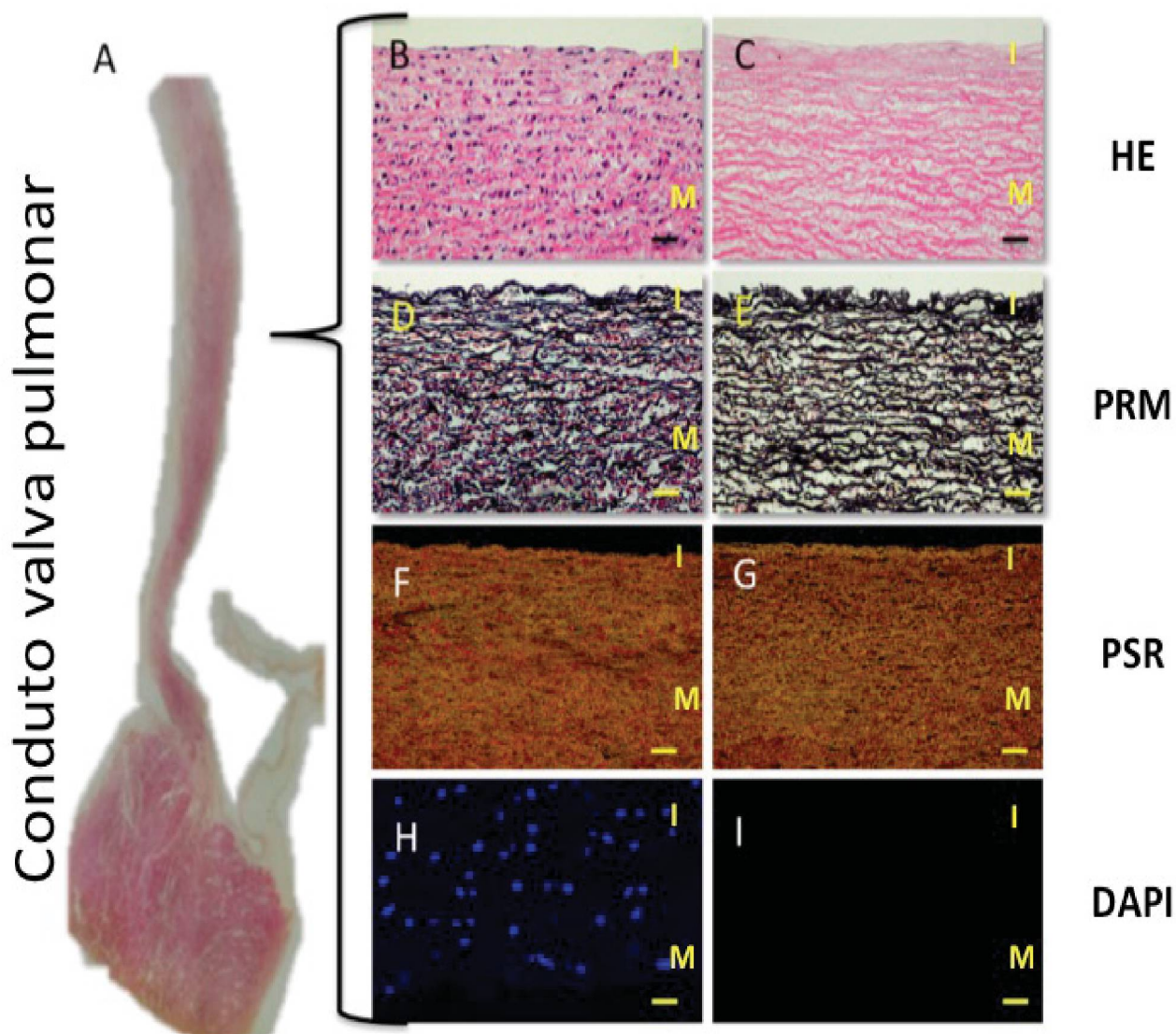


FIGURA 5. CORTE LONGITUDINAL DA VALVA PULMONAR (A). OS QUADRO DE B À I MOSTRAM A COMPARAÇÃO DA CÚSPIDE DA VPPN (B, D, F E H) A VPPD (C, E, G E I). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. NOTE-SE NA COLORAÇÃO DE HE (B E C) A EVIDENTE REMOÇÃO DE CÉLULAS. QUANDO COMPARADOS OS CONDUTOS PELA COLORAÇÃO DE PRM (D E E) NOTA-SE NO CONDUTO DESCELULARIZADO QUE A ESTRUTURA DE MEC FOI CONSERVADA APRESENTANDO SIMILAR ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS E ELÁSTICAS (PRETO). NÃO É POSSÍVEL IDENTIFICAR AS FIBRAS COLÁGENAS (AMARELO) E A DISTRIBUIÇÃO DOS GAGS (AZUL). QUANDO AVALIADAS PELA COLORAÇÃO DE PSR A DISTRIBUIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS (F E G), DEMONSTROU SIMILARIDADE. OBSERVA-SE ESPAÇOS DEIXADOS PELAS CÉLULAS NO CONDUTO DA VPPD. A COLORAÇÃO DE DAPI (H E I) CONFIRMOU A REMOÇÃO DAS CÉLULAS MARCADAS PELAS FLUORESCÊNCIA DOS NÚCLEOS NA CÚSPIDE NATIVA (H) E AUSÊNCIA DE FLUORESCÊNCIA NA DESCELULARIZADA (I). AUMENTO DE 200X.

FONTE: O AUTOR, 2014.

4.1.5 Análise morfométrica da fluorescência dos núcleos

A análise morfométrica da fluorescência dos núcleos corados com DAPI é descrita na TABELA 1, comparando os resultados das estruturas cúspide e conduto das VAPN e VPPN às VAPD e VPPD, respectivamente.

TABELA 1. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA FLUORESCÊNCIA DE DAPI PARA MARCAÇÃO DE NÚCLEOS.

		Cúspide aórtica	Conduto aórtico	Cúspide pulmonar	Conduto pulmonar
Fluorescência do material nuclear corado em DAPI (%)	Nativo	100%	100%	100%	100%
	Descelularizado	0,44%	0,21%	0,13%	0,19%

4.2 AVALIAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DA MEC – MEV

As avaliações da ultraestrutura da MEC permite aferir danos as fibras que não podem ser observados pela histomorfologia. Cortes longitudinais e transversais permitiram a observação da disposição das fibras da MEC nas estruturas valvares. Comparando as estruturas valvares cúspide e conduto das VAPN e VPPN à VAPD e VPPD, respectivamente, descreve-se um perfil de organização da arquitetura da MEC.

Os cortes longitudinais das valvas permitem uma comparação aos resultados da histomorfologia indicando a disposição das fibras da MEC. Já os cortes transversais permitem uma observação da superfície da MEC, mais especificamente da camada fibrosa das cúspides e da camada íntima dos condutos, apresentando a superfície das estruturas, que quando implantadas são o primeiro contato com as células.

4.2.1 Cúspides aórticas

Os cortes longitudinais das cúspides das VAPN permitiram a observação da organização das fibras colágenas na camada fibrosa (FIGURA 6A). Quando comparados as cúspides VAPN às VAPD apresentam similaridade quanto a disposição e arranjo das fibras (setas), sugerindo uma preservação após a remoção das células. Não há evidências de danos as fibras (FIGURA 6A e 6B).

Os cortes transversais das cúspides das VAPN apresentam contornos mais suaves, sugerindo a superfície das células (FIGURA 6C), já os cortes longitudinais das cúspides das VAPD apresentam aspectos mais irregulares, sugerindo a exposição das fibras da MEC da camada fibrosa (FIGURA 6D).

4.2.2 Conduto aórtico

Os cortes longitudinais dos condutos das VAPN demonstram a organização das fibras da camada média em feixes interligados por fibras menores (FIGURA 6E), padrão semelhante observado nos condutos das VAPD (FIGURA 6F). Não foram observados danos evidentes as fibras e a arquitetura das VAPD. As fibras descontínuas que estão em primeiro plano da imagem são devido a secção longitudinal do conduto.

Os cortes transversais dos condutos das VAPN apresentam os contornos suaves sugerindo a superfície das células (FIGURAS 6G), já os condutos das VAPD apresentaram superfície irregular, sugerindo um plano formado por feixes de MEC da camada íntima (FIGURAS 6H). Não foram observados rompimento ou compactação das fibras nos condutos das VAPD.

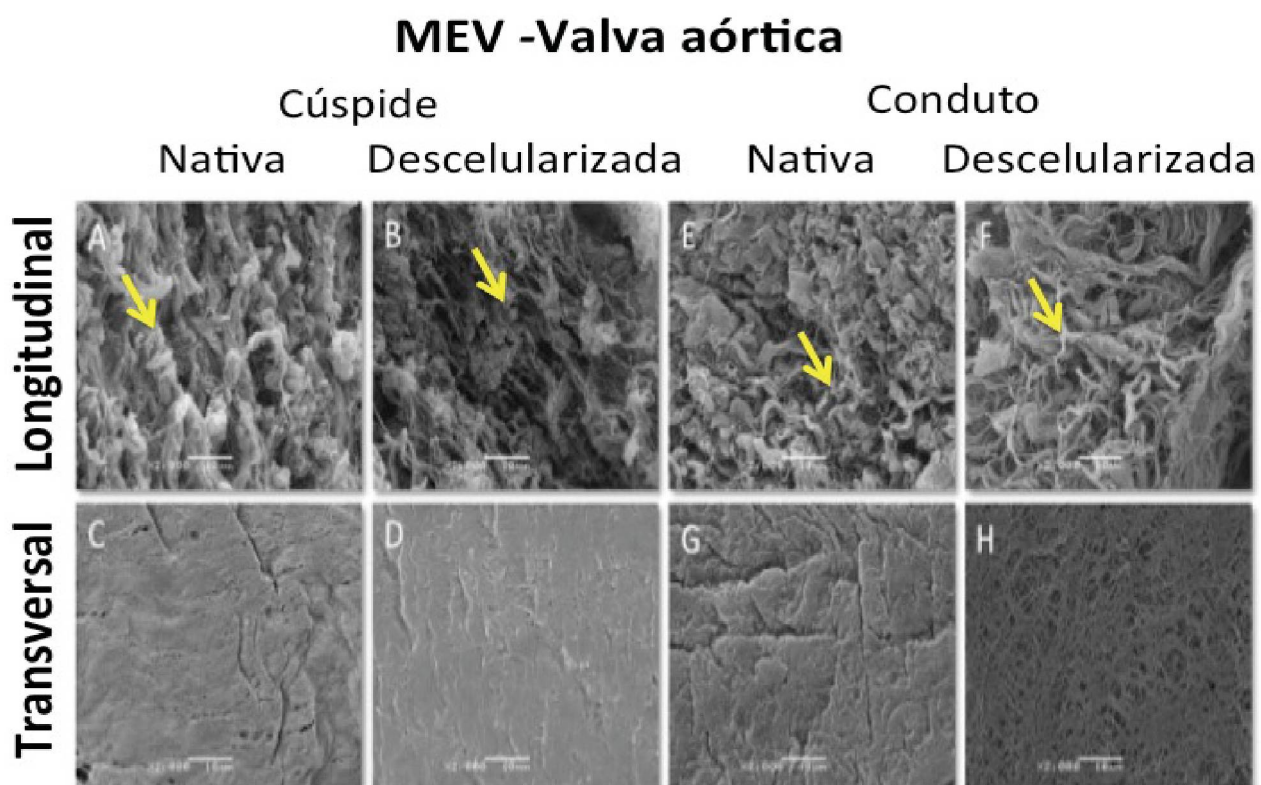


FIGURA 6. A ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DA MEC DA VALVA AÓRTICA (A A H). A ULTRAESTRUTURA DA CÚSPIDE FOI CONSERVADA APÓS A REMOÇÃO DE CÉLULAS, EVIDENCIADO PELA PRESERVAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS NOS CORTES LONGITUDINAIS E TRANSVERSAIS, MANTENDO A ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS (SETAS). AS IMAGENS SUGEREM QUE NÃO HOUE DANO A ARQUITETURA DA MEC DAS ESTRUTURAS DAS VAPD. A- CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DA VAPN, SETA INDICA FIBRA COM ORIENTAÇÃO; B- CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DA VAPD, SETA INDICA FIBRA COM ORIENTAÇÃO; C- CORTE LONGITUDINAL DA CÚSPIDE DE VAPN; D- CORTE LONGITUDINAL DA CÚSPIDE DE VAPD. E- CORTE TRANSVERSAL DO CONDUTO DA VAPN; F- CORTE TRANSVERSAL DO CONDUTO DA VAPD; G- CORTE LONGITUDINAL DO CONDUTO DA VAPN; D- CORTE LONGITUDINAL DO CONDUTO DA VAPD. AUMENTO 5000X.
 FONTE: O AUTOR,2014.

4.2.3 Cúspides pulmonares

Os cortes longitudinais das cúspides das VPPN apresentaram uma disposição da camada fibrosa com fibras paralelas próximas, sendo o mesmo padrão observado na histomorfologia. Quando comparados as cúspides VPPN às VPPD não apresentam diferenças quanto a disposição e arranjo das fibras, sugerindo que não houve alteração a arquitetura da MEC (FIGURA 7A e 7B).

Os cortes transversais das cúspides das VPPN apresentam estruturas compatíveis com células sobre uma organização de feixes de fibras de MEC. As cúspides das VPPD apresentam aspectos mais irregulares, sugerindo a exposição das fibras da MEC mantida em organização de feixes de fibras colágenas densas organizadas em trama (FIGURA 7C e 7D).

4.2.4 Conduto pulmonar

A observação dos cortes longitudinais de condutos das VPPN (FIGURA 7E). evidenciou uma diferença na organização da fibras da MEC, quando comparadas aos condutos das VAPN (FIGURA 7E e 7F).

Nos cortes transversais os condutos das VPPN (FIGURA 7G) a superfície apresenta contornos suaves, sugerindo a superfície de células. Com um padrão diferente os cortes transversais das VPPD(FIGURA 7H) nota-se uma superfície irregular sugerindo exposição da camada íntima com fibras da MEC mais densas.

Embora não sejam observados danos evidentes como ruptura de fibras, espaços ou compactação das fibras, não é possível comprovar a conservação da arquitetura da MEC por não haver semelhanças entre as imagens analisadas.

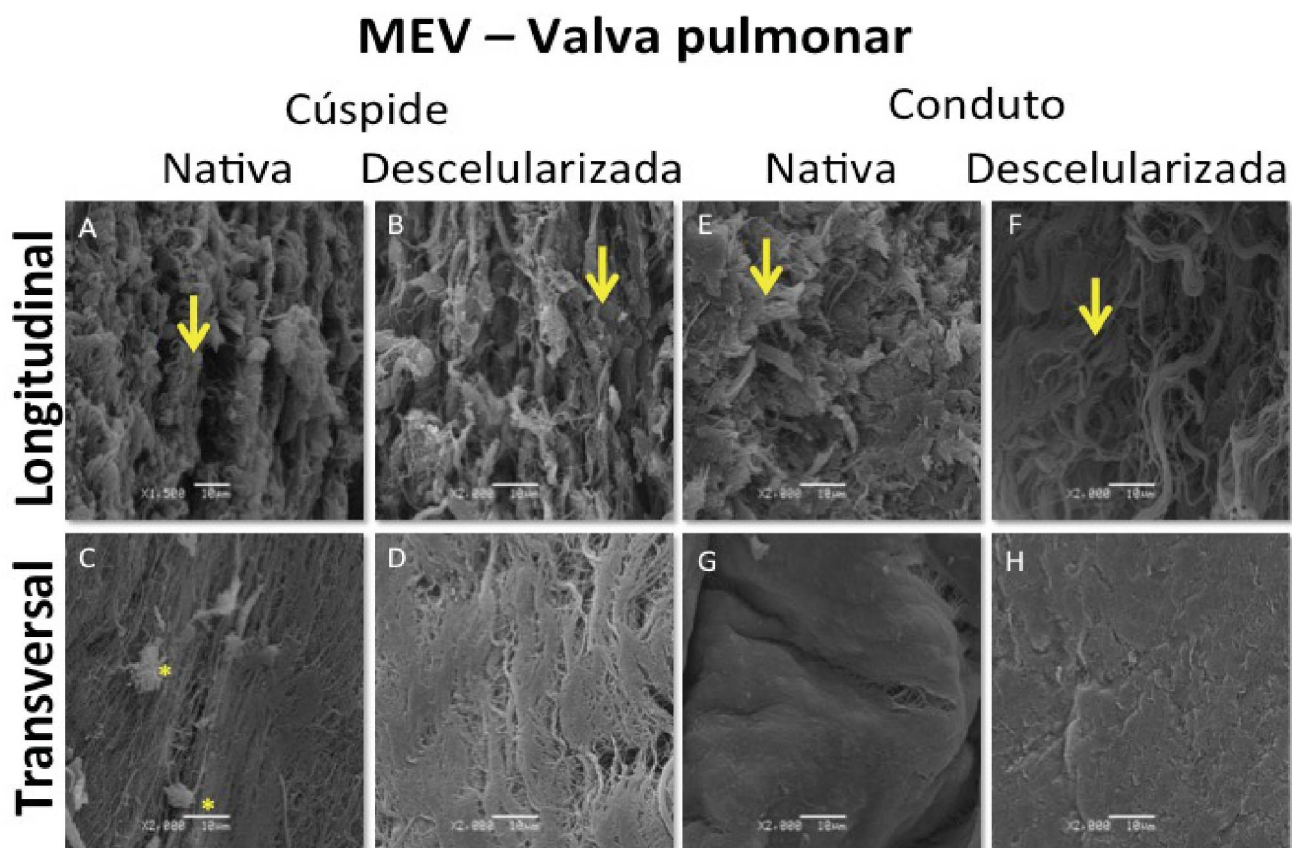


FIGURA 7. A ANÁLISE DA ULTRAESTRUTURA DA MEC DA VALVA PULMONAR (A A H). A ULTRAESTRUTURA DA CÚSPIDE FOI CONSERVADA APÓS A REMOÇÃO DE CÉLULAS, EVIDENCIADO PELA PRESERVAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS NOS CORTES LONGITUDINAIS E TRANSVERSAIS, MANTENDO A ORIENTAÇÃO DAS FIBRAS (SETAS). A- CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DA VPPN; B- CORTE TRANSVERSAL DA CÚSPIDE DA VPPD; C- CORTE LONGITUDINAL DA CÚSPIDE DE VPPN *- ESTRUTURAS SIMILARES A CÉLULAS; D- CORTE LONGITUDINAL DA CÚSPIDE DE VPPD. E- CORTE TRANSVERSAL DO CONDUTO DA VPPN; F- CORTE TRANSVERSAL DO CONDUTO DA VPPD; G- CORTE LONGITUDINAL DO CONDUTO DA VPPN; D- CORTE LONGITUDINAL DO CONDUTO DA VPPD. AUMENTO 5000X.

FONTE: O AUTOR, 2014

4.3 ANÁLISE POR MICROESPECTROSCOPIA RAMAN - MR

A integridade das proteínas que constituem a MEC foi avaliada através de microespectroscopia de RAMAN analisando as fibras da MEC. Nas avaliações as estruturas de cúspide e conduto das valvas nativas (VAPN e VPPN) foram comparadas valvas descelularizadas(VAPD e VPPD) através de similaridade entre os espectros.

As análise forma focadas na maior amplitude de espectros entre 0 e 3800 rel/cm a fim de observar qualquer alteração quanto a constituição química das amostras.

4.3.1 Cúspides aórticas

Comparando os espectros das cúspides das VAPN ao espectro das cúspides das VAPD nota-se a semelhança entre os picos entre 700 e 1800 rel/cm quanto ao posicionamento e intensidade, sugerindo que a composição química não foi alterada pelo processo de descelularização (FIGURA 8).

4.3.2 Condutos aórticos

A comparação dos espectros dos condutos das VAPD com os espectros dos condutos das VAPN, também demonstrou similaridade nos picos entre 700 e 1800 rel/cm , sugerindo que não houve alterações nas proteínas das fibras de MEC (FIGURA 8).

SERS - Valva aórtica

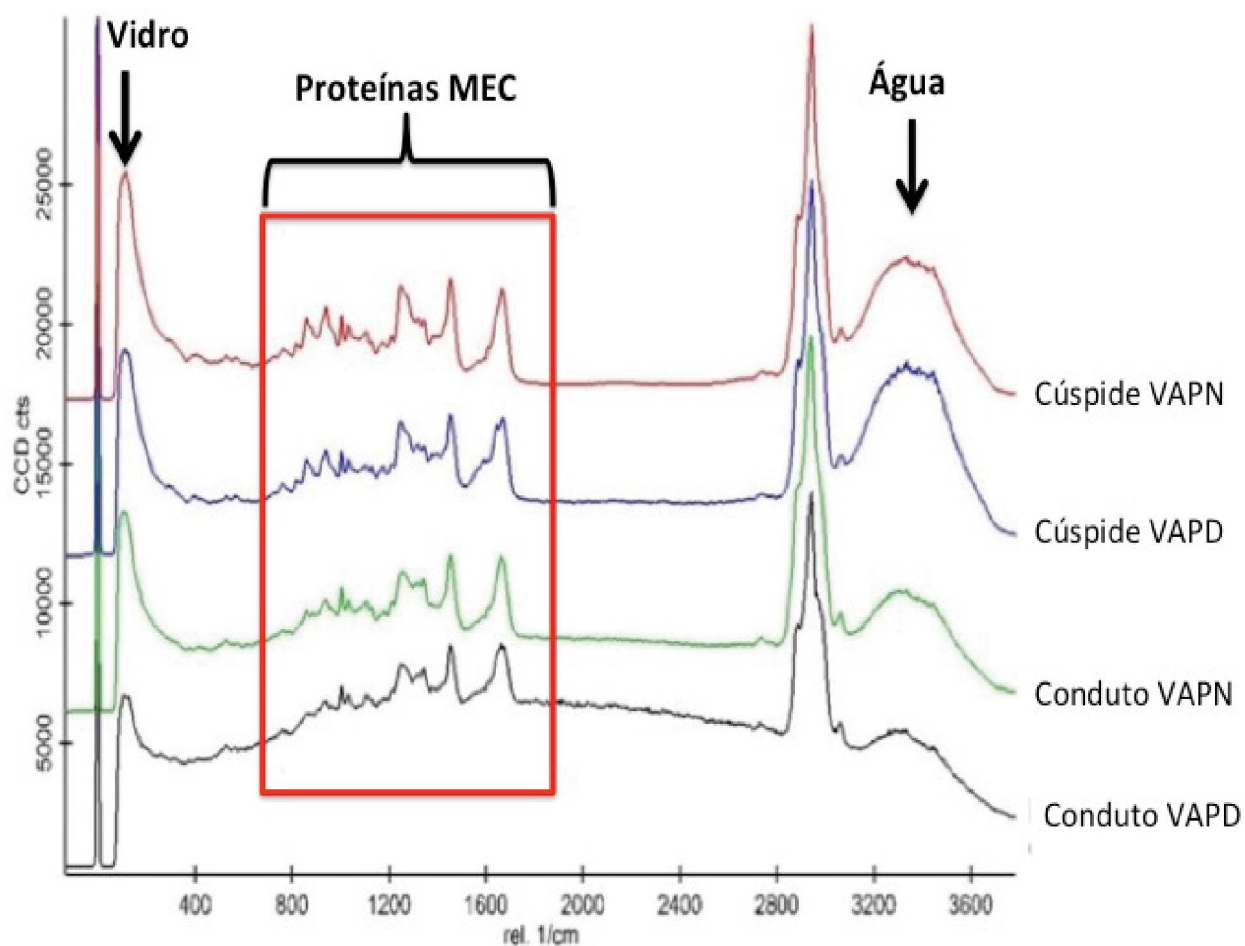


FIGURA 8. ESPECTROS RAMAN DE CÚSPIDE E DO CONDUTO DE VALVAS AÓRTICAS DESCELULARIZADAS (VAPD) COMPARANDO AS NATIVAS (VAPN). A ANÁLISE DEMONSTRA SIMILARIDADE ENTRE OS ESPECTROS OBTIDOS DAS ESTRUTURAS DESCELULARIZADAS AS NATIVAS, SUGERINDO QUE NÃO HOUE DETERIORAÇÃO OU ALTERAÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS.

FONTE: O AUTOR, 2014

4.3.3 Cúspides pulmonares

Comparando os espectros das cúspides das VPPN ao espectro das cúspides das VPPD nota-se semelhança entre os picos entre 700 e 1800 rel/cm , embora apresentem variação na intensidade dos picos, possivelmente pela área da amostra analisada apresentar fibras da MEC mais afastadas. As análises indicam que a composição química não foi alterada pelo processo de descelularização (FIGURA 9).

4.3.4 Condutos pulmonares

A comparação dos espectros dos condutos das VPPD com os espectros dos condutos das VPPN, também demonstrou similaridade, sugerindo que não houve alterações nas proteínas das fibras de MEC (FIGURA 9), sugerindo conservação da estrutura de MEC após a descelularização.

SERS - Valva pulmonar

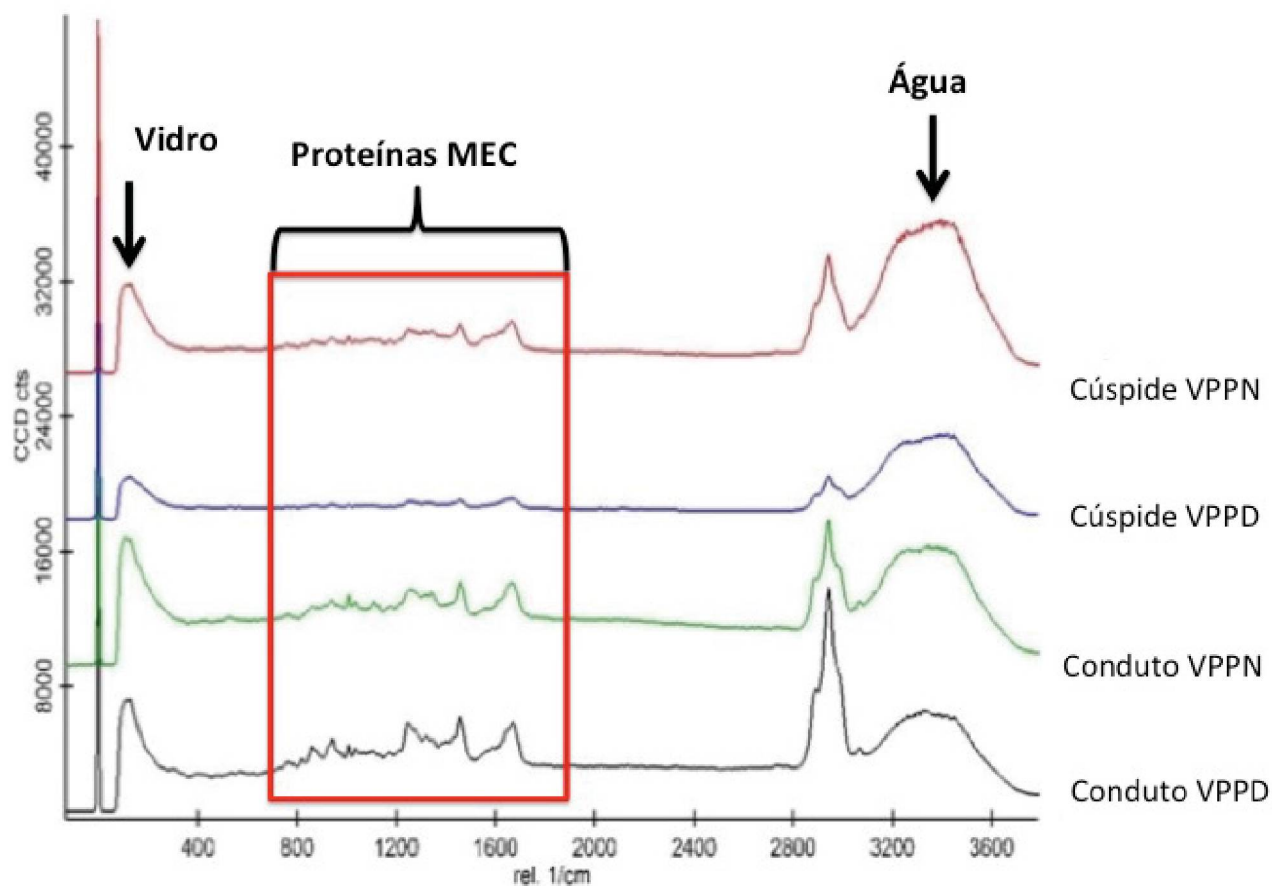


FIGURA 9. ESPECTROS RAMAN DE CÚSPIDE E DO CONDUTO DE VALVAS PULMONARES DESCELULARIZADAS (VPPD) COMPARANDO AS NATIVAS (VPPN). A ANÁLISE DEMONSTRA SIMILARIDADE ENTRE OS ESPECTROS OBTIDOS DAS ESTRUTURAS DESCELULARIZADAS AS NATIVAS, SUGERINDO QUE NÃO HOUE DETERIORAÇÃO OU ALTERAÇÃO QUÍMICA DAS ESTRUTURAS. O ESPECTRO DA CÚSPIDE VPPD APRESENTA MENOR INTENSIDADE DOS PICOS POSIVELMENTE DEVIDO A DENSIDADE DE FIBRAS DE MEC NA ÁREA ANALISADA. FONTE: O AUTOR, 2014

4.4 PRESERVAÇÃO DA LÂMINA BASAL - IMUNOHISTOQUÍMICA PARA LÂMINA BASAL

A lâmina basal foi identificada pela imunomarcção de duas proteínas constituintes: colágeno IV e laminina.

As imunomarcções positivas para colágeno IV e laminina identificaram a disposição da lâmina basal nas cúspide e condutos das VAPN e VPPN, descrevendo um padrão para comparação as cúspides e condutos as VAPD e VPPD, respectivamente.

4.4.1 Imunohistoquímica

4.4.1.1 Cúspide aórtica

A cúspide das VAPN apresentou colágeno IV distribuído pela superfície das camadas fibrosa e ventriculares (FIGURA 10A). Também laminina foi evidenciada nas mesmas camadas (FIGURA 10C). O padrão de distribuição de colágeno IV (FIGURA 10B) e laminina (FIGURA 10D) foi semelhante nas cúspides das VAPD (FIGURA 10B e 10D). A imunomarcção corrobora com os dados da literatura apresentando positividade abaixo do endotélio.

Imunomarcção para lâmina basal – cúspide aórtica

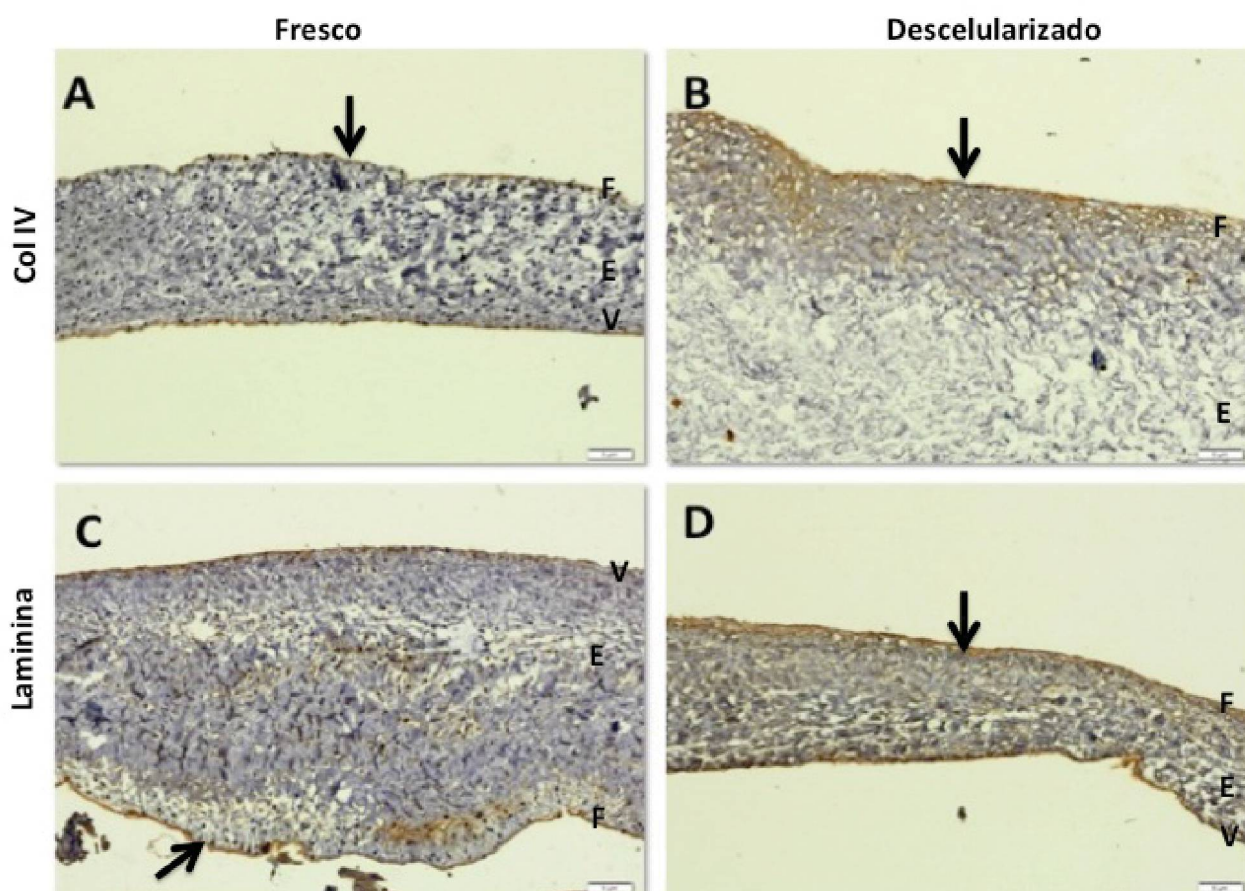


FIGURA 10. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CÚSPIDES DE VALVAS AÓRTICAS NATIVAS E DESCELULARIZADAS. F –CAMADA FIBROSA; E – CAMADA ESPONGIOSA; V – CAMADA VENTRICULARIS. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. MARCAÇÃO POSITIVA COR CASTANHA. A- CÚSPIDE AÓRTICA NATIVA – COL IV; B-CÚSPIDE AÓRTICA DESCELULARIZADA – COL IV; C-CÚSPIDE AÓRTICA NATIVA – LAMININA; D- CÚSPIDE AÓRTICA DESCELULARIZADA - LAMININA. AUMENTO 200X. FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.1.2 Cúspide pulmonar

A cúspide das VPPN apresentou colágeno IV distribuído pela superfície das camadas fibrosa e ventriculares (FIGURA 11A). Também laminina foi evidenciada nas mesmas camadas (FIGURA 11C). O padrão de distribuição de colágeno IV (FIGURA 11B) e laminina (FIGURA 11D) foi semelhante nas cúspides das VAPD.

Imunomarcação para lâmina basal – cúspide pulmonar

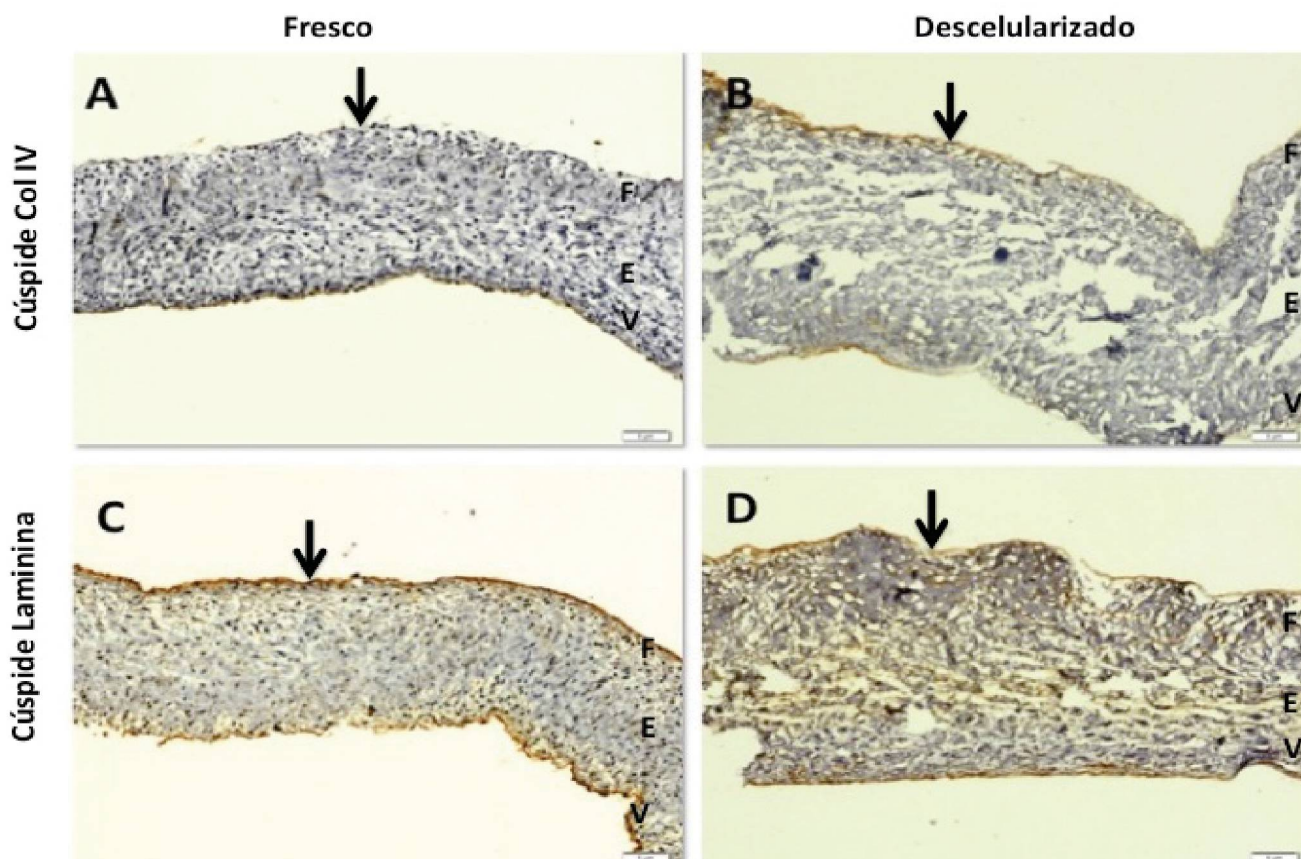


FIGURA 11. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CÚSPIDES DE VALVAS PULMONARES NATIVAS E DESCELULARIZADAS. F –CAMADA FIBROSA; E – CAMADA ESPONGIOSA; V – CAMADA VENTRICULARIS. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. MARCAÇÃO POSITIVA COR CASTANHA. A- CÚSPIDE PULMONAR NATIVA – COL IV; B-CÚSPIDE PULMONAR DESCELULARIZADA – COL IV; C- CÚSPIDE PULMONAR NATIVA – LAMININA; D- CÚSPIDE PULMONAR DESCELULARIZADA – LAMININA. AUMENTO 200X.

FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.1.3 Conduto aórtico

A conduto das VAPN apresentou colágeno IV distribuído em feixe pela superfície da camada íntima e de forma difusa na camada média (FIGURA 12A). Também a laminina foi evidenciada na camada íntima de forma de feixe e na camada média de forma difusa (FIGURA 12C). O padrão de distribuição de colágeno IV (FIGURA 12B) e laminina foi semelhante nos condutos VAPD aos condutos VAPN. Nos condutos VAPD a camada média apresenta maior positividade (FIGURA 12D).

Imunomarcação para lâmina basal – conduto aórtico

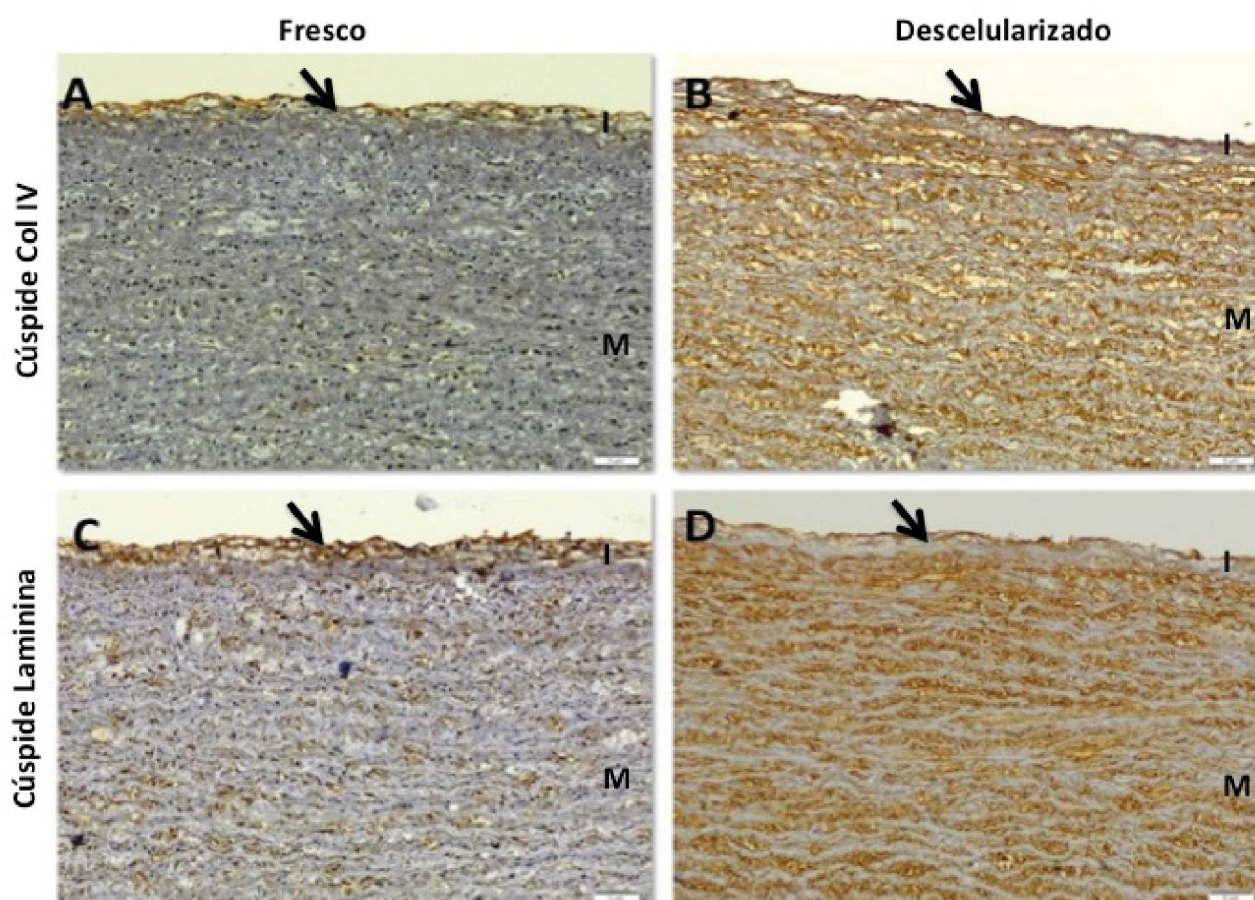


FIGURA 12. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CONDUTOS DE VALVAS AÓRTICAS NATIVAS E DESCELULARIZADAS. I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. MARCAÇÃO POSITIVA COR CASTANHA. A- CÚSPIDE AÓRTICA NATIVA – COL IV; B-CÚSPIDE AÓRTICA DESCELULARIZADA – COL IV; C-CÚSPIDE AÓRTICA NATIVA – LAMININA; D- CÚSPIDE AÓRTICA DESCELULARIZADA - LAMININA. AUMENTO 200X.

FUNTE: O AUTOR, 2014

4.4.1.4 Conduto pulmonar

A conduto das VPPN apresentou colágeno IV distribuído em feixe pela superfície da camada íntima e de forma difusa na camada média (FIGURA 13A). A laminina foi evidenciada na camada íntima em forma de feixe e na camada média de forma difusa (FIGURA 13C). O padrão de distribuição de colágeno IV (FIGURA 13B) e laminina (FIGURA 13D) foi semelhante nas cúspides VPPD às VPPN.

Imunomarcação para lâmina basal – conduto pulmonar

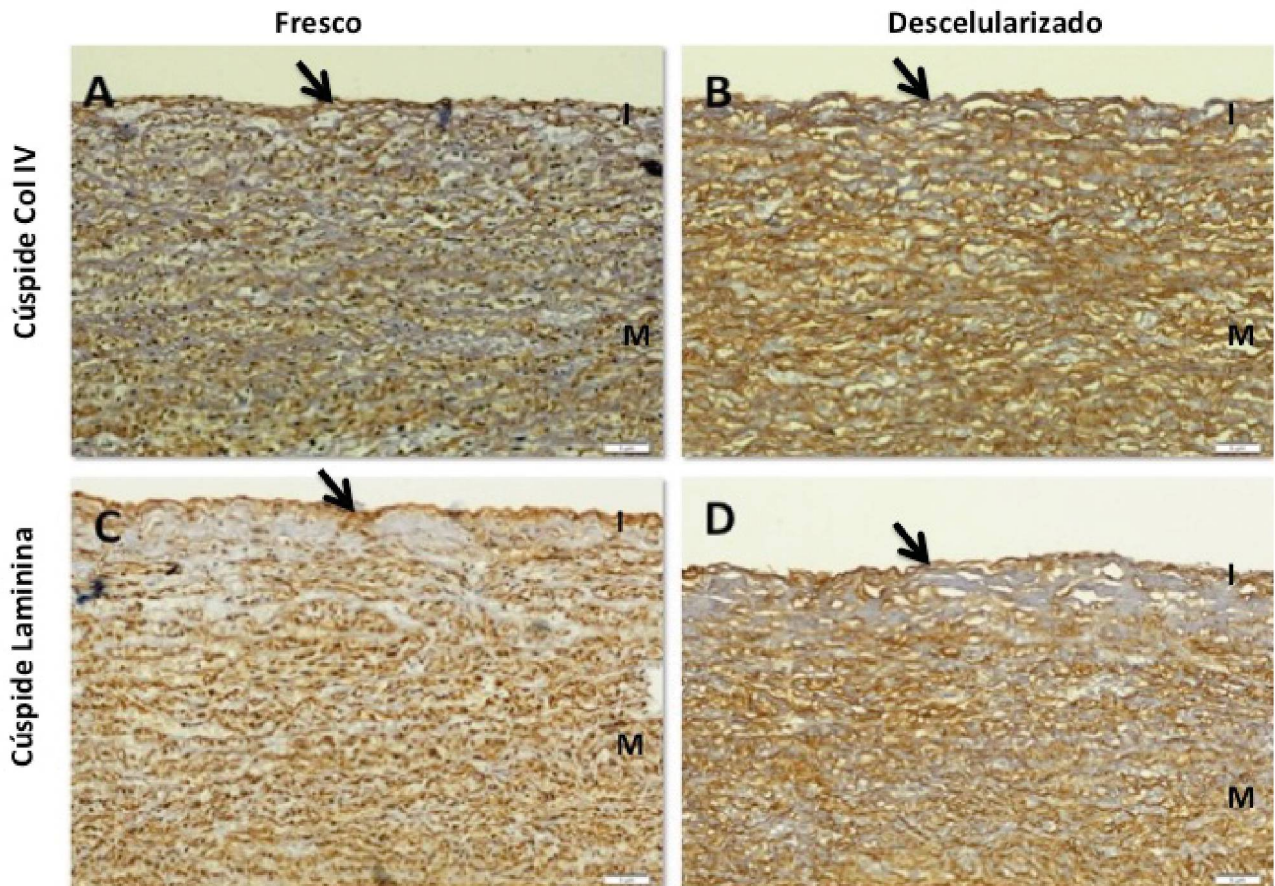


FIGURA 13. IMUNOMARCAÇÃO PARA LAMININA E COLÁGENO IV EM CONDUTOS DE VALVAS PULMONARES NATIVAS E DESCELULARIZADAS. I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. MARCAÇÃO POSITIVA COR CASTANHA. A- CONDUTO PULMONAR NATIVA – COL IV; B-CONDUTO PULMONAR DESCELULARIZADA – COL IV; C-CONDUTO PULMONAR NATIVA – LAMININA; D-CONDUTO PULMONAR DESCELULARIZADA- LAMININA. AUMENTO 200X.

FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.2 Imunofluorescência – co-localização de colágeno IV e laminina

A co-localização dos constituintes da lâmina basal colágeno IV e laminina permite uma avaliação da estrutura da lâmina basal.

As disposições de colágeno IV e laminina seguem o mesmo padrão descrito na imunohistoquímica. Nesta análise é observado a co-localização da lâmina basal evidenciando sua posição no tecido das cúspides e condutos aórticos e pulmonares, de valvas porcinas. Também é possível relacionar a presença de colágeno IV e laminina ao redor das células que tem o núcleo marcado por DAPI.

4.4.3 Cúspide aórtica nativa

A co-localização de laminina (verde) e colágeno IV (vermelho) na FIGURA 14D, demonstra a lamina basal na cúspide das VAPN, com distribuição semelhante ao observado nas imunomarcações. Nos cortes longitudinais é possível observar a distribuição de laminina e colágeno IV na camada média, observada nas imunomarcações.

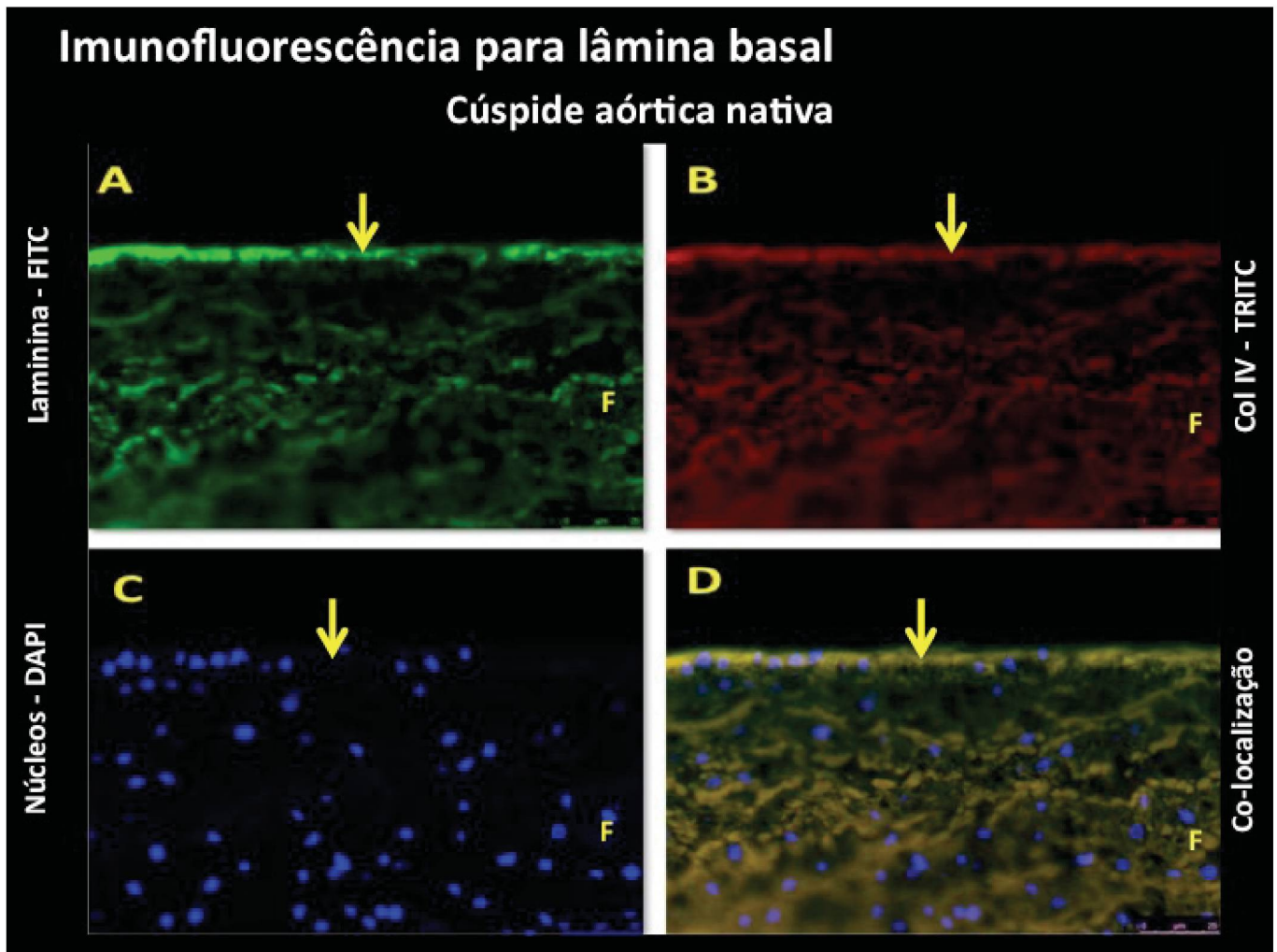


FIGURA 14. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA AÓRTICA NATIVA (VAPN). F – CAMADA FIBROSA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NA CÚSPIDE DE VAPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400X. FONTE: O AUTOR, 2014.

4.4.4 Cúspide aórtica descelularizadas

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 15D, evidencia laminina e colágeno IV em uma distribuição similar a observada nas cúspides das VAPN. Comparando as cúspides das VAPD as VAPN sugere-se que a estrutura e disposição da lamina basal são conservadas na cúspide das VAPD, após o processo de descelularização, que é demonstrado pela ausência dos núcleos corados em DAPI.

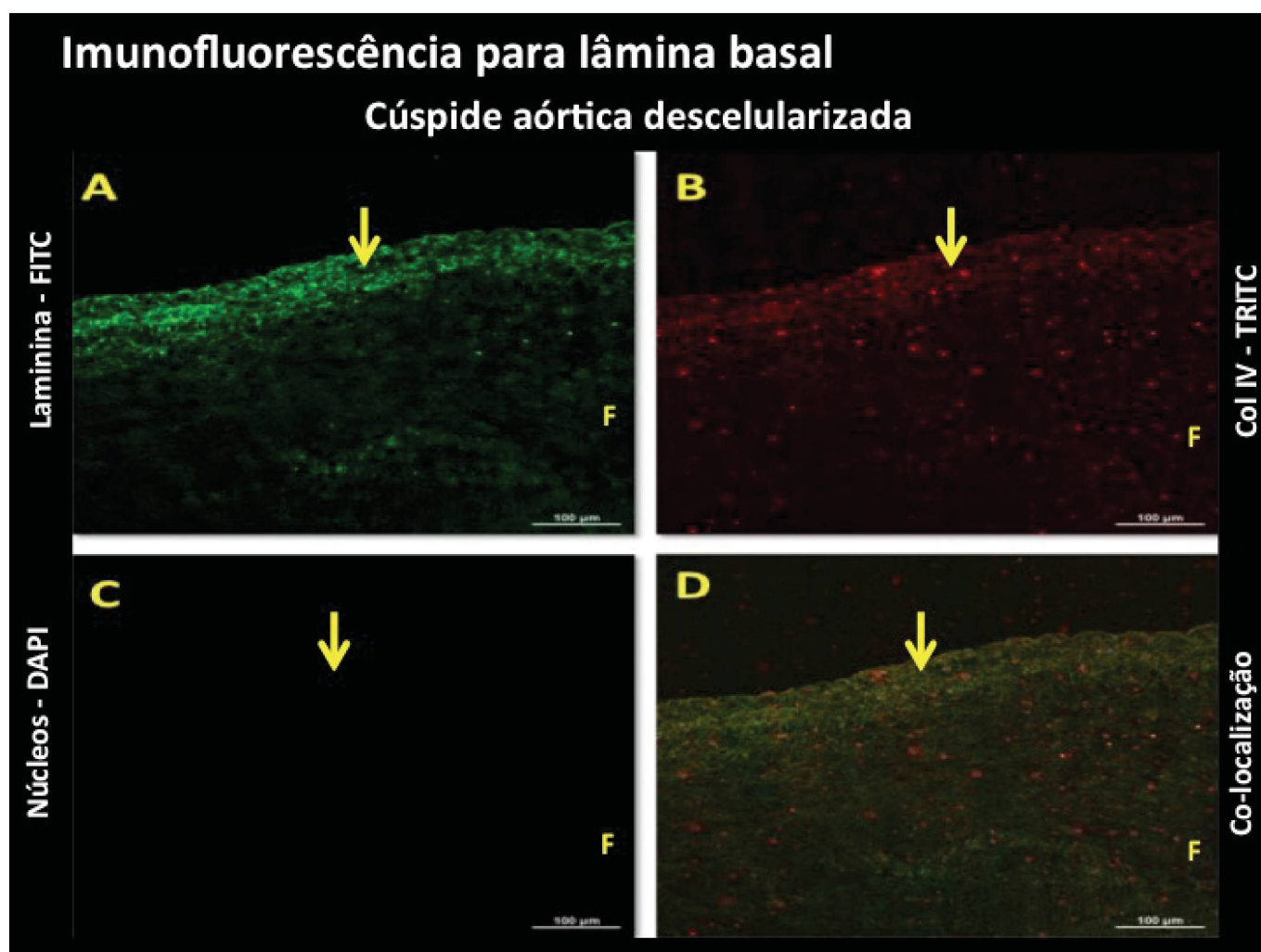


FIGURA 15. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA AÓRTICA DESCELULARIZADA (VAPD). F – CAMADA FIBROSA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NA CÚSPIDE DE VAPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI, NÃO OBSERVADOS PELA DEVIDO A DESCELULARIZAÇÃO. AUMENTO DE 400X. FONTE: O AUTOR, 2014.

4.4.5 Conduto aórtico nativo

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 16D, demonstra a lamina basal no conduto das VAPN. Fica evidente a maior concentração de laminina e colágeno IV na camada logo abaixo do endotélio, compreendendo uma justa posição a camada íntima do conduto das VAPN.

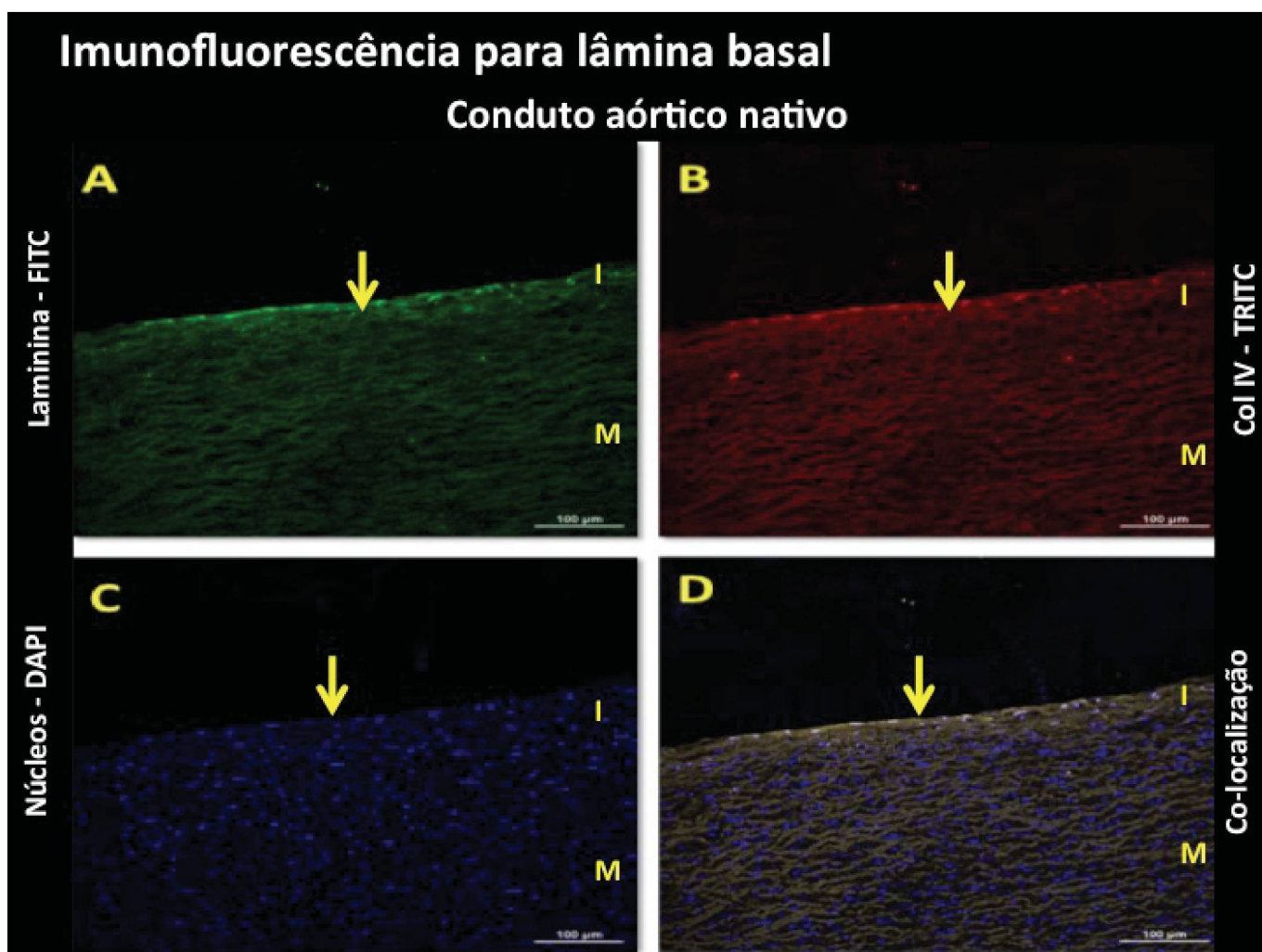


FIGURA 16. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO VALVA AÓRTICA NATIVA (VAPN). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NO CONDUTO DE VAPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400X.

FONTE: O

AUTOR, 2014

4.4.6 Conduto aórtico descelularizado

A co-localização de laminina (verde) e colágeno IV (vermelho) na FIGURA 17D, sugere a que estrutura da lamina basal no conduto das VAPD foi preservada pela presença da laminina e colágeno IV justa postos. No conduto da VAPD fica evidente a remoção dos núcleos pela ausência de fluorescência para DAPI.

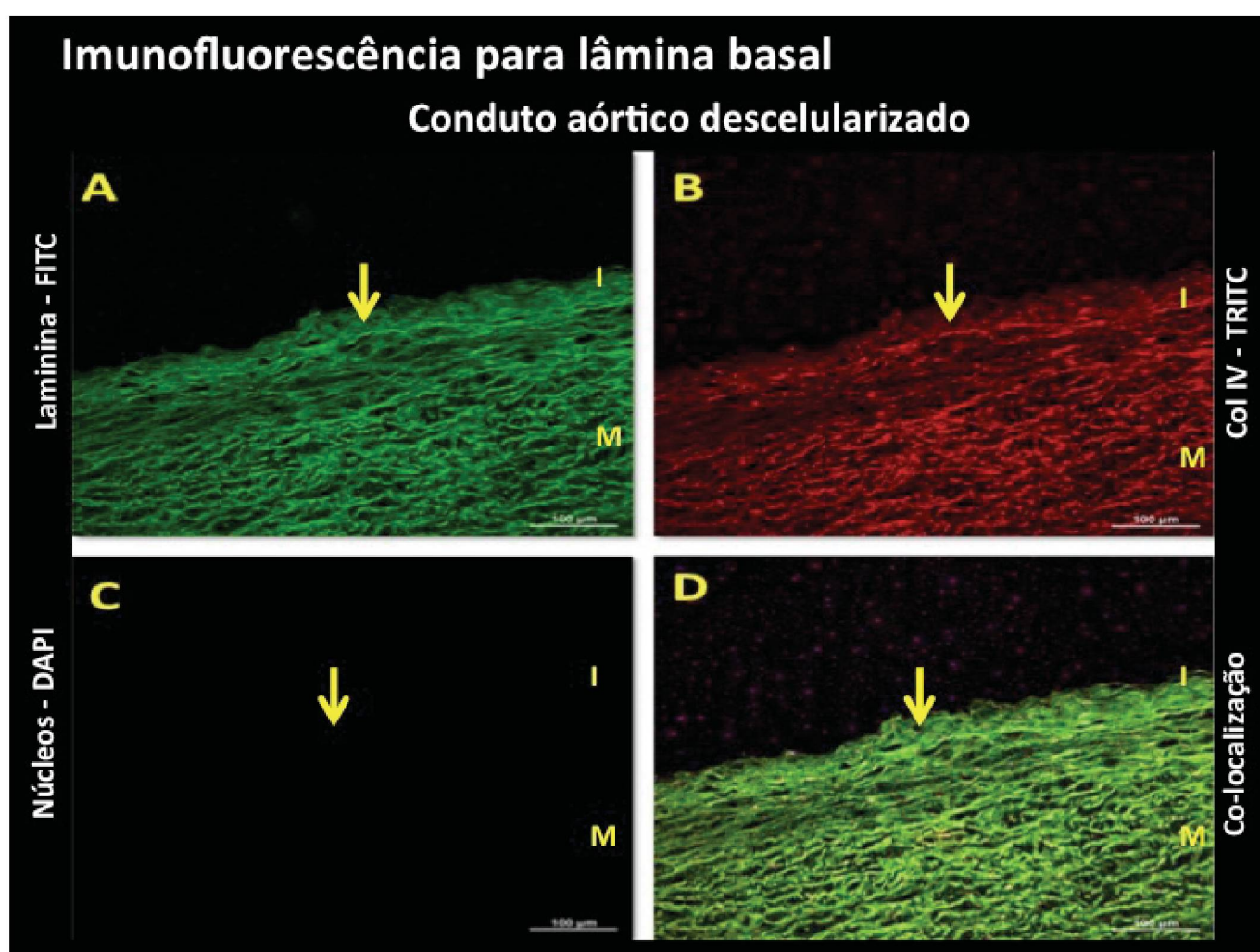


FIGURA 17. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO DE VALVA AÓRTICA DESCELULARIZADA (VAPD). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NO CONDUTO DE VAPD SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400X. FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.7 Cúspide pulmonar nativa

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 18D, demonstra a lamina basal na cúspide das VPPN. Observa-se a estrutura da lâmina basal na camada fibrosa da cúspide com pequenos pontos de positividade na camada esponjosa. Na camada esponjosa a dispersão das células permite a observação de pequenas marcações para laminina e colágeno IV. A coloração intensa ao centro da cúspide (seta) é uma marcação inespecífica de hemácias presentes em um vasosorum.

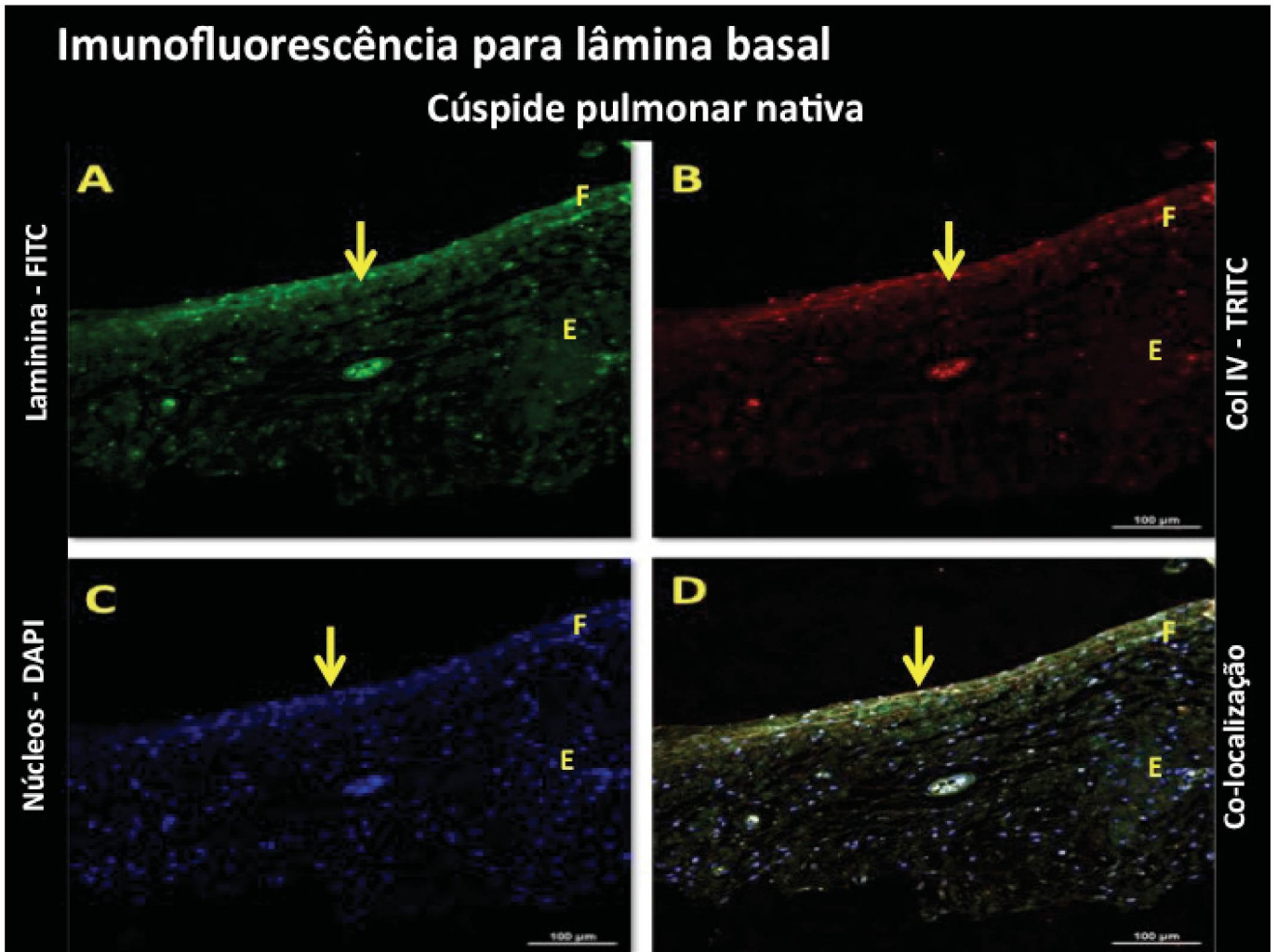


FIGURA 18. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA PULMONAR NATIVA (VPPN). F – CAMADA FIBROSA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NA CÚSPIDE DE VPPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400X. FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.8 Cúspide pulmonar descelularizada

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 19D, sugere a conservação da estrutura da lâmina basal na cúspide das VPPD. Observa-se que a camada fibrosa apresenta positividade para laminina e colágeno IV, sendo mais intensa na camada mais superficial justa posta ao endotélio. A camada ventricularis apresenta uma fina camada de laminina e colágeno IV, não sendo evidente na camada esponjosa devido a dispersão das células.

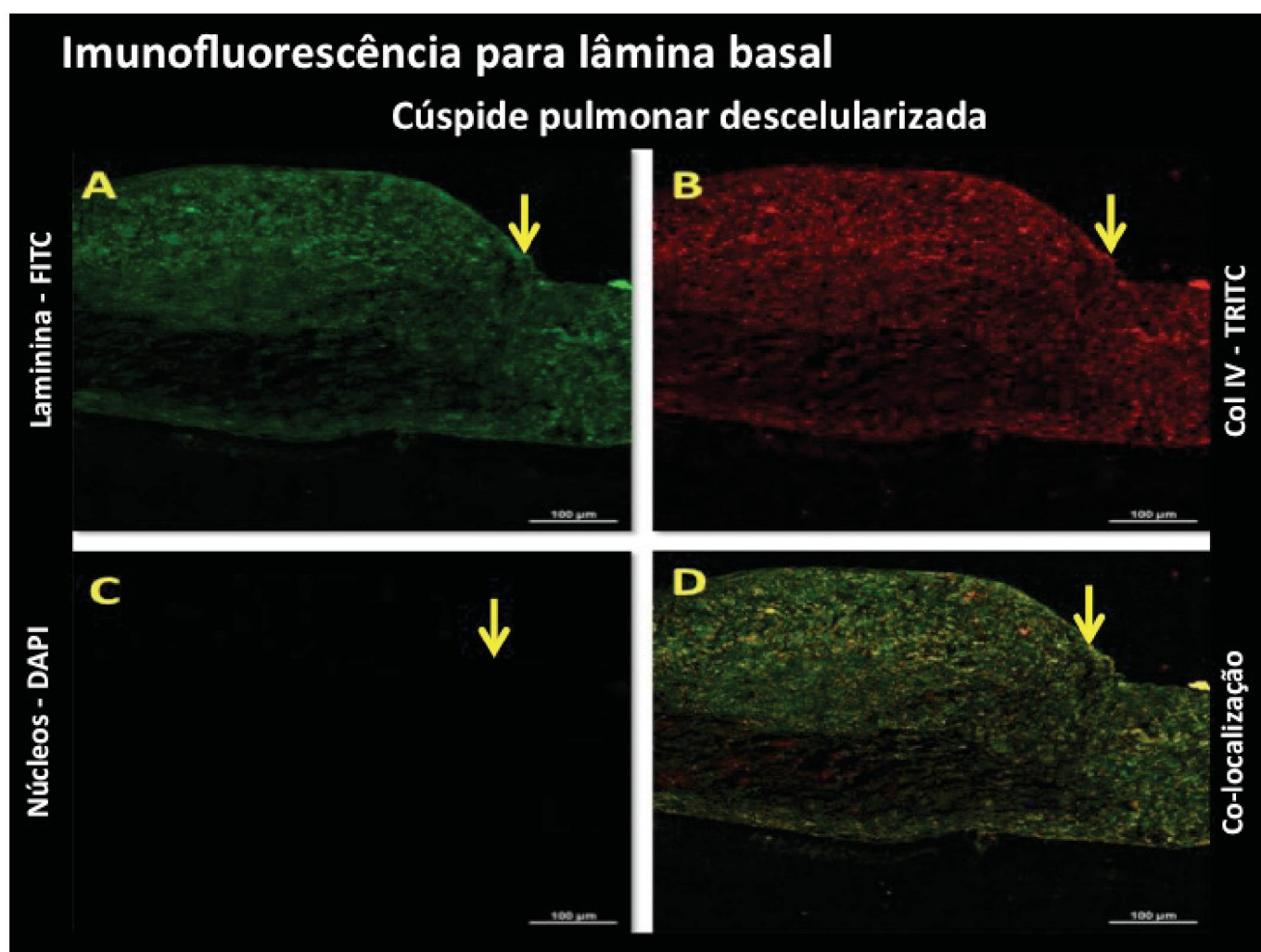


FIGURA 19. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CÚSPIDE DE VALVA PULMONAR DESCELULARIZADA (VPPD). F – CAMADA FIBROSA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NA CÚSPIDE DE VPPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI, NÃO OBSERVADOS PELA DEVIDO A DESCELULARIZAÇÃO. AUMENTO DE 400X.

FONTE: O AUTOR, 2014.

4.4.9 Conduto pulmonar nativo

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 20D, demonstra a lamina basal no conduto das VPPN. Fica evidente a marcação intensa na camada íntima, justa posta ao endotélio, e algumas porções da camada média.

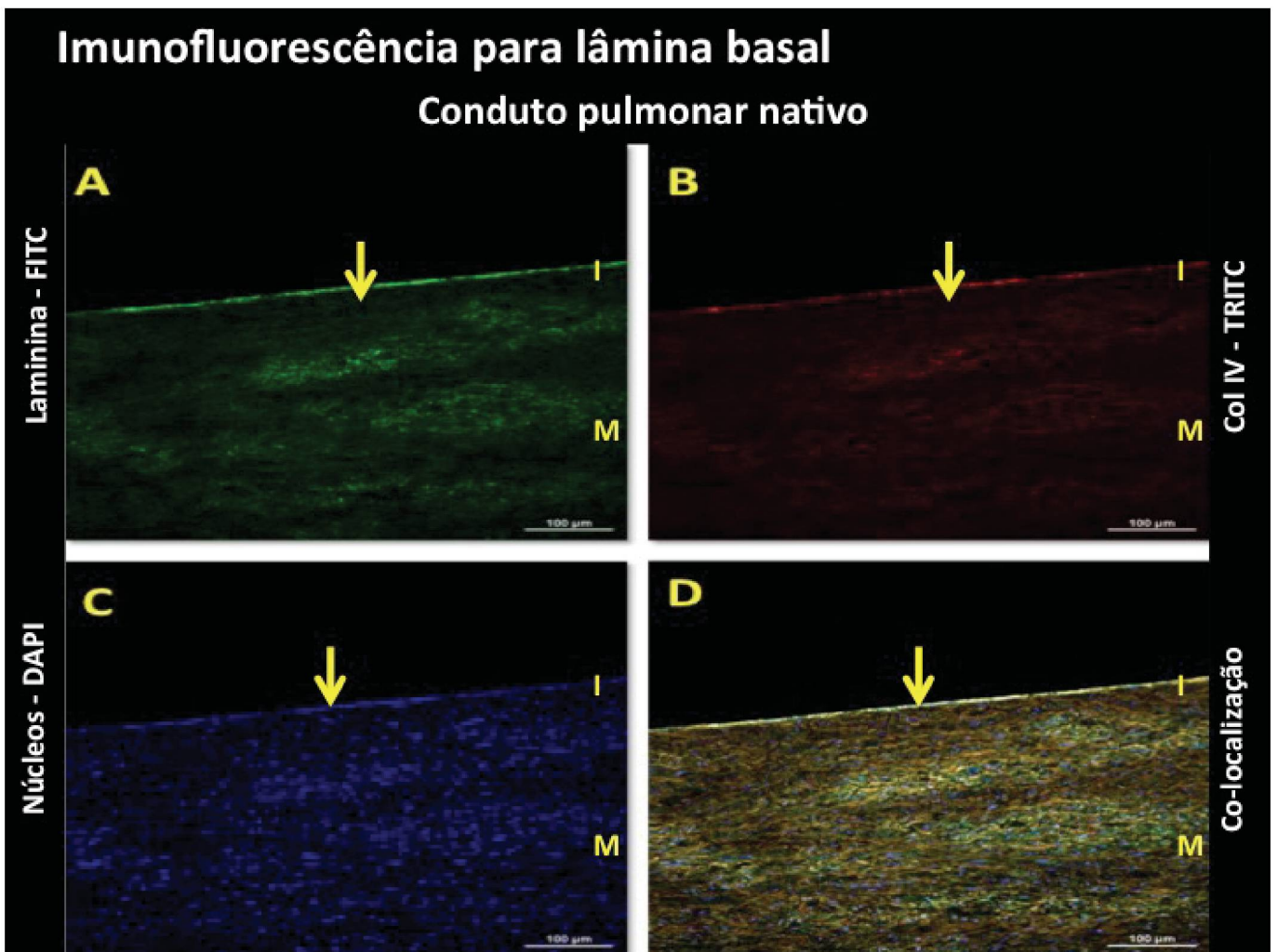


FIGURA 20. IMUNOFLUORESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO VALVA PULMONAR NATIVO (VPPN). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A -IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NO CONDUTO DE VPPN SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400x. FONTE: O AUTOR, 2014

4.4.10 Conduto pulmonar descelularizado

A co-localização de laminina(verde) e colágeno IV(vermelho) na FIGURA 21D, sugere a preservação da lamina basal no conduto das VPPD. A laminina e colágeno IV são similares em padrão de marcação ao conduto das VPPN. Também é possível observar a ausência de fluorescência no DAPI (21C) indicando a completa descelularização do conduto pulmonar.

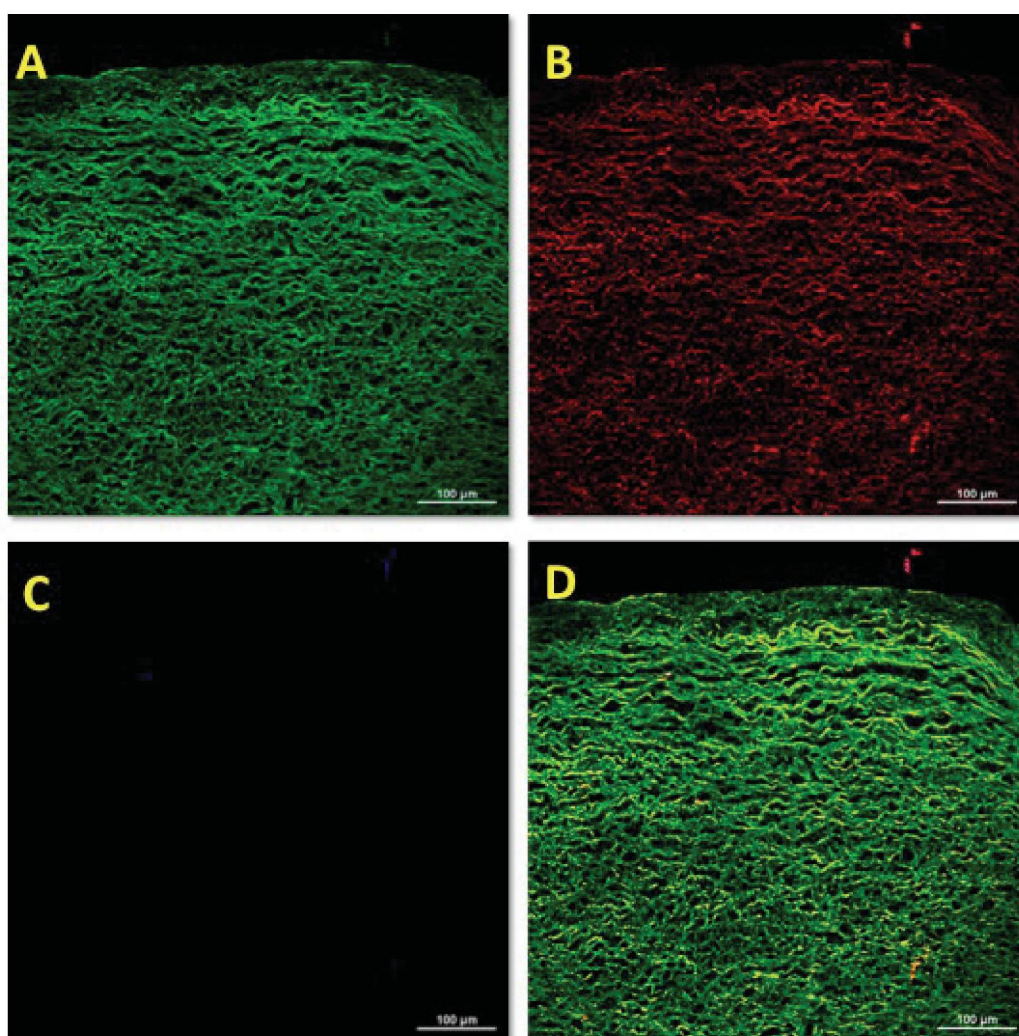


FIGURA 21. IMUNOFLOURESCÊNCIA DE COMPONENTES DA LÂMINA BASAL DE CONDUTO DE VALVA PULMOANR DESCELULARIZADO (VPPD). I –CAMADA INTÍMA; M – CAMADA MÉDIA. SETAS INDICAM A POSIÇÃO DA LÂMINA BASAL JUSTA POSTA AO ENDOTÉLIO. A - IMUNOMARCAÇÃO DA LAMININA CORADA EM VERDE POR FITC; B – COLÁGENO IV MARCADO EM VERMELHO POR TRITC, E C - NÚCLEOS EM AZUL CORADOS POR DAPI. D - CO-LOCALIZAÇÃO DE COL IV E LAMININA NO CONDUTO DE VPPD SOBREPOSIÇÃO DA LAMININA E DO COLÁGENO IV CORADO EM AMARELO, E NÚCLEO DAS CÉLULAS CORADO EM AZUL PELO DAPI. AUMENTO DE 400X. FONTE: O AUTOR, 2014

4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICAS

4.5.1 Quantificação bioquímica de hidroxiprolina - Colágeno

Utilizando o cálculo de conversão da concentração de hidroxiprolina, estabelecido por Neuman & Logan, é possível estimar conteúdo de colágeno no tecido valvar a partir da relação de μg de hidroxiprolina por mg de tecido (NEUMAN & LOGAN, 1950).

Comparando o conteúdo de colágeno das estruturas da valva nativa ao das valvas descelularizadas pode se aferir possíveis perdas de colágeno durante o processo de descelularização.

Os resultados sugerem que o conteúdo de colágeno das amostras, avaliados pela hidroxiprolina, apresentaram pequenas variações, sendo evidenciadas nas cúspides que apresentaram maior variação frente ao conduto.

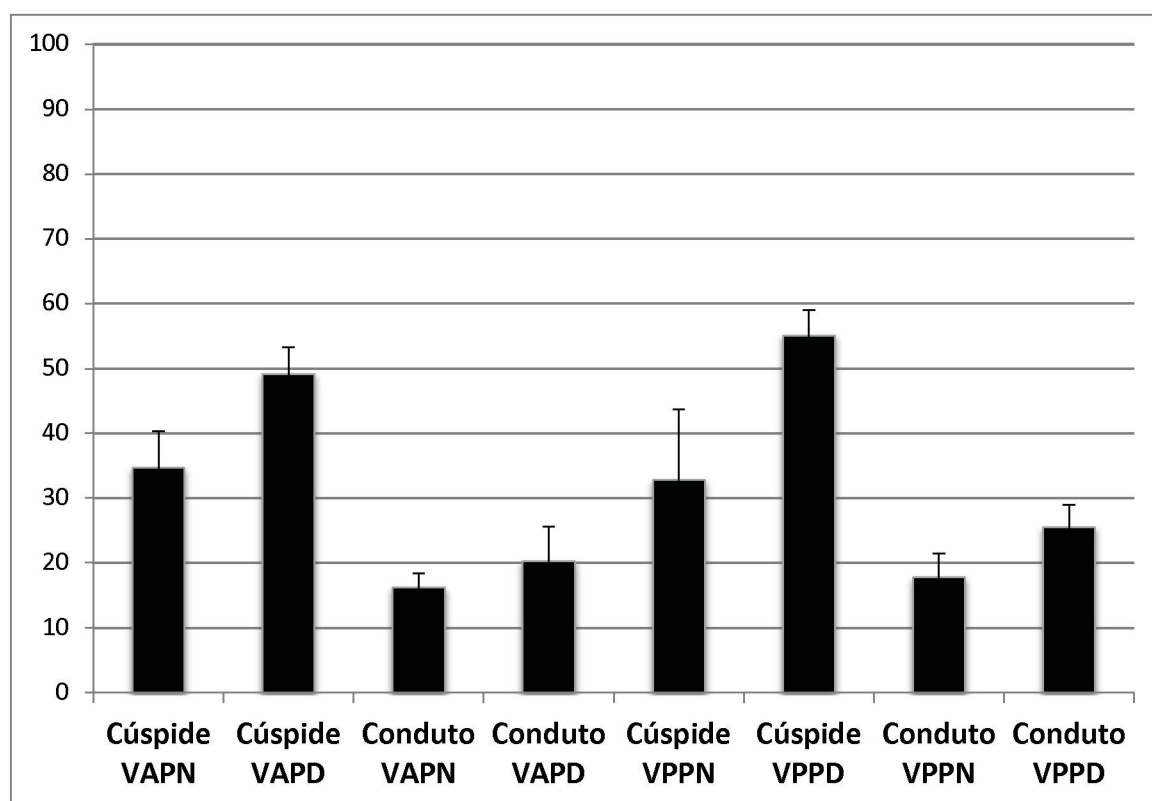


GRÁFICO 1. CONTEÚDO DE COLÁGENO EM PORCENTAGEM NAS ESTRUTURAS VALVARES COMPARANDO NATIVAS AS DESCELULARIZADAS.

4.5.2 Análise estatística das quantificações bioquímica

4.5.2.1 Resultados estatísticos das quantificações de hidroxiprolina

Os valores obtidos da análise da hidroxiprolina foram analisados estatisticamente utilizando o teste T de Student não pareado devido as amostras não serem coletadas das mesmas valvas. A significância da comparação entre valvas descelularizadas e nativas foi considerado com valores abaixo de 0,05 ($P < 0,05$).

A diferença da quantidade de hidroxiprolina nos tecidos descelularizados apresentou significância nas cúspides aórticas ($p = 0,0024$), não apresentando significância no conduto aórtico ($p = 0,53$), na cúspide pulmonar ($p = 0,35$) e no conduto pulmonar ($p = 0,15$) (TABELA 2).

TABELA 2. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PELO TESTE T DE STUDENT DE μG HIDROXIPROLINA POR MG DE TECIDO EM VALVAS AÓRTICAS E PULMONARES NATIVAS COMPARADAS AS DESCELULARIZADAS.

	Cúspide aórtica	Conduto aórtico	Cúspide pulmonar	Conduto Pulmonar
Descelularizado	63.93 \pm 1.585	25.82 \pm 2.626	63.25 \pm 9.260	33.95 \pm 1.906
Nativo	50.08 \pm 2.328	24.30 \pm 0.7696	54.56 \pm 4.047	30.14 \pm 1.402
Significância	Sim	Não	Não	Não
P (<0,05)	0,0024	0,5268	0,3572	0,1430

Os resultados da análise estatística sugerem que o processo de descclularização não causa danos evidentes as fibras colágenas e elásticas da MEC, evidenciado pela pequena variação da concentração de hidroxiprolina.

4.5.2.2 Resultados das estatísticos quantificações de glicosaminoglicanos (GAGs)

Os valores obtidos da análise de glicosaminoglicanos sulfatados foram analisados estatisticamente utilizando o teste T de Student não pareado devido as amostras não serem coletadas das mesmas valvas. A significância da comparação entre valvas descclularizadas e nativas foi considerado com valores abaixo de 0,05 ($P < 0,05$).

Os resultados de quantificação de GAGs não apresentaram diferença significativa nas cúspides aórticas ($p = 0,34$), cúspide pulmonar ($p = 0,90$) e conduto pulmonar ($p = 0,07$), apresentando apenas diferença significância estatística no conduto aórtico ($p = 0,03$) (TABELA 3).

TABELA 3. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA PELO TESTE T DE STUDENT DE μG GLICOSAMINOGLICANOS POR MG DE TECIDO EM VALVAS AÓRTICAS E PULMONARES NATIVAS COMPARADAS AS DESCCELULARIZADAS.

	Cúspide aórtica	Conduto aórtico	Cúspide pulmonar	Conduto Pulmonar
Descelularizado	80.22 \pm 20.45	39.21 \pm 1.851	103.8 \pm 19.49	39.22 \pm 1.243
Nativo	60.49 \pm 8.624	45.97 \pm 1.780	100.3 \pm 20.68	42.97 \pm 1.195
Significância	Não	Sim	Não	Não
P (<0,05)	0,3397	0,0349	0,9057	0,0677

Os resultados da análise estatística sugerem que o processo de descclularização causa mínima redução dos glicosaminoglicanos sulfatados presentes nas cúspide das valvas aórticas e pulmonares, não apresentando significância estatística. Em relação aos condutos, o conduto aórtico descclularizado apresenta significativa redução da concentração dos glicosaminoglicanos sulfatados, o que não é observado nos condutos pulmonares, que não apresentou diferença significativa entre descclularizado e nativo.

5 DISCUSSÃO

A diversidade de substitutos valvares ainda não atende a todos os grupos de pacientes valvopatas. As pesquisas em substitutos valvares buscam longa durabilidade e adaptação biológica. Também a disponibilidade dos substitutos valvares é uma das características que direcionam os estudos a materiais sintéticos e valvas de origem animal (DOHMEN, P. M. e KONERTZ, W., 2009).

No desenvolvimento de um substituto valvar por engenharia de tecidos, as valvas de origem animal figuram como uma das melhores opções. Para tornar uma valva porcina em um substituto valvar implantável várias características devem ser analisadas, sendo as principais: biossegurança, comportamento biológico e capacidade funcional. Para manutenção da função valvar a preservação da estrutura da matriz extracelular é fundamental (BADYLAK, S. F., 2002; IOP, L. *et al.*, 2009).

Utilizando o processo de descélularização pode se obter um arcabouço de matriz acelular que conserva as características morfológicas do tecido. O efeito da descélularização sobre o tecido é mediado pelos agentes descélularizantes, tais como detergentes e enzimas. A remoção das células pela quebra das interações químicas entre células e MEC pode ter efeito deletério sobre algumas estruturas, comprometendo sua função (SOMERS, P. *et al.*, 2012).

O método de descélularização proposto neste estudo tem o objetivo de remover as células sem comprometer a MEC. Utilizando a ação detergente do SDS foi empregada uma concentração que permitisse a ruptura das interações células MEC sem desnaturar as proteínas de MEC. Tendo uma característica aniônica o SDS pode interagir com proteínas alterando sua carga elétrica. A fim de remover resíduos e o excesso de SDS, que podem causar alterações na conformação das proteínas, fragilizando as fibras da MEC, foi utilizado o etanol 70%. O etanol 70% também permite a remoção dos fosfolípidios, que são focos iniciais da calcificação distrófica da valva. A calcificação distrófica altera a durabilidade do substituto valvar por deteriorar a estrutura de MEC (ROSA, G. R. S. DA *et al.*, 2006).

Objetivando avaliar o impacto do método de descélularização nas valvas

cardíacas aórtica e pulmonar porcina descelularizadas (VAPD e VPPD) foram avaliados parâmetros estruturais a fim de verificar possíveis alterações causadas pela descelularização, comprometendo a estrutura funcional da valva com consequências a durabilidade.

As avaliações de integridade estrutural concentraram-se em duas estruturas comuns às valvas aórtica e pulmonar: cúspide e conduto.

Diferenças estruturais entre valva aórtica e valva pulmonar são relacionadas a função que exercem. Embora a organização, disposição e orientação na formação da MEC possua similaridades, a remoção das células pode impactar de forma diferente para estruturas da valva aórtica e valva pulmonar.

Nas avaliações histomorfológicas das VAPD e VPPD observou-se que a descelularização foi eficiente nas cúspides, mantendo a organização trilaminar e a distribuição das fibras elásticas e colágenas na MEC. No conduto a remoção das células foi completa, evidenciado pela ausência de núcleos, confirmado pela coloração de DAPI (FIGURA 4I e 5I).

As avaliações pela coloração de PRM não permitiram a observação dos GAGs nas cúspides descelularizadas. Possivelmente pela valva ter sido descelularizada, utilizando o SDS altera-se a carga elétrica das moléculas, que tendem a perder suas características de afinidade com os corantes, reduzindo a diferenciação da coloração. Este fato também foi observado na coloração de HE onde a coloração da MEC pela eosina foi menos intensa. Deste modo a avaliação dos GAGs e a estrutura de MEC demandou outras técnicas de análise.

Observado o comprometimento das colorações histomorfológicas foi realizada uma análise morfométrica da fluorescência do DAPI para confirmar a remoção dos núcleos e restos nucleares. Esta técnica aumenta a sensibilidade na leitura da coloração por DAPI, definindo a presença de núcleos e restos nucleares pela fluorescência. Porém, uma fluorescência residual é inerente a tecidos que apresentem fibras elásticas, sendo observados valores próximos ao zero nas valvas descelularizadas (BANERJEE, B. *et al.*, 1999).

Ota et al. (2007) levantaram a hipótese que a presença de resíduos de material

nuclear sugere a possibilidade a presença de vírus colocando em risco o receptor da valva (OTA, T. *et al.*, 2007). Nas valvas descelularizadas (VAPD e VPPD) não foram observados resíduos de material nuclear evidentes, indicando a eficiência na remoção de células. Porém sequências de material nuclear muito pequenas, como as de presentes em vírus devem ser analisadas por técnicas mais sensíveis, aferindo a biossegurança da valva.

Ressalta-se que a descelularização do conduto aórtico somente foi eficiente quando aplicadas em condutos de até 3,0cm de comprimento. Quando aplicado o mesmo método a condutos maiores (ex.:3,5cm) o resultado não é eficiente restando núcleos nas porções distais e mais espessas do conduto.

A efetividade do processo de descelularização não é uniforme ao remover as células nas estruturas valvares. Devido ao arranjo das fibras da MEC serem diferentes em cada estrutura e, também diferentes nas porções da mesma estrutura, a penetração da solução de SDS não é ideal. A interação do excesso de SDS com as fibras de MEC pode causar alterações na estrutura, principalmente da cúspide por ter menor quantidade de MEC.

A organização das fibras da MEC é relacionada a função. (SCHROEDER, JOYCEA *et al.*, 2003). A remoção das células pode alterar a disposição das fibras, comprometendo a arquitetura do tecido. As fibras colágenas podem ser compactadas, em especial nas cúspides. Já as fibras elásticas podem ser rompidas, o que pode comprometer biomecânica do tecido, comprometendo a função valvar (HINTON, R. B. e YUTZEY, K. E., 2011).

A avaliação histomorfológica das VAPD e VPPD pela coloração de Picrosirius Red demonstrou organização de colágeno reticular e colágeno fibroso, sugerindo a preservação do padrão de distribuição das fibras colágenas, semelhante ao observado nas VAPN e VPPN.

A orientação das fibras da MEC interfere diretamente em suas propriedades biomecânicas. Os resultados histomorfológicos sugerem que não houve danos evidentes a MEC, conservando as fibras na mesma orientação e distribuição. Pelas análises histomorfológicas não fica evidente alteração da arquitetura devido a

remoção das células pela ação do SDS.

No processo de descelularização proposto neste estudo foi levado em conta caráter desnaturante do SDS e sua saturação, buscando o equilíbrio entre remoção das células e a preservação da estrutura da MEC das valvas. Por este motivo o processo foi adaptado de tal forma que o emprego do SDS é apenas uma etapa do processo de descelularização, diferindo dos demais processos propostos na literatura que utilizam SDS na mesma concentração (CEBOTARI, S. *et al.*, 2010).

Rieder *et al.* (2004) demonstraram na concentração de 0,25% o SDS deixa resíduos na MEC, causando citotoxicidade. A presença de resíduos pode indicar alta concentração de SDS no processo de descelularização, o que pode causar desnaturação de algumas proteínas.

Danos as proteínas da MEC podem ser observados na alteração da ultraestrutura do tecido valvar. Liao *et al.* (2008) observa alterações na avaliação por luz polarizada e MEV na ultraestrutura de cúspides aórticas descelularizadas com 0,1% de SDS, sugerindo que pode ocorrer comprometimento a biomecânica da MEC valvar. Também sugere a redução da capacidade de repovoamento devido a densidade da trama de fibras colágenas com pequenos poros.

Nossos resultados mostram a ultraestrutura das VAPD e VPPD semelhante as VAPN e VPPN, com distribuição e a organização das fibras da MEC, sugerindo uma preservação da arquitetura do arcabouço de MEC.

A MEV permitiu a observação da arquitetura da MEC das VAPD e VPPD em relação a sua disposição e distribuição das fibras colágenas e elásticas. A comparação entre valvas descelularizadas a nativas não evidenciou danos evidentes como compactação ou rompimento das fibras de MEC. Também a superfície das cúspides e condutos observadas nos cortes transversais sugerem a MEC não foi degradada na descelularização. Porém, danos a composição química das fibras da MEC podem alterar seu comportamento biológico.

A análise da superfície das fibras da MEC permitem aferir alterações na composição e organização nas valvas descelularizadas (VAPD e VPPD). Pela análise de Microespectroscopia Raman (MR) foram obtidos espectros entre 0 e 3800 rel./cm

com picos bastante similares entre as estruturas nativas e as descelularizadas. Alterações como desnaturação ou perda de elementos causaria alterações no espectro, o que não foi evidenciado nas VAPD e VPPD. A similaridade dos espectros sugere uma conservação da composição química das estruturas avaliadas. A partir destes resultados de MR pode se inferir a manutenção da arquitetura da MEC, principalmente nas porções que interagem com as células, como a microestrutura de superfície da lâmina basal.

A conservação da microestrutura corrobora para que a organização do tecido, mantendo as estruturas funcionais. A condição de integridade da lâmina basal permite que o tecido seja receptivo a novas células, visto que a interface de células e MEC (*crosstalking*) é mediada por esta estrutura. Nas estruturas valvares cúspide e conduto ficou evidenciada a preservação da lâmina basal tanto para VAPD quanto para VPPD. A co-localização do colágeno IV e da laminina demonstrou que a estrutura da lâmina basal foi preservada após a remoção das células.

A descelularização comprometer os elementos que constituem a MEC (BADER, A. *et al.*, 1998). No caso da MEC da valva cardíaca os principais constituintes são o colágeno, elastina e os glicosaminoglicanos. O colágeno presente nas valvas cardíacas fornece resistência mecânica ao tecido, já a elastina fornece maleabilidade e elasticidade para suportar o estresse mecânico imposto sobre a valva (TEDDER, M. E. *et al.*, 2009).

Na comparação entre os grupos VAPN à VAPD, e VPPN à VPPD observou-se que há similaridade no conteúdo de colágeno para o conduto (GRÁFICO 1). Este resultado sugere que o processo de descelularização é específico na remoção das células preservando as fibras colágenas do conduto. Já para as cúspides houve significância estatística entre a cúspide aórtica nativa, com menos hidroxiprolina, e a cúspide aórtica descelularizada, com mais hidroxiprolina. A cúspide pulmonar descelularizada também apresentou maior concentração de hidroxiprolina quando comparada a cúspide pulmonar nativa, porém sem significância estatística. As variações nos tecidos descelularizados podem ser explicadas pela amostragem do tecido descelularizado que não possui elementos celulares, fazendo com que a massa de MEC tomada para o ensaio seja maior. Também deve ser levado em conta mínimos

danos que possam ocorrer durante o processo de descelularização, o que é esperado devido ação do SDS e também do etanol.

Contudo a variabilidade dos tecidos biológicos pode interferir em uma avaliação estatística, onde causa um alto desvio padrão. a avaliação da hidroxiprolina pode avaliar o conteúdo total de colágeno, não avaliando sua estrutura e condição funcional. Misadraee et al. (2006) utilizando o processo de descelularização com concentração de 0,1%SDS e a mesma técnica de quantificação em pericárdios humanos sugere que o processo não causou redução do conteúdo colágeno.

A análise dos glicosaminoglicanos fornece um dado importante para a regeneração do tecido, que quando alterados podem causar fibrose ou degeneração por calcificação (VYAVAHARE, N. *et al.*, 1999). Na análise dos glicosaminoglicanos das valvas descelularizadas comparadas as nativa apenas houve redução significativa no conduto aórtico descelularizado. Possivelmente os glicosaminoglicanos foram reduzidos nos condutos por estarem menos concentrados nesta estrutura, se comparada ao conduto pulmonar. Neste teste a variabilidade das amostras pode interferir na quantificação, bem como o n analisado. Tal redução pode interferir no processo de reidratação do tecido e também na interação com as células do receptor.

A avaliação do tecido da valva descelularizada deve levar em conta as alterações físicas, químicas e biológicas sofridas pelo tecido durante o processo de remoção das células. Caso o tecido valvar apresente alguma alteração este tende a refletir diretamente em seu comportamento biológico(SACKS, M. S. *et al.*, 2009).

Para uma aplicabilidade clínica as valvas aórticas porcinas devem ser submetidas a testes que avaliem seu desempenho funcional e comportamento biológico. Preconizando os testes *in vitro*, antes de submeter a um ensaio *in vivo*, teste de biomecânica, citotoxicidade, trombogenicidade e imunogenicidade permitem um entendimento das características das valvas porcinas descelularizadas. Também podem ser avaliadas alterações que possam comprometer o comportamento biológico do substituto valvar.

As características de imunogenicidade podem interferir no comportamento biológico da valva cardíaca, em especial a longo prazo. Resíduos de células,

degeneração das fibras da MEC, interação com substâncias presentes na circulação sanguínea, como o colesterol, podem desencadear uma reação imune.

As características de uma valva descelularizada biocompatível e durável devem levar em conta a capacidade de integração com tecidos do receptor e a comportamento biológico da estrutura de MEC, a qual se degradada compromete a função valvar.

No estudo realizado por Gratzner *et al.* (2006) o processo de descelularização utilizado é muito semelhante ao proposto neste estudo. Demonstrando a descelularização do ligamento cruzado anterior evidenciou alterações estruturais e bioquímicas que tiveram efeito no remodelamento do tecido. Porém o tecido em analisado possui diferente composição e organização tecidual (GRATZER, P. F. *et al.*, 2006; DOHMEN, P. M., 2012a). Os danos observados por Gratzner *et al.* na análise estrutural não foram observados nas VAPD e VPPD, indicando que o processo de descelularização com SDS tem diferentes ações em cada tipo de tecido. Também reforça a necessidade de uma análise estrutural criteriosa para evitar alterações que comprometam o comportamento biológico, em especial na recuperação de tecidos lesados.

O uso clínico de substitutos valvares descelularizados é motivado pelos bons resultados apresentados pelo uso de homoenxertos descelularizado. Embora os homoenxertos tenham menor potencial imunogênico uma comparação com a capacidade funcional e de durabilidade é válida. Observando as características de integração e recuperação da função valvar dos homoenxertos pode prever que uma MEC descelularizada tem capacidade funcional e estendida durabilidade.

Os resultados clínicos de Costa *et al.* (2004) demonstram a efetividade do homoenxerto descelularizado superior ao criopreservado, o qual além de funcional reduziu a resposta imune avaliada por Kneib *et al.* (2012) sugerindo que o enxerto pode se integrar ao receptor, com consequente aumento na durabilidade (AFFONSO DA COSTA, F. D. *et al.*, 2004; KNEIB, C. *et al.*, 2012).

A aplicabilidade clínica de valvas porcinas descelularizadas já é uma realidade. A fim de evitar inefetividade do tratamento da valvopatia pelo enxerto descelularizado,

bem como problemas decorrentes em virtude de reações imunes as avaliações dos tecidos descelularizados devem levar em conta a biossegurança e a capacidade funcional dos enxertos. Porém propostas de métodos de descelularização e condicionamento da MEC, que aproximem os substitutos valvares do ideal, devem levar em conta inicialmente a estrutura valvar.

A estrutura valvar é o ponto inicial de desenvolvimento de qualquer substituto valvar, visto que este é utilizado para restaurar a função de uma valva com a estrutura degenerada. Também infere que a estrutura deve ser resistente a resposta imune, ponto inicial da degradação de um substituto valvar. O foco das pesquisas em substitutos valvares tendem a integrar diversas áreas do conhecimento para oferecer um substituto valvar prevendo o seu comportamento biológico.

A pretensão com os resultados apresentados neste estudo é aprimorar o desenvolvimento de um substituto valvar que atenda aos diversos grupos de pacientes valvopatas, com uma tecnologia nacional, acessível e segura.

6 CONCLUSÃO

Este estudo experimental demonstrou a efetividade da descelularização nas valvas porcinas aórtica e pulmonar.

Evidenciando:

- A retirada específica das células das cúspides e condutos valvares aórtico e pulmonar, sugerindo a preservação do arcabouço de MEC;
- Não foram observados danos importantes aos componentes das MEC descelularizadas para valvas aórticas e pulmonares;
- Observa-se a preservação da estrutura da lâmina basal nas cúspides e condutos das valvas aórticas e pulmonares.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO DA COSTA, F. D. et al. Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. **Artif Organs**, v. 28, n. 4, p. 366-70, Apr 2004. ISSN 0160-564X (Print)
- ALLAIRE, E. et al. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. **J Vasc Surg**, v. 19, n. 3, p. 446-56, Mar 1994. ISSN 0741-5214 (Print)
- AVILA, J. L.; ROJAS, M.; GALILI, U. Immunogenic Gal alpha 1---3Gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American Trypanosoma and Leishmania. **J Immunol**, v. 142, n. 8, p. 2828-34, Apr 15 1989. ISSN 0022-1767 (Print)
- BADER, A. et al. Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 14, n. 3, p. 279-84, Sep 1998. ISSN 1010-7940 (Print)
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Semin Cell Dev Biol**, v. 13, n. 5, p. 377-83, Oct 2002. ISSN 1084-9521 (Print)
- BADYLAK, S. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Transpl Immunol**, v. 12, n. 3-4, p. 367-77, Apr 2004. ISSN 0966-3274 (Print)
- BADYLAK, S Decellularized Allogeneic and Xenogeneic Tissue as a Bioscaffold for Regenerative Medicine: Factors that Influence the Host Response. **Ann Biomed Eng**, Jan 9 2014. ISSN 1573-9686 (Electronic)
- BADYLAK, S. F.; GILBERT, T. W. Immune response to biologic scaffold materials. **Semin Immunol**, v. 20, n. 2, p. 109-16, Apr 2008. ISSN 1044-5323 (Print)
- BADYLAK, S. F. et al. The use of extracellular matrix as an inductive scaffold for the partial replacement of functional myocardium. **Cell Transplant**, v. 15 Suppl 1, p. S29-40, 2006. ISSN 0963-6897 (Print)
- BAILEY, M. T. et al. Role of elastin in pathologic calcification of xenograft heart valves. **J Biomed Mater Res A**, v. 66, n. 1, p. 93-102, Jul 1 2003. ISSN 1549-3296 (Print)
- BANERJEE, B.; MIEDEMA, B. E.; CHANDRASEKHAR, H. R. Role of basement membrane collagen and elastin in the autofluorescence spectra of the colon. **J Investig Med**, v. 47, n. 6, p. 326-32, Jul 1999. ISSN 1081-5589 (Print)
- BOOTH, C. et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. **J Heart Valve Dis**, v. 11,
- CARABELLO, B. A. Introduction to aortic stenosis. **Circ Res**, v. 113, n. 2, p. 179-85, Jul 5 2013. ISSN 1524-4571 (Electronic)
- CARPENTIER, A. The concept of bioprosthesis. **Thoraxchir Vask Chir**, v. 19, n. 5, p. 379-83, Oct 1971. ISSN 0040-6384 (Print)

CARPENTIER, A. et al. [Use of aortic heterografts in treatment of mitral valvulopathy. Experimental basis and 1st clinical case]. **Mem Acad Chir (Paris)**, v. 93, n. 19, p. 617-22, Jun 14 1967. ISSN 0368-8291 (Print)

CEBOTARI, S. et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. **Circulation**, v. 106, n. 12 Suppl 1, p. I63-I68, Sep 24 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)

CEBOTARI, S. et al. Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report. **Circulation**, v. 124, n. 11 Suppl, p. S115-23, Sep 13 2011. ISSN 1524-4539 (Electronic)

CEBOTARI, S. et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. **Artif Organs**, v. 34, n. 3, p. 206-10, Mar 2010. ISSN 1525-1594 (Electronic)

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopedic tissue engineering. **Biotechnol Adv**, Jan 10 2014. ISSN 1873-1899 (Electronic)

COLLATUSSO, C. et al. Effect of SDS-based decellularization in the prevention of calcification in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium: study in rats. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 27, n. 1, p. 88-96, Jan-Mar 2012. ISSN 1678-9741 (Electronic)

COLLATUSSO, C. et al. Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine pericardium valve prosthesis: a study in sheep. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 26, n. 3, p. 419-26, Jul-Sep 2011. ISSN 1678-9741 (Electronic)

COSTA, F. et al. Ross Operation with decellularized pulmonary allografts: medium-term results. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 22, n. 4, p. 454-62, Oct-Dec 2007. ISSN 1678-9741 (Electronic)

CUMMINGS, I. et al. Tissue-engineered vascular graft remodeling in a growing lamb model: expression of matrix metalloproteinases. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 41, n. 1, p. 167-72, Jan 2012. ISSN 1873-734X (Electronic)

DA COSTA, F. D. et al. The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. **Ann Thorac Surg**, v. 90, n. 6, p. 1854-60, Dec 2010. ISSN 0003-4975.

DA COSTA, F. D. et al. Long-term results of the Ross operation: an 18-year single institutional experience. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 46, n. 3, p. 415-22; discussion 422, Sep 2014. ISSN 1010-7940.

DAINESE, L.; BIGLIOLI, P. Human or animal homograft: could they have a future as a biological scaffold for engineered heart valves? **J Cardiovasc Surg (Torino)**, v. 51, n. 3, p. 449-56, Jun 2010. ISSN 0021-9509 (Print)

DAINESE, L. et al. Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells. **J Heart Valve Dis**, v. 21, n. 1, p. 125-34, Jan 2012. ISSN 0966-8519 (Print)

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 3, p. 255-64, Feb 1 2008. ISSN 0021-9533 (Print)

DALLAN, L. A. et al. Coronary artery bypass graft using the right coronary artery-pulmonary artery fistula. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 129, n. 1, p. 225-6, Jan 2005. ISSN 0022-5223 (Print)

DOHMEN, P. M. Clinical results of implanted tissue engineered heart valves. **HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth**, v. 4, n. 4, p. 225-31, 2012a. ISSN 2037-0504 (Print)

DOHMEN, P. M. Tissue engineered aortic valve. **HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth**, v. 4, n. 2, p. 89-93, 2012b. ISSN 2037-0504 (Print)

DOHMEN, P. M. et al. Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model. **Heart Surg Forum**, v. 8, n. 2, p. E100-4; discussion E104, 2005. ISSN 1098-3511.

DOHMEN, P. M.; KONERTZ, W. Tissue-engineered heart valve scaffolds. **Ann Thorac Cardiovasc Surg**, v. 15, n. 6, p. 362-7, Dec 2009. ISSN 2186-1005 (Electronic)

DOHMEN, P. M. et al. Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. **Ann Thorac Surg**, v. 92, n. 4, p. 1308-14, Oct 2011. ISSN 0003-4975.

EDWARDS, C. A.; O'BRIEN, W. D., JR. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. **Clin Chim Acta**, v. 104, n. 2, p. 161-7, Jun 10 1980. ISSN 0009-8981 (Print)

ELKINS, R. C. Is tissue-engineered heart valve replacement clinically applicable? **Curr Cardiol Rep**, v. 5, n. 2, p. 125-8, Mar 2003. ISSN 1523-3782 (Print)

ELKINS, R. C. et al. Decellularized human valve allografts. **Ann Thorac Surg**, v. 71, n. 5 Suppl, p. S428-32, May 2001. ISSN 0003-4975 (Print)

FARNDAL, R. W.; MURRAY, J. C. The action of pulsed magnetic fields on cyclic AMP levels in cultured fibroblasts. **Biochim Biophys Acta**, v. 881, n. 1, p. 46-53, Mar 19 1986. ISSN 0006-3002 (Print)

FAULK, D. M. et al. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 8, p. 984-9, Aug 2014. ISSN 1097-4652 (Electronic)

FUNDER, J. A. Current status on stentless aortic bioprosthesis: a clinical and experimental perspective. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 41, n. 4, p. 790-9, Apr 2012. ISSN 1873-734X (Electronic)

GALILI, U. The alpha-Gal epitope (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. **Biochimie**, v. 83, n. 7, p. 557-63, Jul 2001. ISSN 0300-9084 (Print)

GALILI, U. et al. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl

- specificity. **J Exp Med**, v. 160, n. 5, p. 1519-31, Nov 1 1984. ISSN 0022-1007 (Print)
- GALILI, U. et al. The natural anti-Gal antibody. **Subcell Biochem**, v. 32, p. 79-106, 1999. ISSN 0306-0225 (Print)
- GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3675-83, Jul 2006. ISSN 0142-9612 (Print)
- GOLDSTEIN, S. et al. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. **Ann Thorac Surg**, v. 70, n. 6, p. 1962-9, Dec 2000. ISSN 0003-4975 (Print)
- GRATZER, P. F.; HARRISON, R. D.; WOODS, T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue Eng**, v. 12, n. 10, p. 2975-83, Oct 2006. ISSN 1076-3279 (Print)
- HAWKINS, J. A. et al. Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 126, n. 1, p. 247-52; discussion 252-3, Jul 2003. ISSN 0022-5223 (Print)
- HAYKAL, S. et al. Evaluation of the structural integrity and extracellular matrix components of tracheal allografts following cyclical decellularization techniques: comparison of three protocols. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 18, n. 8, p. 614-23, Aug 2012. ISSN 1937-3392 (Electronic)
- HINDERER, S. et al. Engineering of a bio-functionalized hybrid off-the-shelf heart valve. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2130-9, Feb 2014. ISSN 1878-5905 (Electronic)
- HINTON, R. B.; YUTZEY, K. E. Heart valve structure and function in development and disease. **Annu Rev Physiol**, v. 73, p. 29-46, 2011. ISSN 1545-1585 (Electronic)
- HODDE, J. P. et al. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization. **Tissue Eng**, v. 8, n. 2, p. 225-34, Apr 2002. ISSN 1076-3279 (Print)
- HOPKINS, R. A. Tissue engineering of heart valves: decellularized valve scaffolds. **Circulation**, v. 111, n. 21, p. 2712-4, May 31 2005. ISSN 0009-7322.
- IOP, L. et al. Decellularized allogeneic heart valves demonstrate self-regeneration potential after a long-term preclinical evaluation. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99593, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)
- IOP, L. et al. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. **Biomaterials**, v. 30, n. 25, p. 4104-16, Sep 2009. ISSN 0142-9612.
- JANA, S. et al. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. **Acta Biomater**, Mar 24 2014. ISSN 1878-7568 (Electronic)
- KAJITANI, M. et al. Successful repair of esophageal injury using an elastin based biomaterial patch. **ASAIO J**, v. 47, n. 4, p. 342-5, Jul-Aug 2001. ISSN 1058-2916

- KASIMIR, M. T. et al. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. **Int J Artif Organs**, v. 26, n. 5, p. 421-7, May 2003. ISSN 0391-3988
- KIM, W. G.; PARK, J. K.; LEE, W. Y. Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts. **Int J Artif Organs**, v. 25, n. 8, p. 791-7, Aug 2002. ISSN 0391-3988
- KNEIB, C. et al. Evaluation of humoral immune response to donor HLA after implantation of cellularized versus decellularized human heart valve allografts. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 2, p. 165-74, Aug 2012. ISSN 1399-0039
- KOROSSI, S. A. et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. **J Heart Valve Dis**, v. 11, n. 4, p. 463-71, Jul 2002. ISSN 0966-8519
- LIAO, J.; JOYCE, E. M.; SACKS, M. S. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. **Biomaterials**, v. 29, n. 8, p. 1065-74, Mar 2008. ISSN 0142-9612
- LUCIANI, G. B.; SANTINI, F.; MAZZUCCO, A. Autografts, homografts, and xenografts: overview on stentless aortic valve surgery. **J Cardiovasc Med (Hagerstown)**, v. 8, n. 2, p. 91-6, Feb 2007. ISSN 1558-2027
- LUO, J. et al. Development and characterization of acellular porcine pulmonary valve scaffolds for tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, Apr 30 2014. ISSN 1937-335X
- MA, R. et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. **Biomaterials**, v. 34, n. 7, p. 1790-8, Feb 2013. ISSN 1878-590
- MACGROGAN, D. et al. How to Make a Heart Valve: From Embryonic Development to Bioengineering of Living Valve Substitutes. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 11, 2014. ISSN 2157-1422
- MEIER, L. A. et al. Blood Outgrowth Endothelial Cells Alter Remodeling of Completely Biological Engineered Grafts Implanted into the Sheep Femoral Artery. **J Cardiovasc Transl Res**, Jan 16 2014. ISSN 1937-5395
- MOL, A. et al. Autologous Human Tissue-Engineered Heart Valves: Prospects for Systemic Application. **Circulation**, v. 114, n. 1 suppl, p. I-152-I-158, July 4, 2006 2006.
- MOO, E. K. et al. Extracellular matrix integrity affects the mechanical behaviour of in-situ chondrocytes under compression. **J Biomech**, v. 47, n. 5, p. 1004-13, Mar 21 2014. ISSN 1873-2380
- MORONI, F.; MIRABELLA, T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. **Am J Stem Cells**, v. 3, n. 1, p. 1-20, 2014. ISSN 2160-4150.
- NEUMANN, A. et al. Heart valve engineering: decellularized allograft matrices in clinical practice. **Biomed Tech (Berl)**, p. 1-4, May 28 2013. ISSN 1862-278X
- OTA, T. et al. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. **Ann Thorac Surg**, v. 83, n. 4, p. 1501-7, Apr 2007. ISSN

1552-6259

PANDURANGA, P.; EL-DEEB, M.; JHA, C. Mechanical Prosthetic Valves and Pregnancy: A therapeutic dilemma of anticoagulation. **Sultan Qaboos Univ Med J**, v. 14, n. 4, p. e448-54, Nov 2014. ISSN 2075-051X

PANIAGUA GUTIERREZ, J. R. et al. Regenerative potential of low concentration SDS decellularised porcine aortic valved conduits in vivo. **Tissue Eng Part A**, Aug 26 2014. ISSN 1937-335X

PARTINGTON, L. et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. **Acta Biomater**, v. 9, n. 2, p. 5251-61, Feb 2013. ISSN 1878-7568

PRENDERGAST, B. D. The Year in Cardiology 2012: valvular heart disease. **Eur Heart J**, v. 34, n. 6, p. 427-31, Feb 2013. ISSN 1522-9645

RABKIN, E. et al. Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. **Circulation**, v. 104, n. 21, p. 2525-32, Nov 20 2001. ISSN 1524-4539

RABKIN-AIKAWA, E.; MAYER, J. E., JR.; SCHOEN, F. J. Heart valve regeneration. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 94, p. 141-79, 2005. ISSN 0724-6145

RIEDER, E. et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 127, n. 2, p. 399-405, Feb 2004. ISSN 0022-5223

ROSA, G. R. S. D. et al. Utilização do etanol na prevenção da calcificação em heteroenxerto valvar pulmonar porcino: estudo experimental em ovinos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 21, p. 304-313, 2006. ISSN 0102-7638.

SACKS, M. S.; SCHOEN, F. J.; MAYER, J. E. Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 11, p. 289-313, 2009. ISSN 1523-9829.

SCHENKE-LAYLAND, K. et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. **J Struct Biol**, v. 143, n. 3, p. 201-8, Sep 2003. ISSN 1047-8477

SCHMIDT, C. E.; BAIER, J. M. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 22, p. 2215-31, Nov 2000. ISSN 0142-9612

SCHOEN, F. J.; LEVY, R. J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. **Ann Thorac Surg**, v. 79, n. 3, p. 1072-80, Mar 2005. ISSN 1552-6259

SCHOEN, F. J. SnapShot: calcification of bioprosthetic heart valves. **Biomaterials**, v. 30, n. 26, p. 4445-6, Sep 2009. ISSN 1878-5905

SCHROEDER, J. et al. Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 7, p. 392-403, 2003/07/01 2003. ISSN 0946-2716.

SOMERS, P. et al. Decellularization of heart valve matrices: search for the ideal balance. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**, v. 40, n. 1-2, p. 151-62, Feb 2012. ISSN 1532-4184

SUN, W. Q. et al. Process-induced extracellular matrix alterations affect the mechanisms of soft tissue repair and regeneration. **J Tissue Eng**, v. 4, p. 2041731413505305, 2013. ISSN 2041-7314

SYEDAIN, Z. H. et al. Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 5-6, p. 759-69, Mar 2013. ISSN 1937-335X

TAKAGI, K. et al. In vivo recellularization of plain decellularized xenografts with specific cell characterization in the systemic circulation: histological and immunohistochemical study. **Artif Organs**, v. 30, n. 4, p. 233-41, Apr 2006. ISSN 0160-564X

TANEMURA, M. et al. Differential immune responses to alpha-gal epitopes on xenografts and allografts: implications for accommodation in xenotransplantation. **J Clin Invest**, v. 105, n. 3, p. 301-10, Feb 2000. ISSN 0021-9738

TEDDER, M. E. et al. Stabilized collagen scaffolds for heart valve tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 6, p. 1257-68, Jun 2009. ISSN 1937-335X

VYAVAHARE, N. et al. Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss. **J Biomed Mater Res**, v. 46, n. 1, p. 44-50, Jul 1999. ISSN 0021-9304

VYAVAHARE, N. R. et al. Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies. **J Heart Valve Dis**, v. 9, n. 4, p. 561-6, Jul 2000. ISSN 0966-8519

WANG, R. et al. Novel nanofiber-based material for endovascular scaffolds. **J Biomed Mater Res A**, Jul 7 2014. ISSN 1552-4965

WEBER, B. et al. Tissue engineering on matrix: future of autologous tissue replacement. **Semin Immunopathol**, v. 33, n. 3, p. 307-15, May 2011. ISSN 1863-2300

WILCOX, H. E. et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. **J Heart Valve Dis**, v. 14, n. 2, p. 228-36; discussion 236-7, Mar 2005. ISSN 0966-8519

XING, Q. et al. Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. **Tissue Eng Part C Methods**, May 27 2014. ISSN 1937-3392

ZELTINGER, J. et al. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. **Tissue Eng**, v. 7, n. 1, p. 9-22, Feb 2001. ISSN 1076-3279